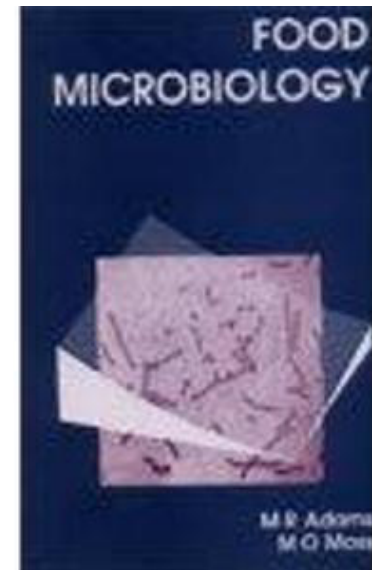
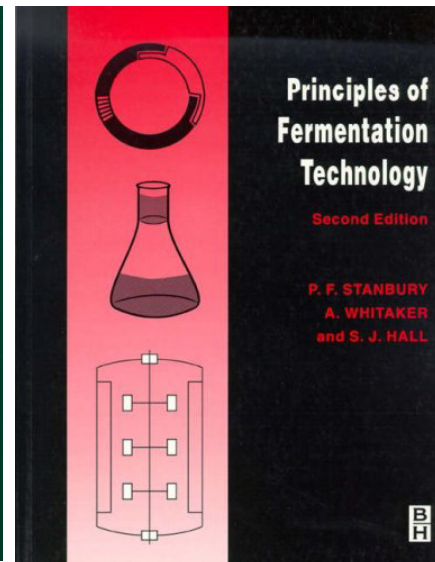
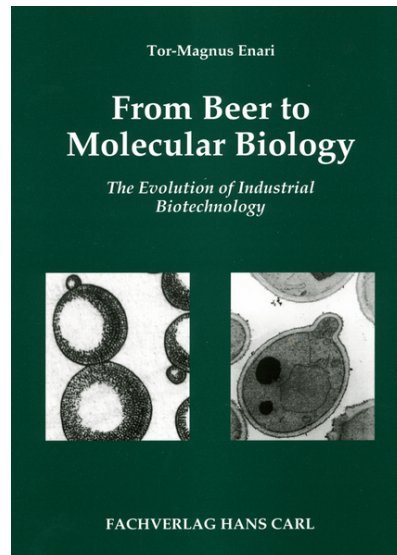
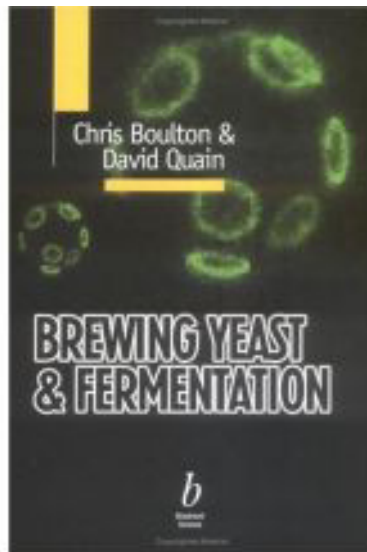
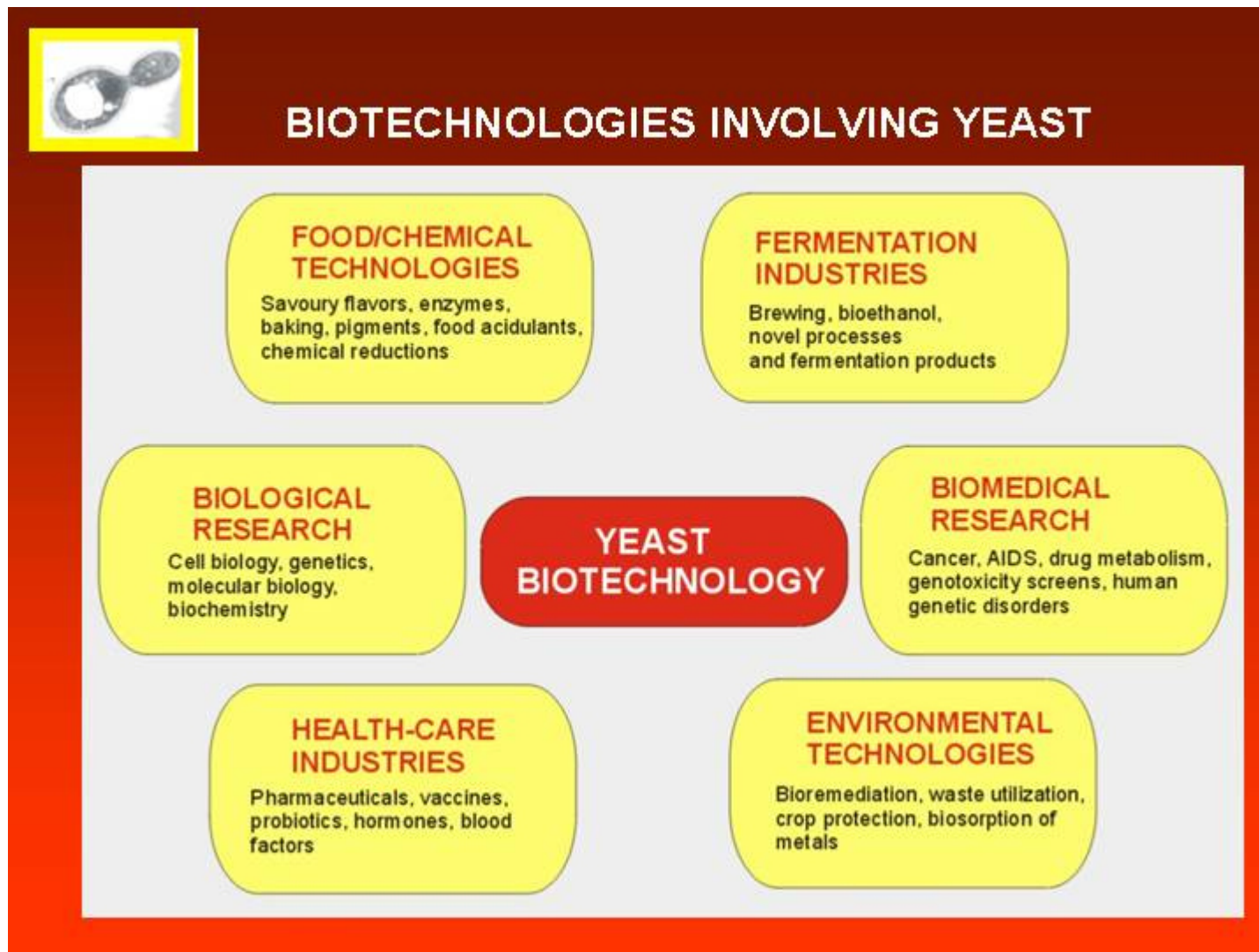


# Kvasinky a biotechnologie

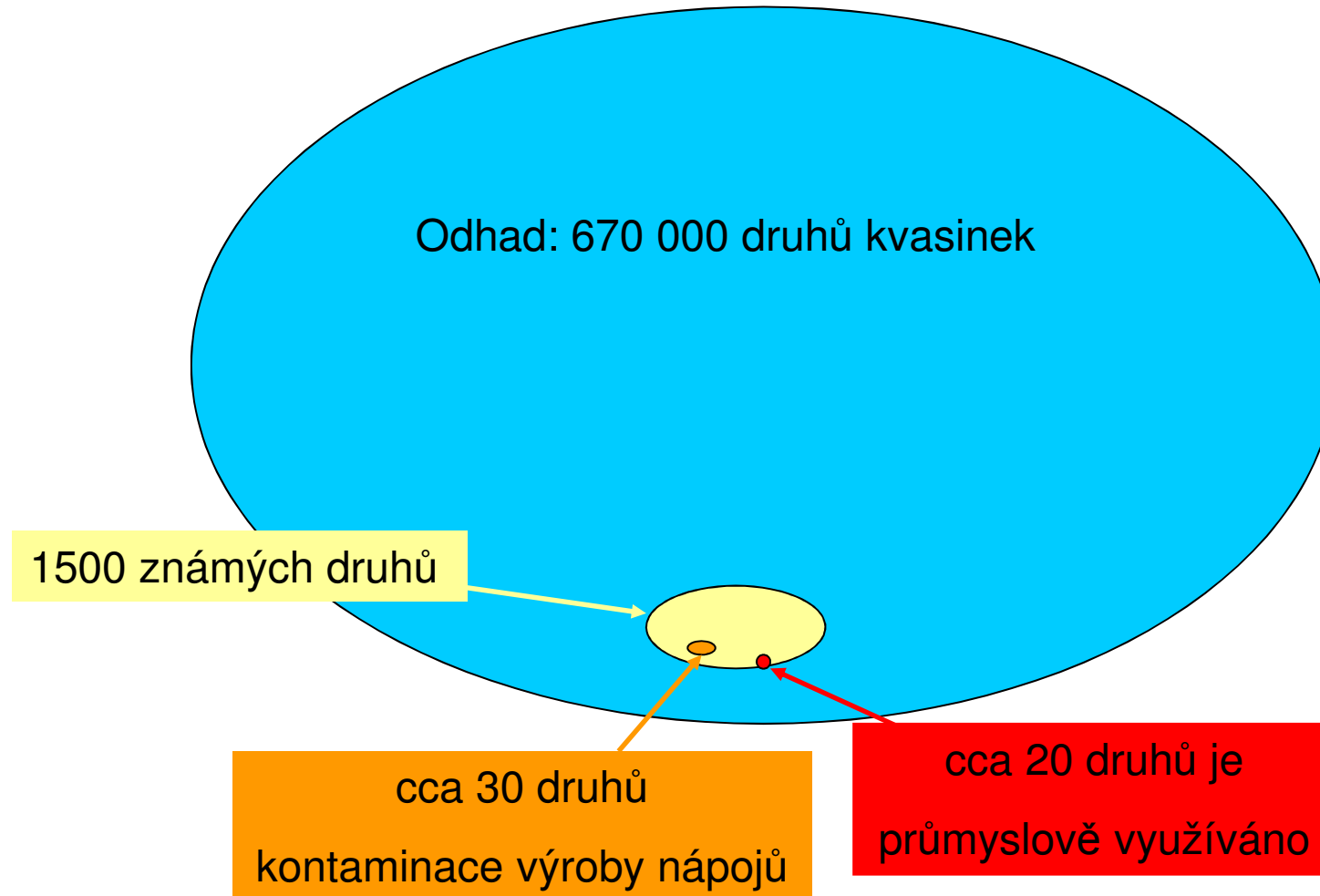
Jana Kopecká  
223187@mail.muni.cz



# Biotechnologie „klasická“ x rekombinantní



# Úvod



# Rekombinantní biotechnologie

- sekvenace *S. cerevisiae* v roce 1996  
*S. pastorianus* v roce 2009
- snadná manipulace – podobné s bakteriemi
  - (izolace mutantů, rychlost růstu, přítomnost plazmidu, ...)
- kultivace ve fermentoru



[http://www.alibaba.com/product-detail/Lab-scale-autoclavable-fermentor\\_106304138/showimage.html](http://www.alibaba.com/product-detail/Lab-scale-autoclavable-fermentor_106304138/showimage.html)

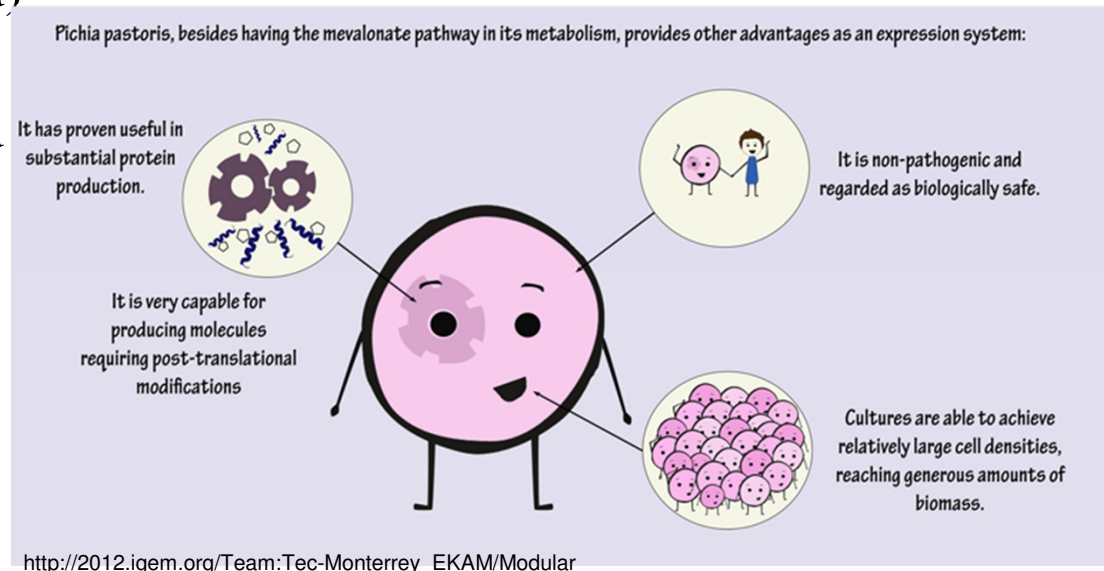
- *S. cerevisiae*, „*P. pastoris*“, *Yarrowia Lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, ...

# Kvasinkové expresní systémy

- vhodná posttranslační modifikace proteinů eukaryotního původu, ale trochu jiné struktury N-glykanů → glykozylace
- možné připojení sekretorních signálů
- podíl sekretovaného proteinu z celkového množství proteinů syntetizovaných buňkou u *S. cerevisiae* 1%, „*P. pastoris*“ až 10%
- *S. cerevisiae* – eutropin (Lg Chemical), Hepatitis B vakcína (Glaxosmithkline), hirudin (Aventis), insulin (Novo-Nordisk)

# Kultivace „*P. pastoris*“ *Komagataella pastoris*

- silný promotor pro alkoholoxidázu AOX – snadná indukce a regulace
- vnesení genu holomogní rekombinací (stabilnější než pomocí plazmidu)
- postranlační modifikace (odstranění signálních peptidů, glykozylace, tvorba disulfidových můstků)
- pro expresi velkých proteinů (>50 kD)

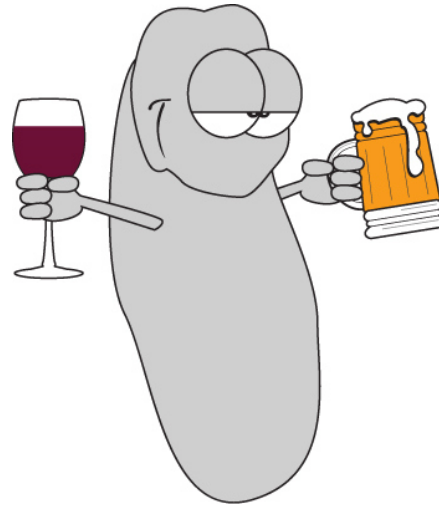


# Kultivace „*P. pastoris*“

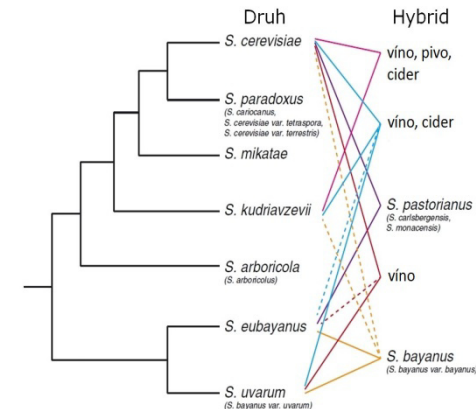
- 3-stupňový proces:
  - produkce biomasy (represe genové exprese) - glycerol
  - adaptační fáze - glycerol
  - produkční fáze – glycerol+metanol
- nutná optimalizace!!!
- sekretované i intracelulární proteiny
- velké denzity při kultivaci
- komerčně dostupný kit „*P. pastoris* Expression Kit“ (Invitrogen)

# Klasické biotechnologie

- výroba piva
- výroba vína
- výroba pečiva
- výroba lihovin
- SCP = single cell protein (krmná biomasa)
- využití převážně *S. cerevisiae*



<http://www.atlantacuisine.com/brett-oh-my-ces/>

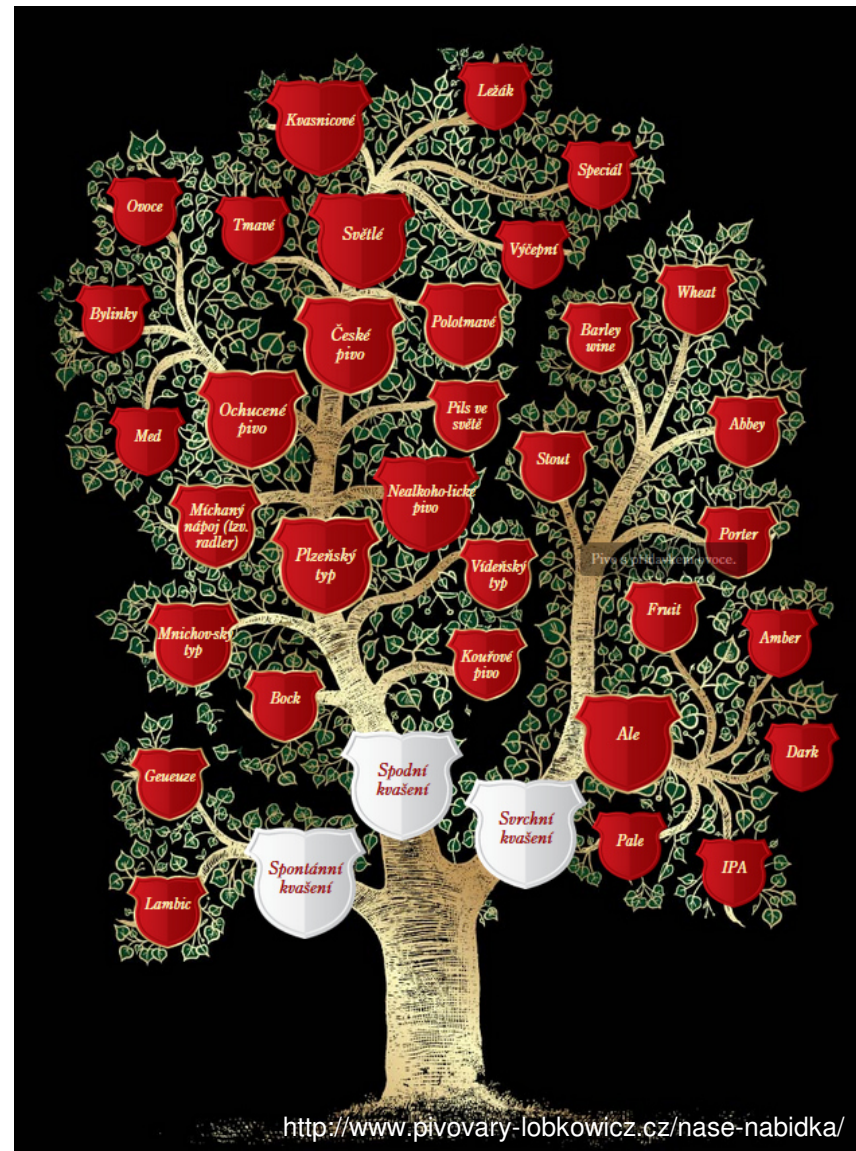


Boynton a Greig, 2014



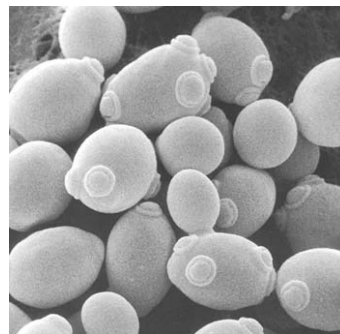
# Různé typy piv = různé podmínky

- slad
- kvasnice
- kvašení
- doba zrání
- ...



# Pivovarské kvasinky

- kulturní kvasinky používané k produkci spodně či svrchně kvašených piv
- čistá kultura – vyrovnaný tvar (kulatý, oválný), stabilní vlastnosti
- technologicky odlišné druhy:  
*S. pastorianus* (spodní) a *S. cerevisiae* (svrchní)
  - hybridní, polyploidní (tri- či tetraploidní), často i aneuploidní mikroorganizmy
- genom: *S. cerevisiae* S288c: 12 Mb, 16 chromozomů (1996)  
*S. pastorianus* W34/70: 25 Mb, 36 chromozomů, 2 subgenomy typu SC a SB, mt-genom typu SB (2009)

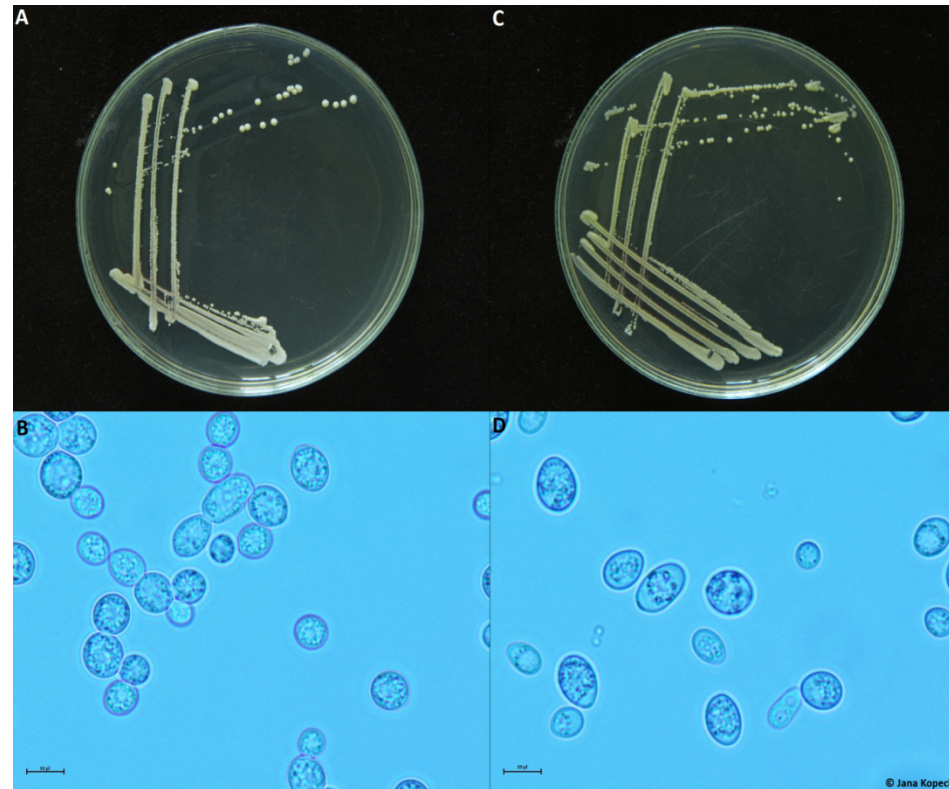


### ***S. pastorianus* (spodní)**

- hybridní původ
- hlavní kvašení při nižších teplotách (9-12°C) cca 7 dní

### ***S. cerevisiae* (svrchní)**

- hlavní kvašení při vyšších teplotách (18-22°C) cca 3 dny
- tvorba ovocných příchutí v pivu



A, B – spodní pivovarské kvasinky *S. pastorianus* RIBM 95

C, D – svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* RIBM 139

Fotografie C a D byly pořízeny při zvětšení 1000x.

# Pro každý typ piva jsou vhodné jiné kvasinky

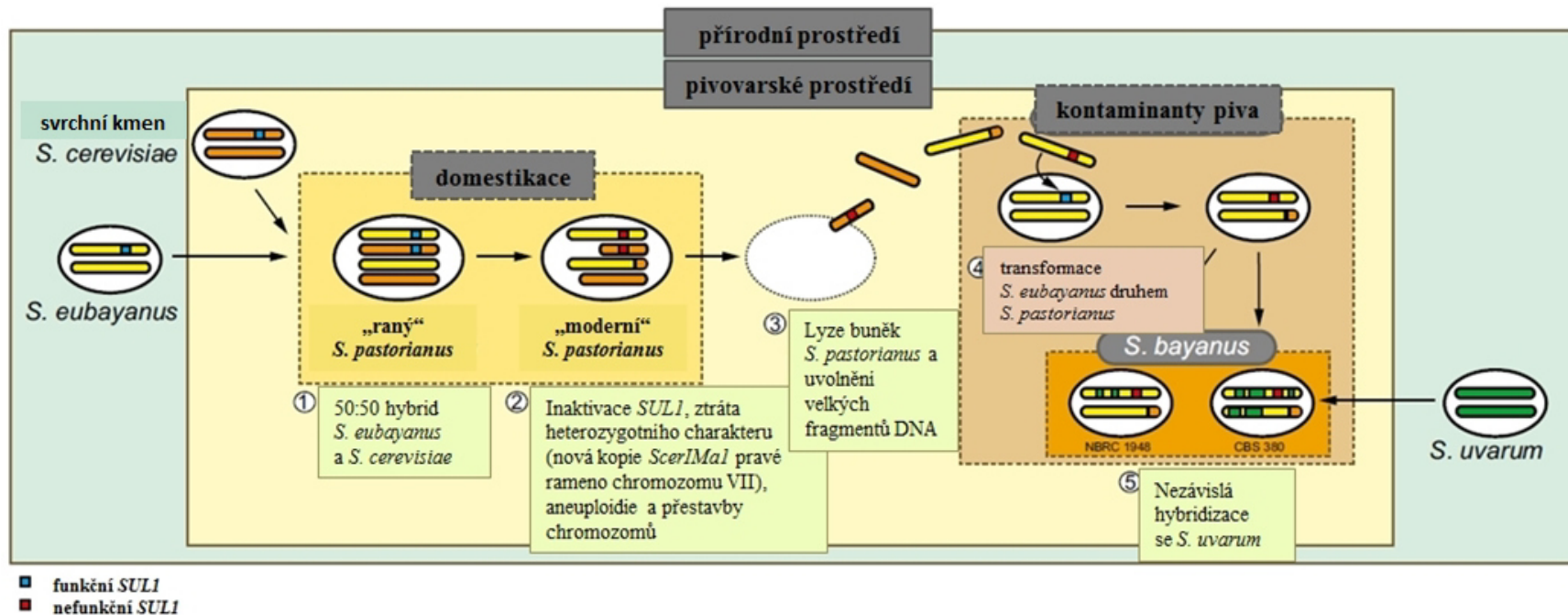
(ležák, pšeničné pivo, IPA, ale, lambic, atd.)



(<http://www.blq-weihenstephan.de/>)

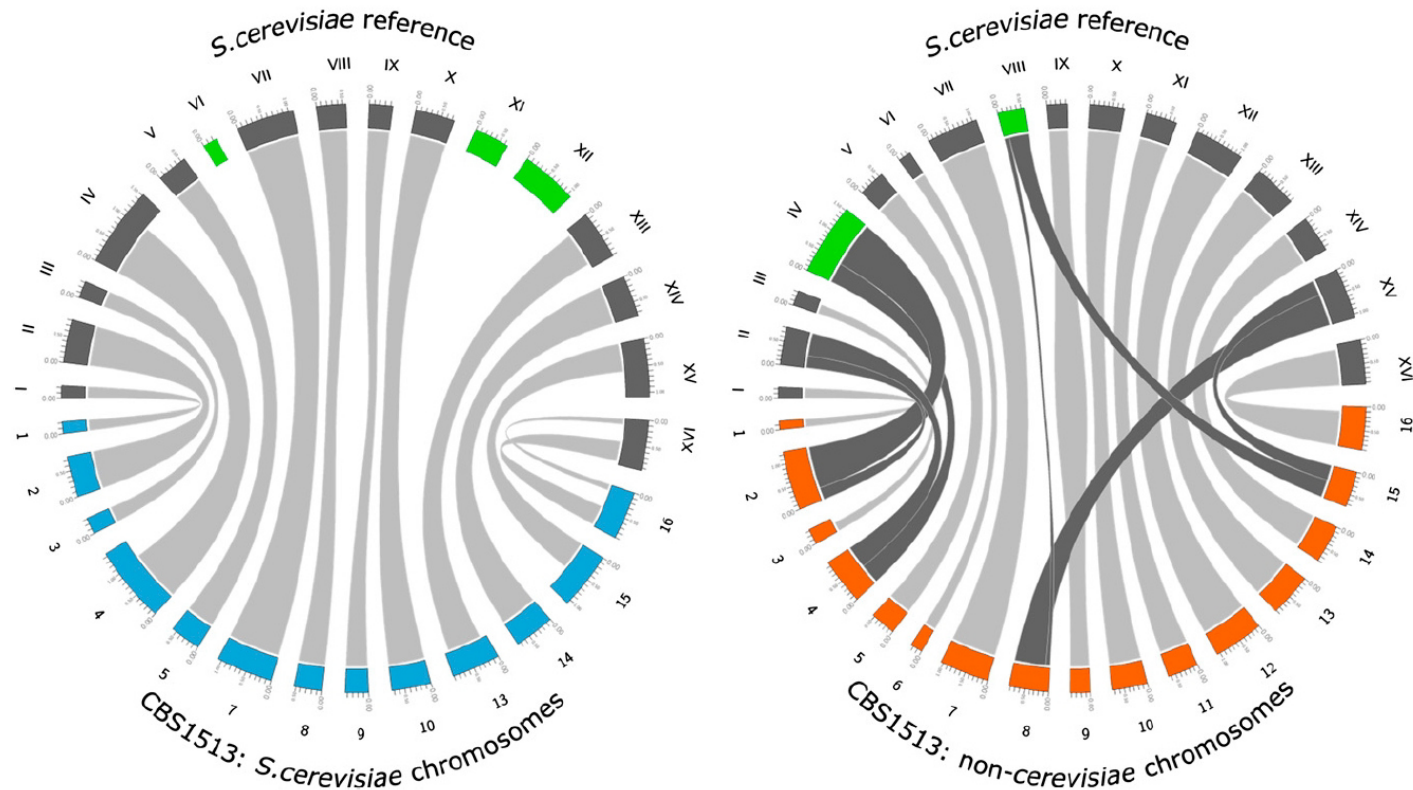
- 1. čistou kulturu spodních kvasinek izoloval v roce 1883 E. Ch. Hansen („S. carlsbergensis No.1“)
- 1. čistou kulturu svrchních kvasinek izoloval pravděpodobně v roce 1888 A. J. F. de Bavay

# Model utváření hybridních druhů *S. pastorianus* a *S. bayanus* (Libkind et al., 2011)



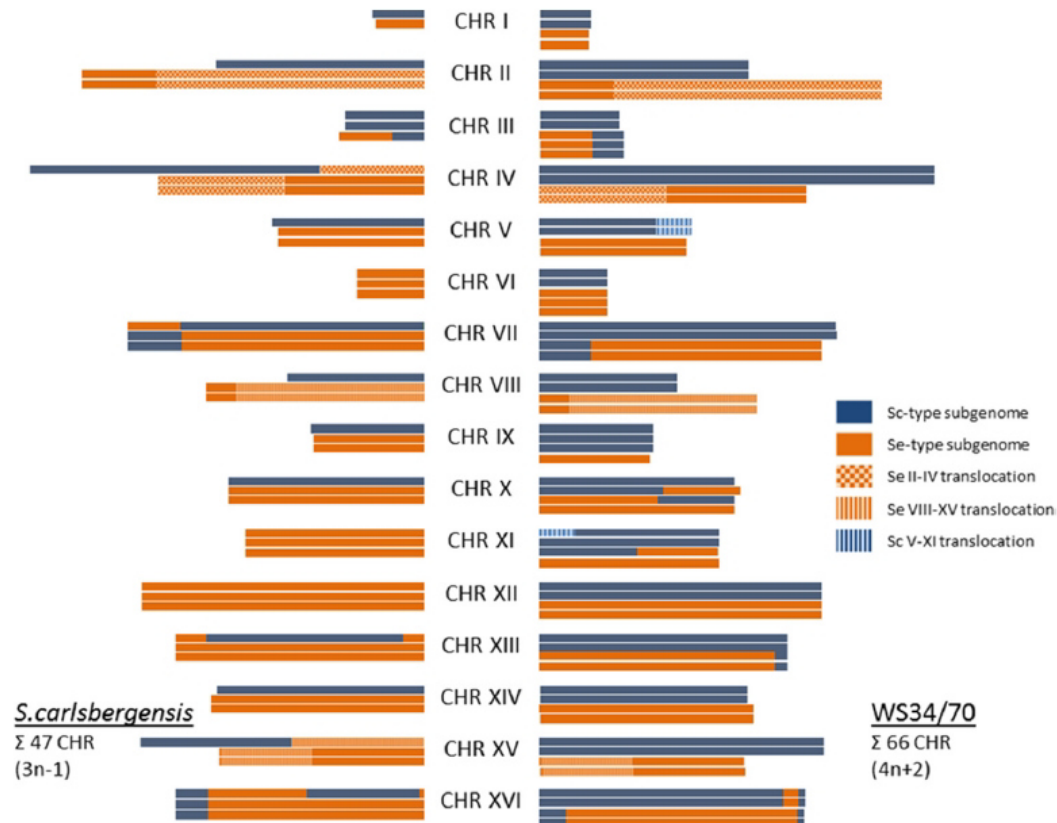
Odhadem více než 10 % kmenů klasifikovaných ve sbírkách jako *S. cerevisiae* může být přirozeným hybridem mezi *S. cerevisiae* a více či méně příbuznými druhy (Nguyen et al., 2011)

# Genom „*S. carlsbergensis* No.1“



Data ze sekvenace genomu „*S. carlsbergensis*“ byly zkompletovány se subgenomy *S. cerevisiae* a *S. eubayanus* a bylo provedeno srovnání s referenčními chromozomy *S. cerevisiae* S288C. Zeleně zvýrazněné jsou chybějící chromozomy VI, XI a XII v *S. cerevisiae* subgenomu a translokace mezi chromozomy II/IV a VIII/XV v *S. eubayanus* subgenomu kmene „*S. carlsbergensis*“.

# Srovnání kmenů *S. pastorianus*



Mapa struktury chromozomů a počtu kopií kmene „*S. carlsbergensis* No.1 a *S. pastorianus* W34/70. Subgenom *S. cerevisiae* (modrá) a *S. eubayanus* (oranžová). Interchromozomální translokace jsou zvýrazněny. Translokace mezi homology chromozomů *S. cerevisiae* a *S. eubayanus* se vyskytují na různých úsecích v obou genomech. Kmeny mají shodné tři translokace, chromozom III, VII a XVI. „*S. carlsbergensis*“ je triploidní, zatímco *S. pastorianus* W34/70 je tetraploidní.

# Vybrané senzory aktivní látky v pivu

Sloučenina	Popis vůně a chuti
<b>Acetátové estery</b>	
ethyl acetát	ovocná, rozpouštědlo
isoamyl acetát	banán, hruška
fenyl ethyl acetát	růže, med, sladká
isobutyl acetát	ovoce
<b>MCFA etyl estery</b>	
ethyl hexanoát (kaproát)	jablko, anýz
ethyl octanoát (kaprylát)	jablko
etyl dekanoát	květiny
etyl nicotinát	medicínská, rozpouštědlo, anýz
etyl pyruvát	hrášek, čerstvě posekaná tráva
etyl laktát	ovoce, máslo
<b>Vyšší alkoholy</b>	
propanol	alkohol, sladká, rozpouštědlo
izobutanol	rozpouštědlo, alkoholová
izoamyl alkohol	alkoholová, banán, ovoce
amyl alkohol	alkoholová, rozpouštědlo
2-fenyletanol	květiny, růže
<b>Fenolické sloučeniny</b>	
4-vinylguaiakol	hřebíček
<b>Vicinální diketony</b>	
diacetyl	po másle
pentadion	po másle a karamelách

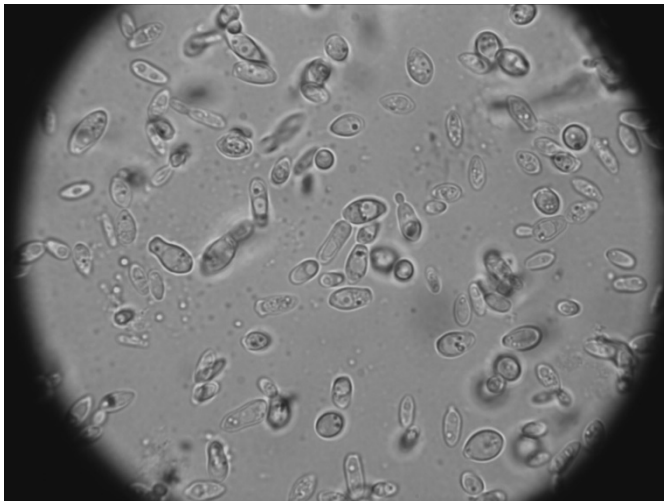


# Lambic

- střevní bakterie (3 - 7 dní)
- *Kloeckera apiculata* (3 - 7 dní)
- *Saccharomyces* (2 týdny)
- bakterie mléčného kvašení (3 - 4 měsíce)
- kvasinky rodu *Brettanomyces* (8 měsíce)
- kvasinky s oxidativním metabolismem (8 měsíce)



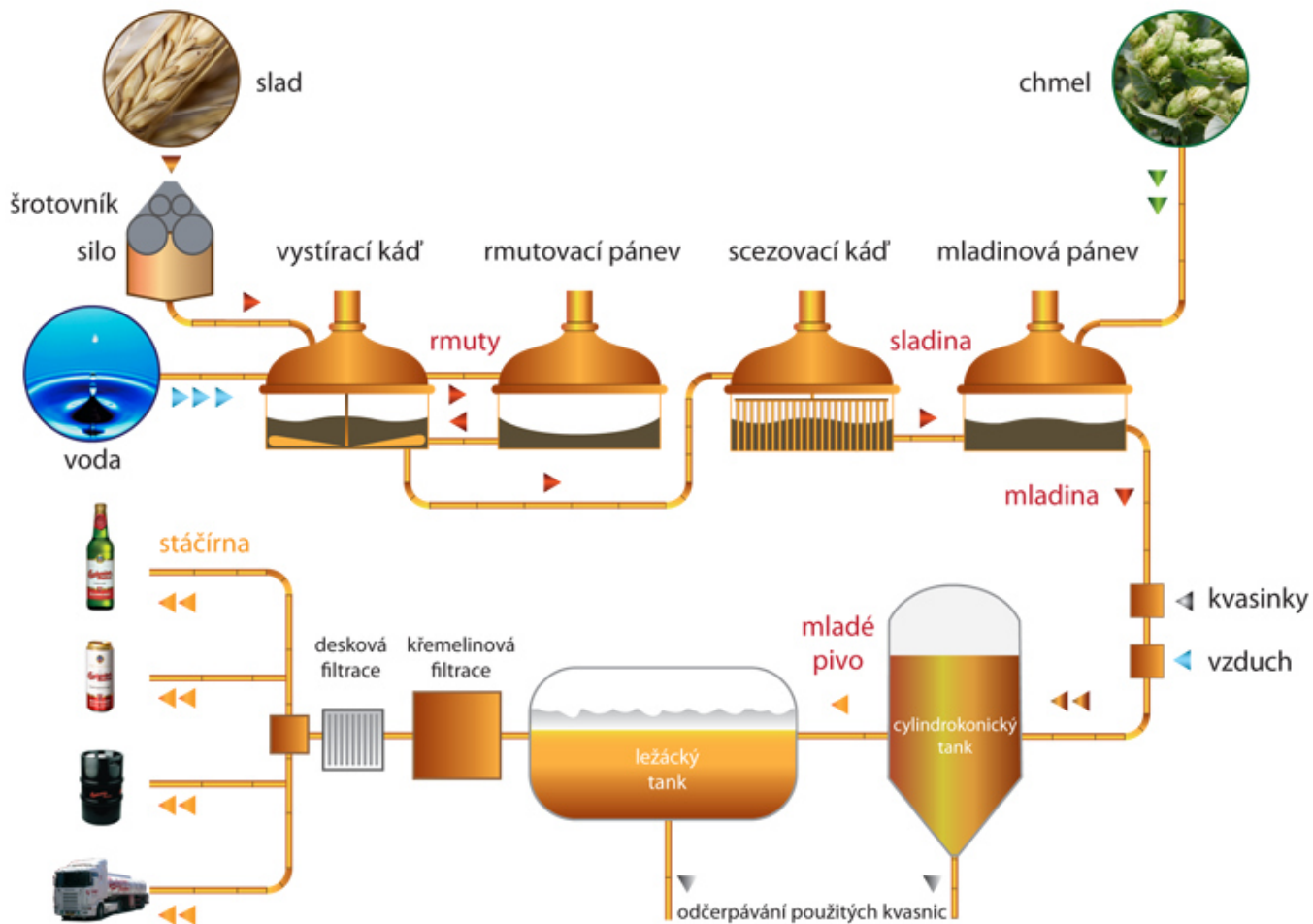
<http://www.lambic.mu/>



<https://eurekabrewing.wordpress.com/2012/04/29/brettanomyces-lambicus-microscopy-pictures/>

# Plzeňský typ - Budvar

Jak se vaří pivo u nás?



# Český ležák

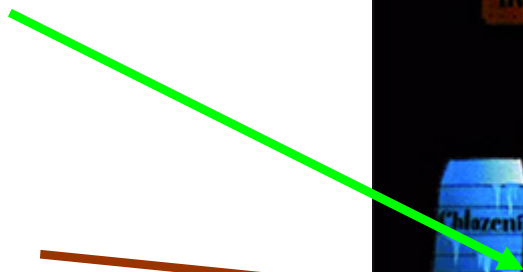


# Fáze přípravy piva

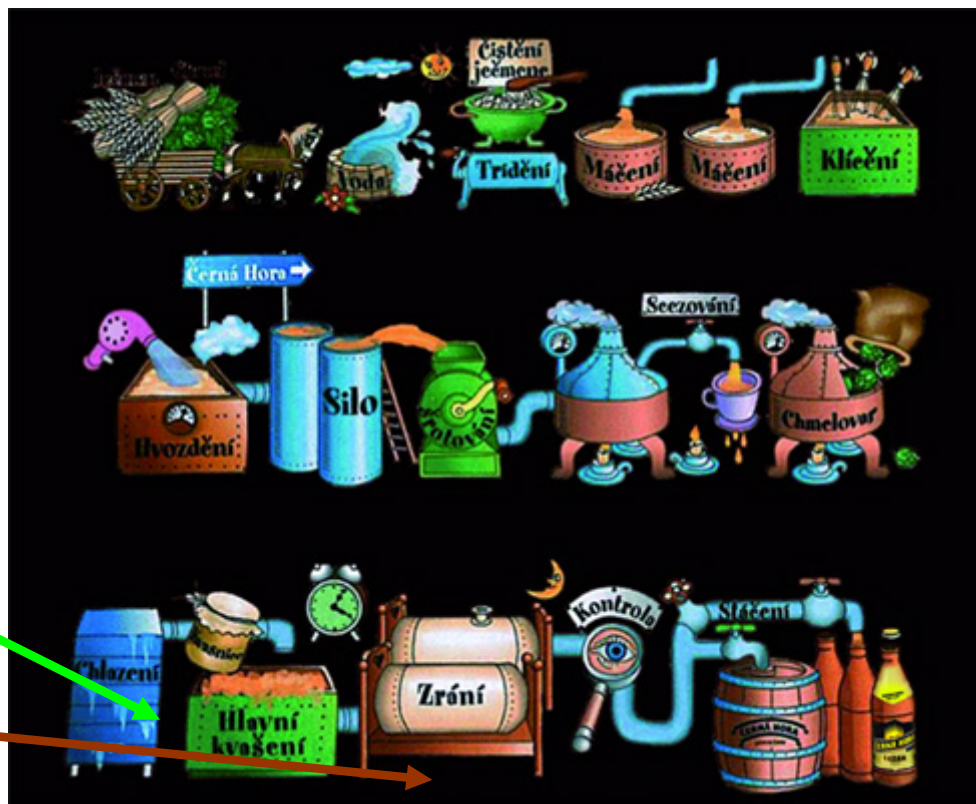
- příprava mladina



- hlavní kvašení



- dokvážení



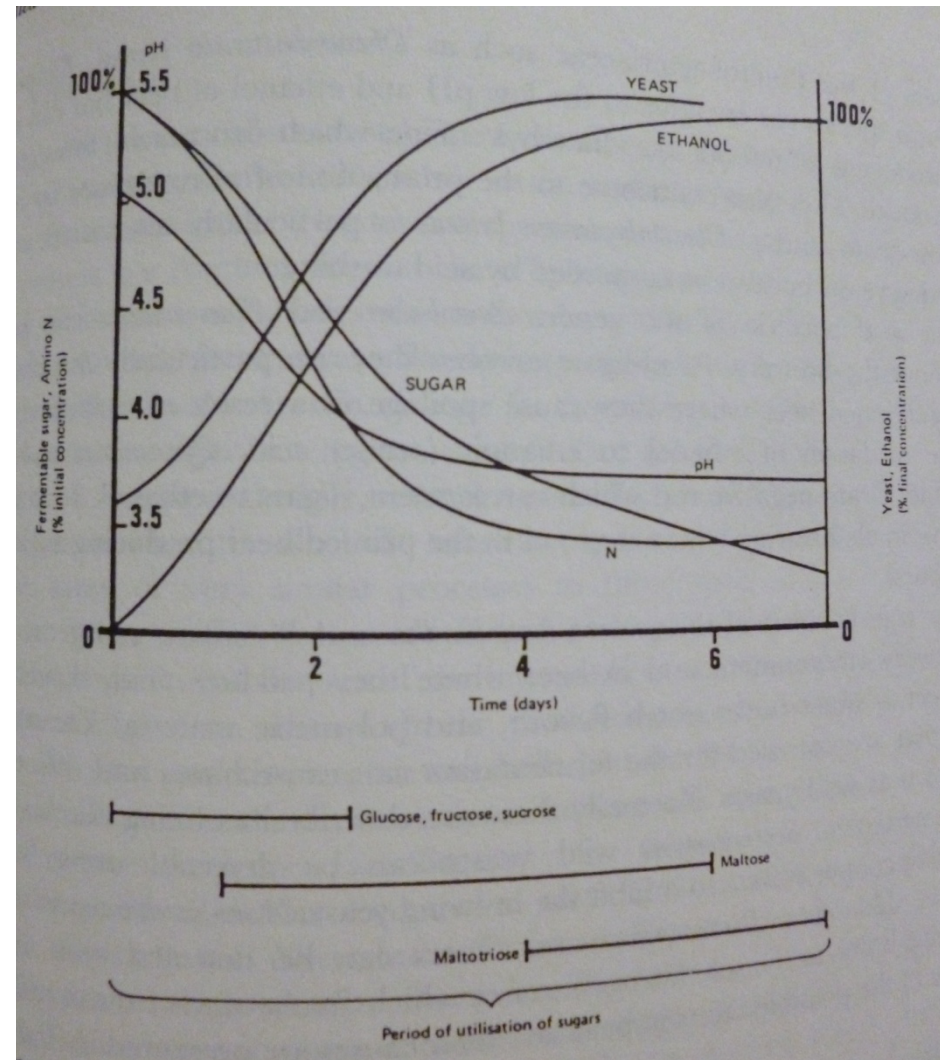
<http://www.pivovarcernahora.cz/pivovar-a-okoli/jak-varime-nase-pivo/>

# Hlavní kvašení

- dle typu piva
  - spodní kvašení **6-12°C**
  - svrchní kvašení **17-25°C**
- zhruba **7 dní (spodní)**  
(bílé kroužky, hnědé kroužky, flokulace a sedimentace kvasnic)

**3 dny (svrchní)**

!!jiný charakter piva pokud tank „leží“ či „stojí“



# Hlavní kvašení – spilka



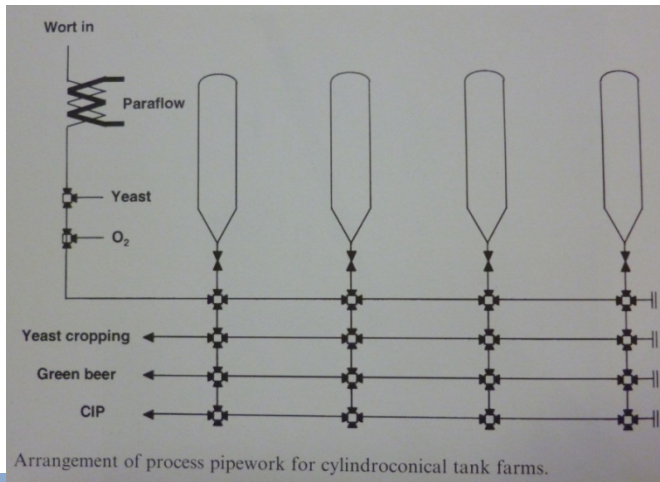
<http://www.protext.cz/english/zprava.php?id=11708>



Minipivovar Veselka, Litomyšl

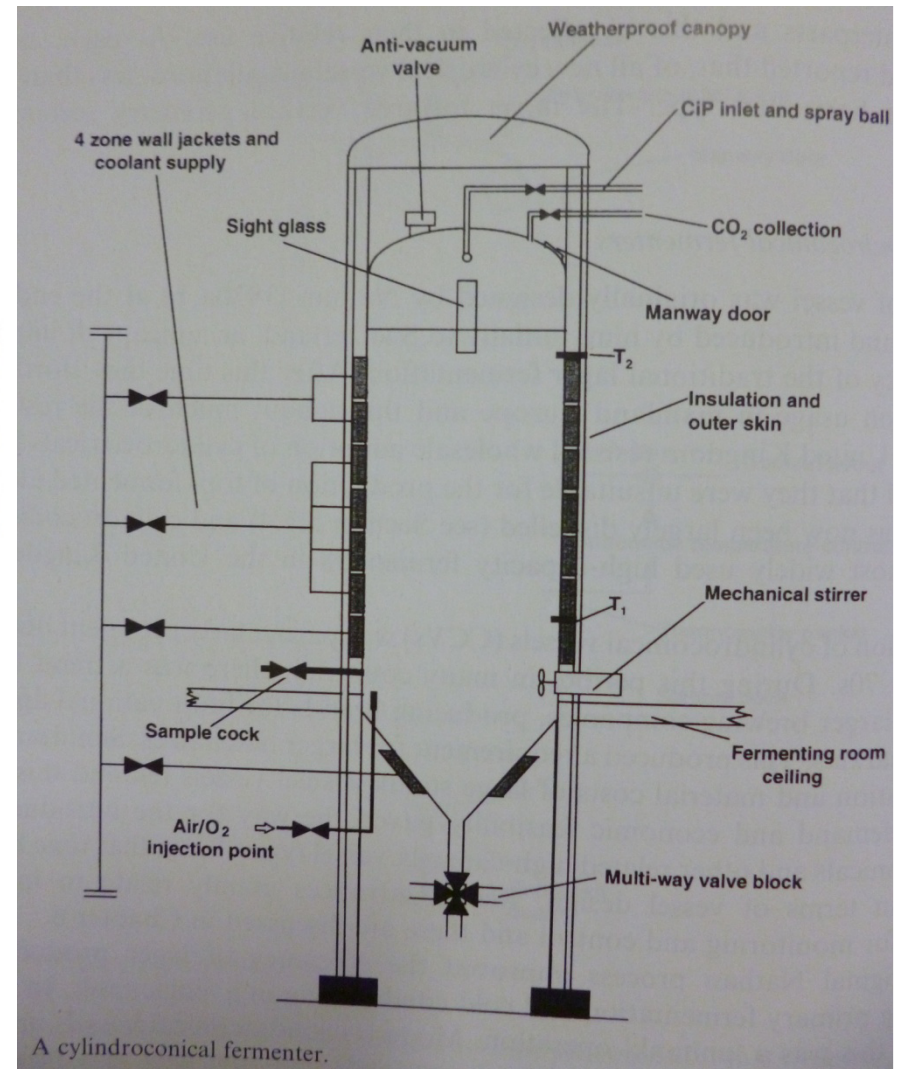


# Hlavní kvašení – CK tanky



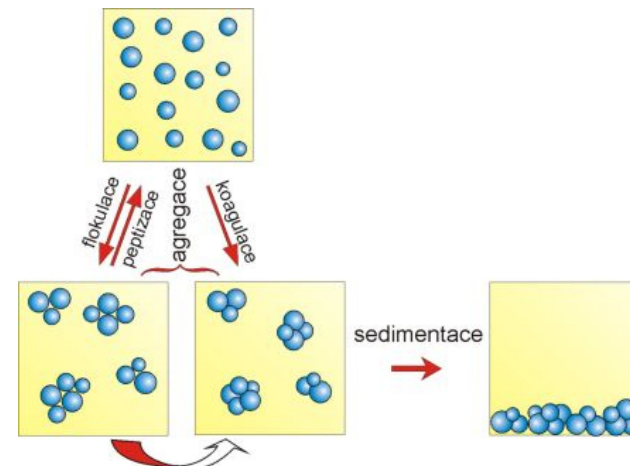
[http://www.brewia.cz/index\\_4CZ.html](http://www.brewia.cz/index_4CZ.html)

[http://www.holidaycheck.cz/fullscreen-Pivovar+Velk%C3%A9+Popovice+CK+tanky-ch\\_ub-id\\_1159333861.html](http://www.holidaycheck.cz/fullscreen-Pivovar+Velk%C3%A9+Popovice+CK+tanky-ch_ub-id_1159333861.html)

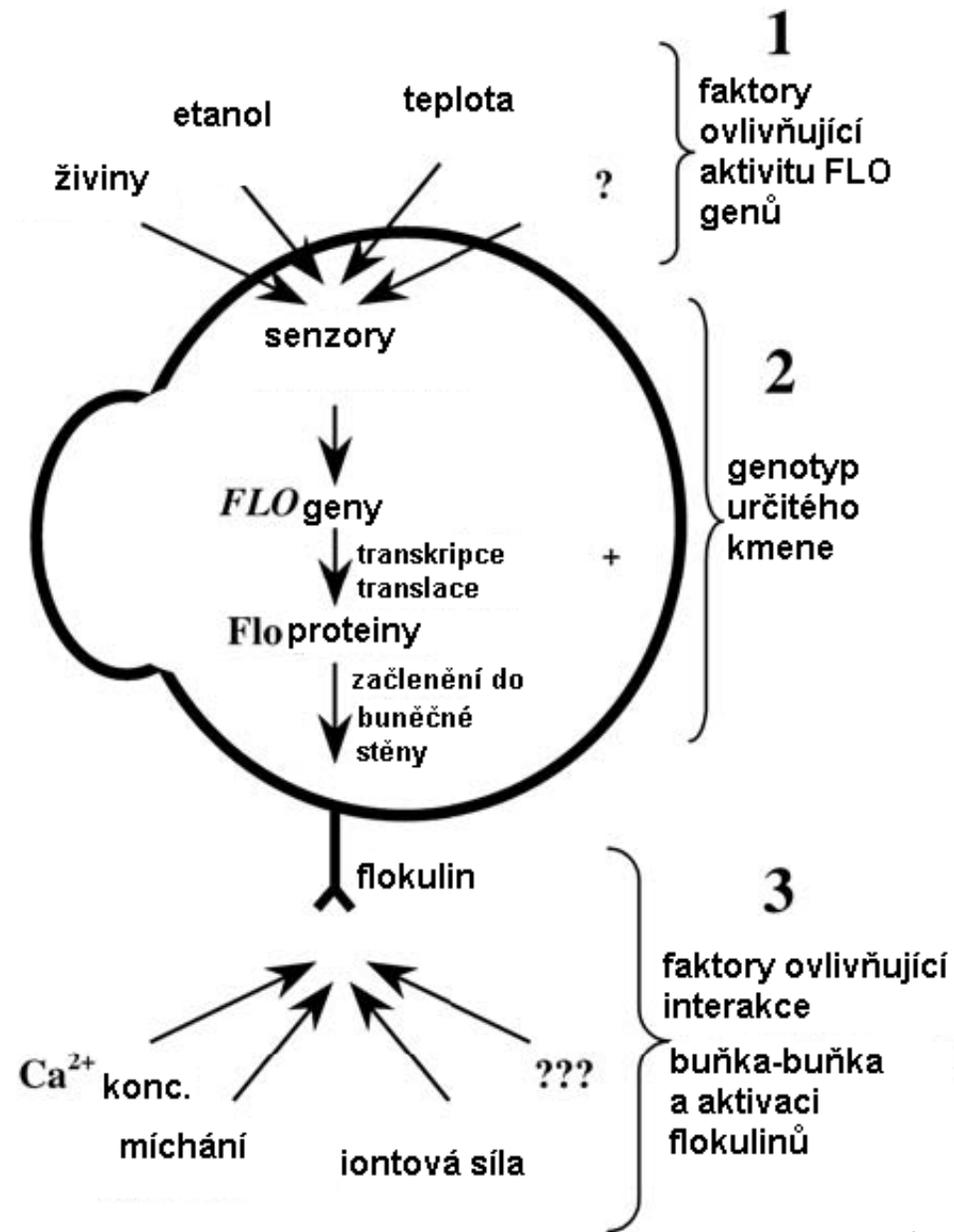


# Hlavní kvašení - flokulace

- reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se, tvořit větší celky (vločky, floky)
- !! na konci hlavního kvašení !!
- usnadňuje filtraci piva
- vliv složení média, genetické výbavy kmene (asi 33 genů), teploty, stavby a morfologie buňky...



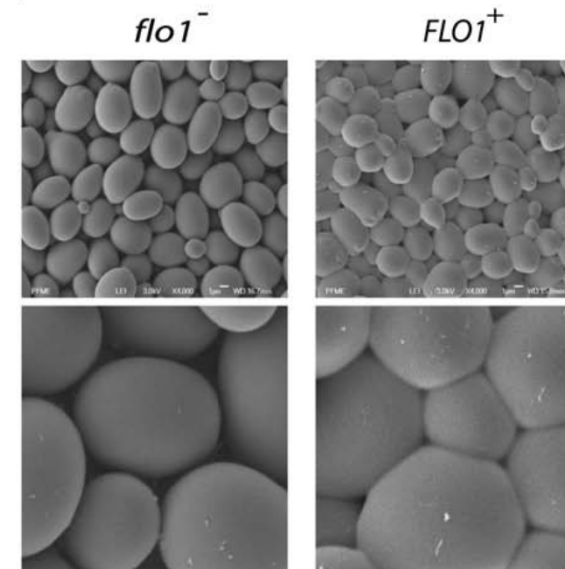
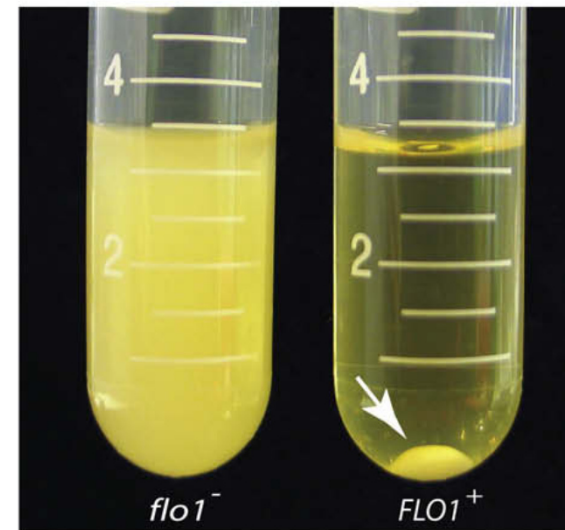




(Verstrepen et al., 2003, upraveno)

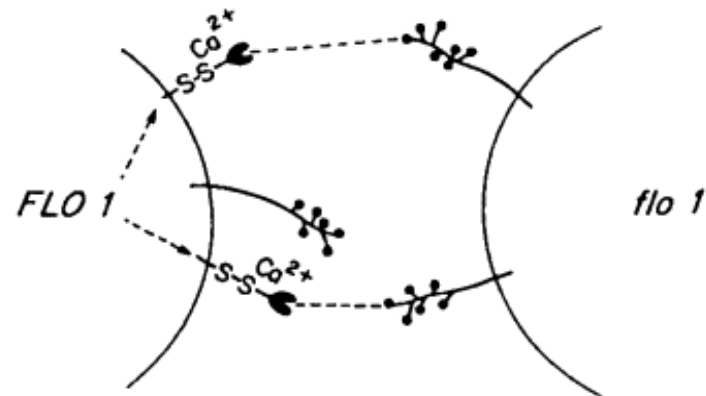
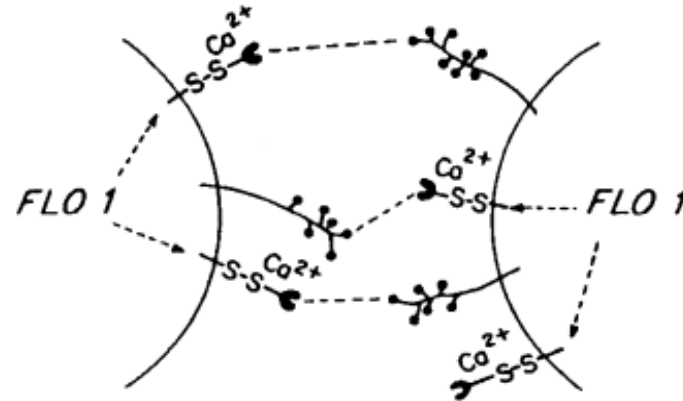
# FLO geny

- geny *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*, *Lg-FLO* kódují zymolektin
- gen *FLO8* je transkripční aktivátor
- umístění blízko telomer
- nestabilní geny



# Lektinová hypotéza - flokulace

- interakce lektinového typu (polysacharid – protein)
- specifická vazba zymolektinu na povrchu buňky na manózoové zbytky v **buněčné stěně** sousední buňky
- ionty  $\text{Ca}^{2+}$  jsou přímo zapojeny v uhlovodíkových vazbách
- (dříve se mělo za to, že udržují správnou konformaci zymolektinové vazebné sítě)

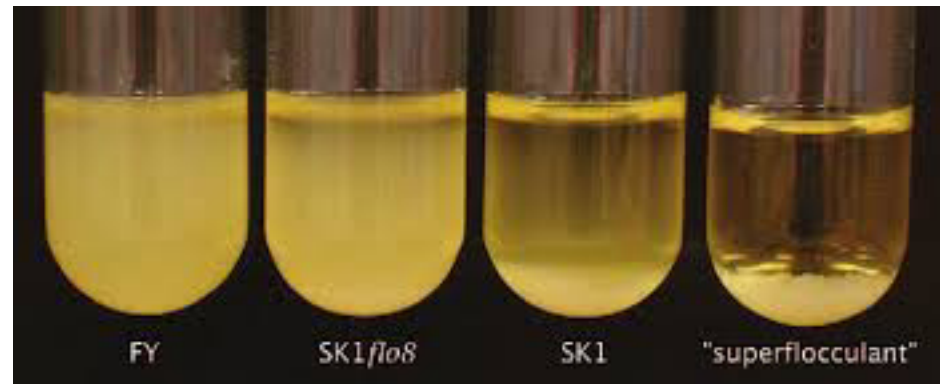


(Miki et al. 1982, upraveno)

# Flokulační fenotyp

- **Flo1** – manóza senzitivní
  - laboratorní kmeny
- **NewFlo** – manózo/glukózo senzitivní
  - pivovarské kmeny
  - širší specifita zymolektinu
  - stacionární fáze růstu

(Brauer et al. 2006, DOI 10.1534)



# Zrání piva a dokvášení

- dle stupňovitosti a typu piva!!!! (pšeničné, IPA, Ale, Porter, ležák,...)
- 3 a více týdnů za nízkých teplot (0,5-4°C)
- sycení piva, dotváření chuti
- CK tanky nebo ležácké tanky
- autolýza kvasinek je **nežádoucí**



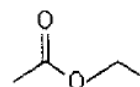
# Dokvášení

## Dotváření chuti

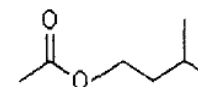
ležácký sud, CK tank (svisle, vodorovně)

- diacetyl (typický malý obsah pro česká piva)
- sycení piva CO<sub>2</sub>
- pšeničná piva  
(4-vinyl guaiacol „hřebíček“,  
izoamylacetát „banán“, vanilin, atd.)

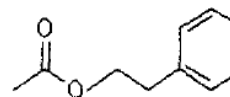
Ethyl acetate



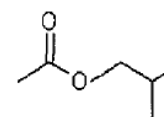
Isoamyl acetate



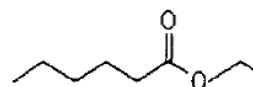
Phenyl ethyl acetate



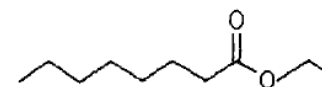
Isobutyl acetate



Ethyl caproate



Ethyl caprylate



v pivu bylo objeveno kolem 1000 různých látek, většina je sensoricky aktivní

- **silný charakter:**

říz (oxid uhličitý – vzniká kvašením)

hořkost (ze chmele nebo chmelových produktů)

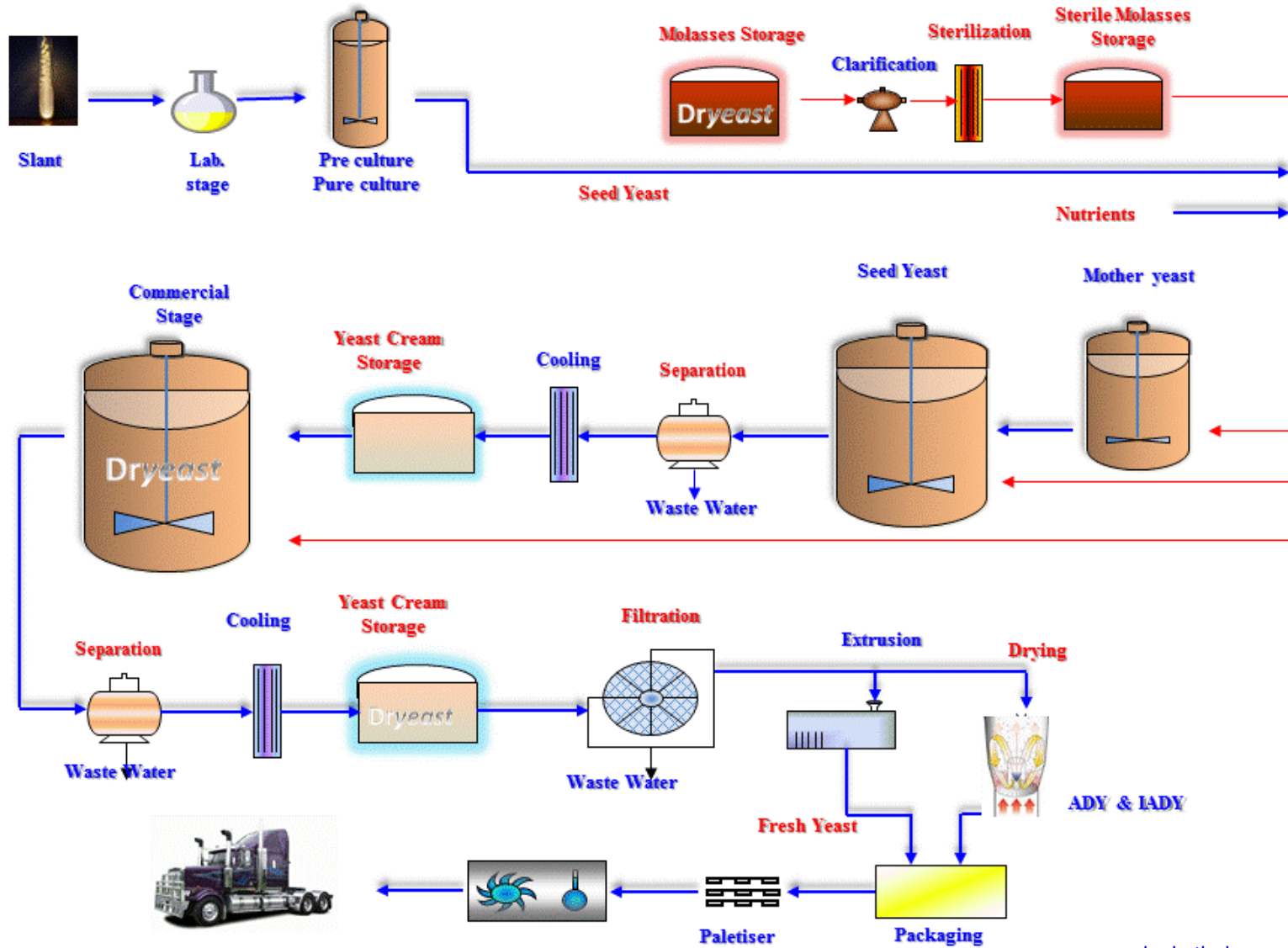
alkoholová (alkohol – vzniká kvašením)

- **střední charakter:** ovocná-esterová, diacetylová, po vyšších alkoholech, sladká, karamelová, DMS (dimethylsulfid), kyselá,

oxidační, mastné kyseliny atd.

- **slabý charakter:** velká škála látek; některé z nich mohou být ze střední skupiny, pokud se projevují slabě

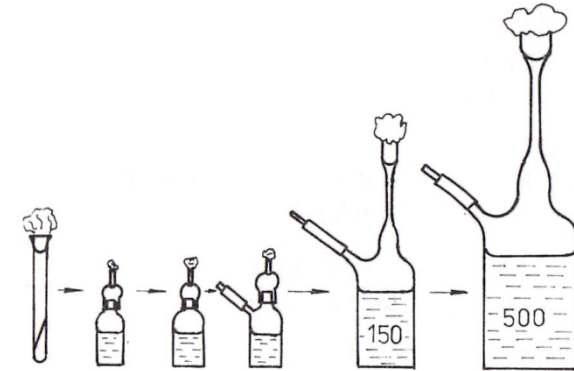
# Propagace kvasnic



# Propagace kvasnic



[www.destila.cz](http://www.destila.cz)



Obr. 16. Schéma propagace se sledem propagačních nádob  
Kvasná mikrobiologie, Tvrdoh a Bálešová, 1982



Pivovar Ježek

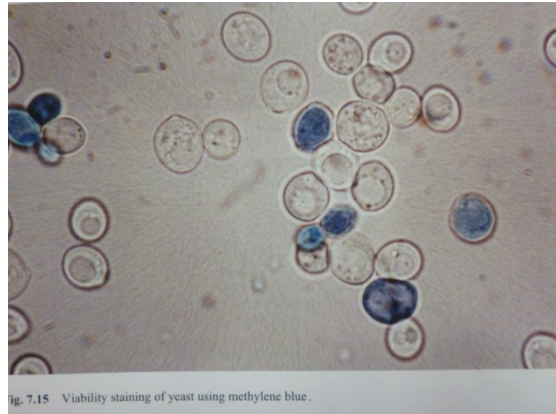


# Vícenásobné použití kvasnic

- kvasinky lze po hlavním kvašení tzv. sebrat a použít znovu (ne do nekonečna) + nové
- kontrola kvasinek – viabilita
- vliv technologických stresů
  - teplota, promývání, stupňovitost mladiny, atd.
- rozdíl u typů piv na požadavky !!!

# Kontrola kvasinek

- vitální barvení



- acidifikační test

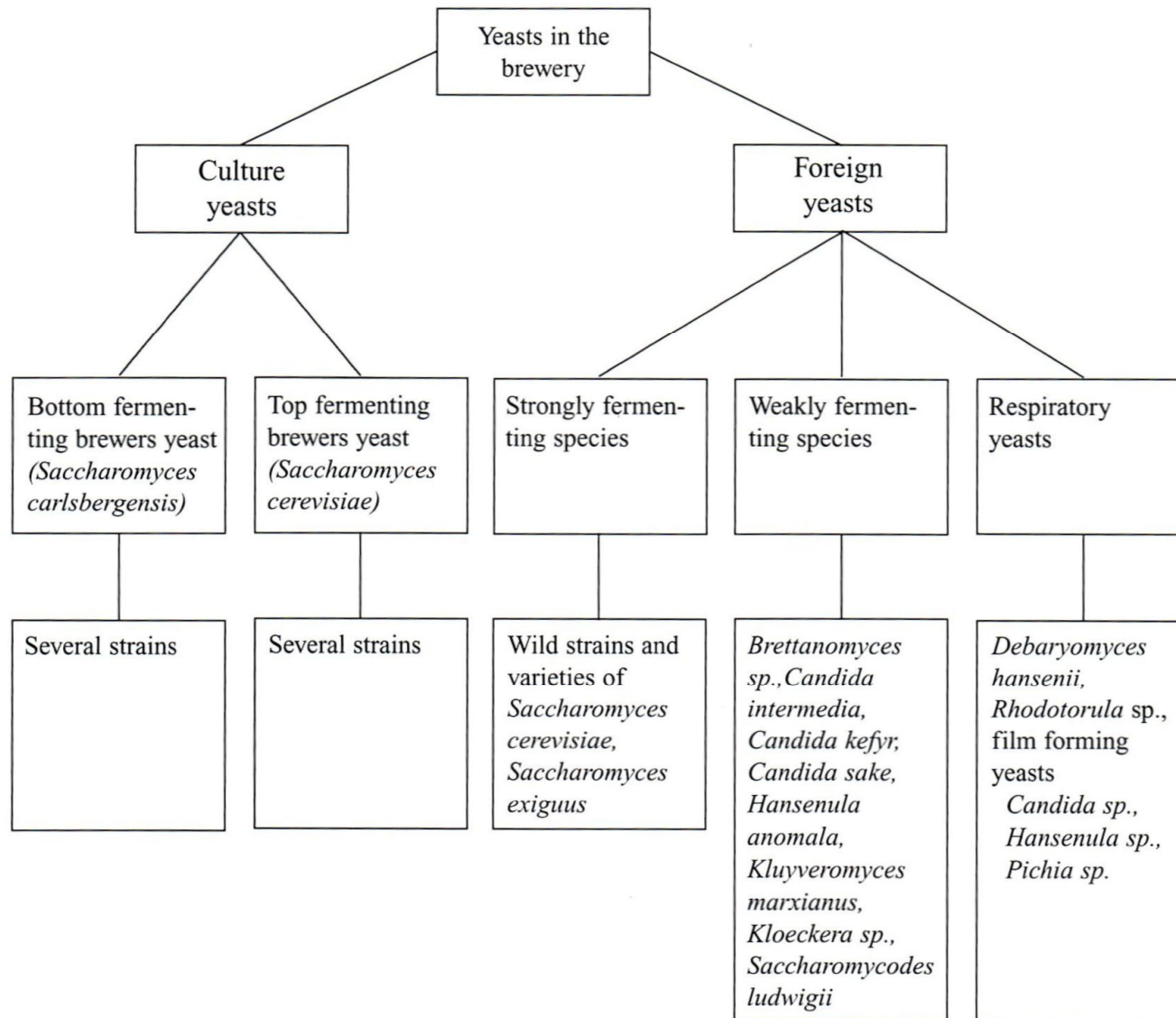


# Kontaminace v pivovaru

- **bakterie** (aerobní i anaerobní)
- **kvasinky**, které nejsou využívány úmyslně a nejsou plně pod kontrolou
  - **non-Saccharomyces**: *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, ...  
omezená schopnost růstu a množení za anaerobních podmínek a zkvašování cukrů
  - *Saccharomyces* (wild yeast) – těžké odlišení  
produkce nežádoucích aromatických látek (fenolické), amylolytické vlastnosti
  - „killer kmeny“ *Saccharomyces* – toxin; usmrcení původního kulturního kmene
  - **RD mutanty** *Saccharomyces* – změny, ztráty či delece mtDNA

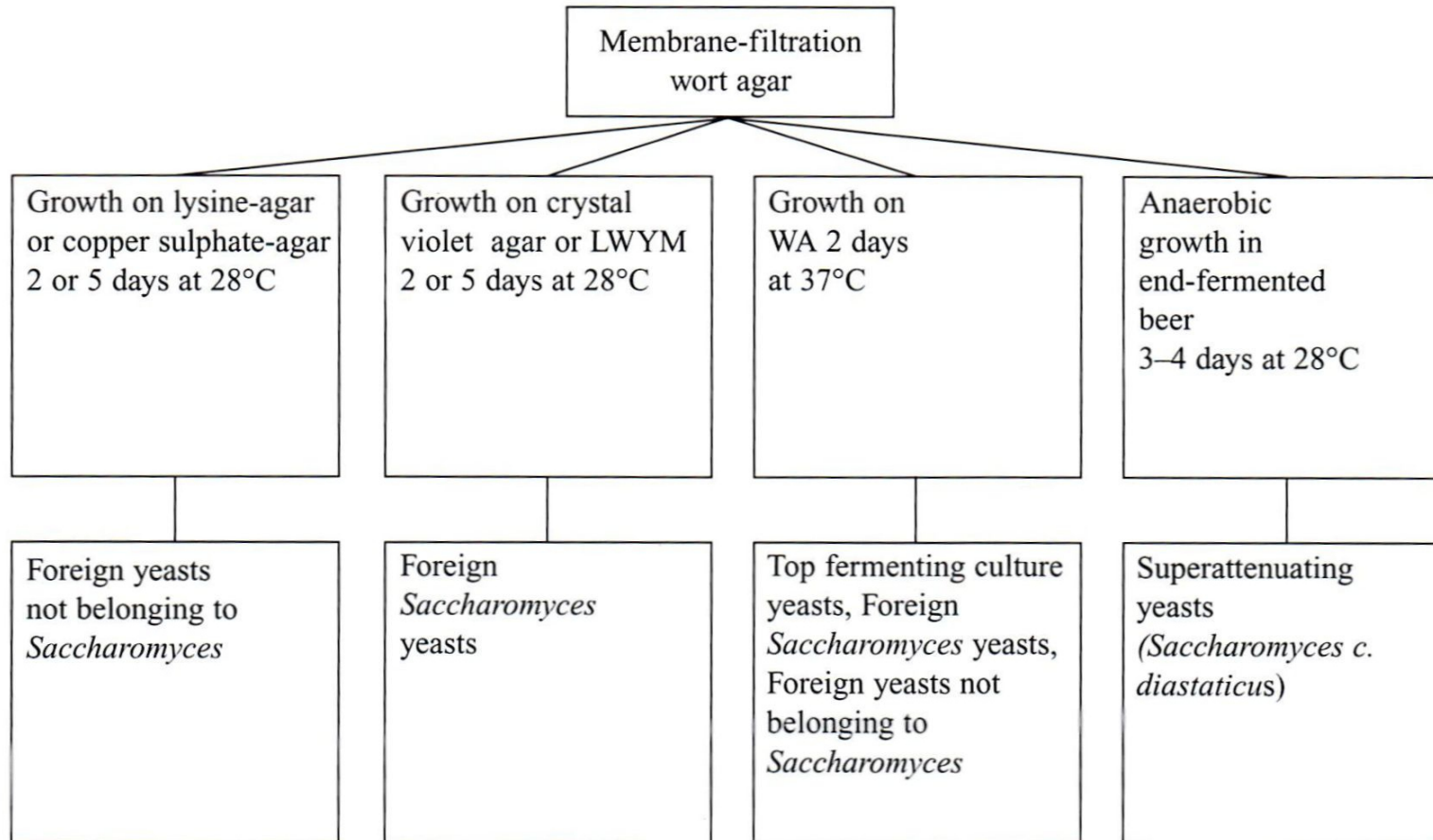
# Klasifikace kvasinek

## z pivovarského prostředí

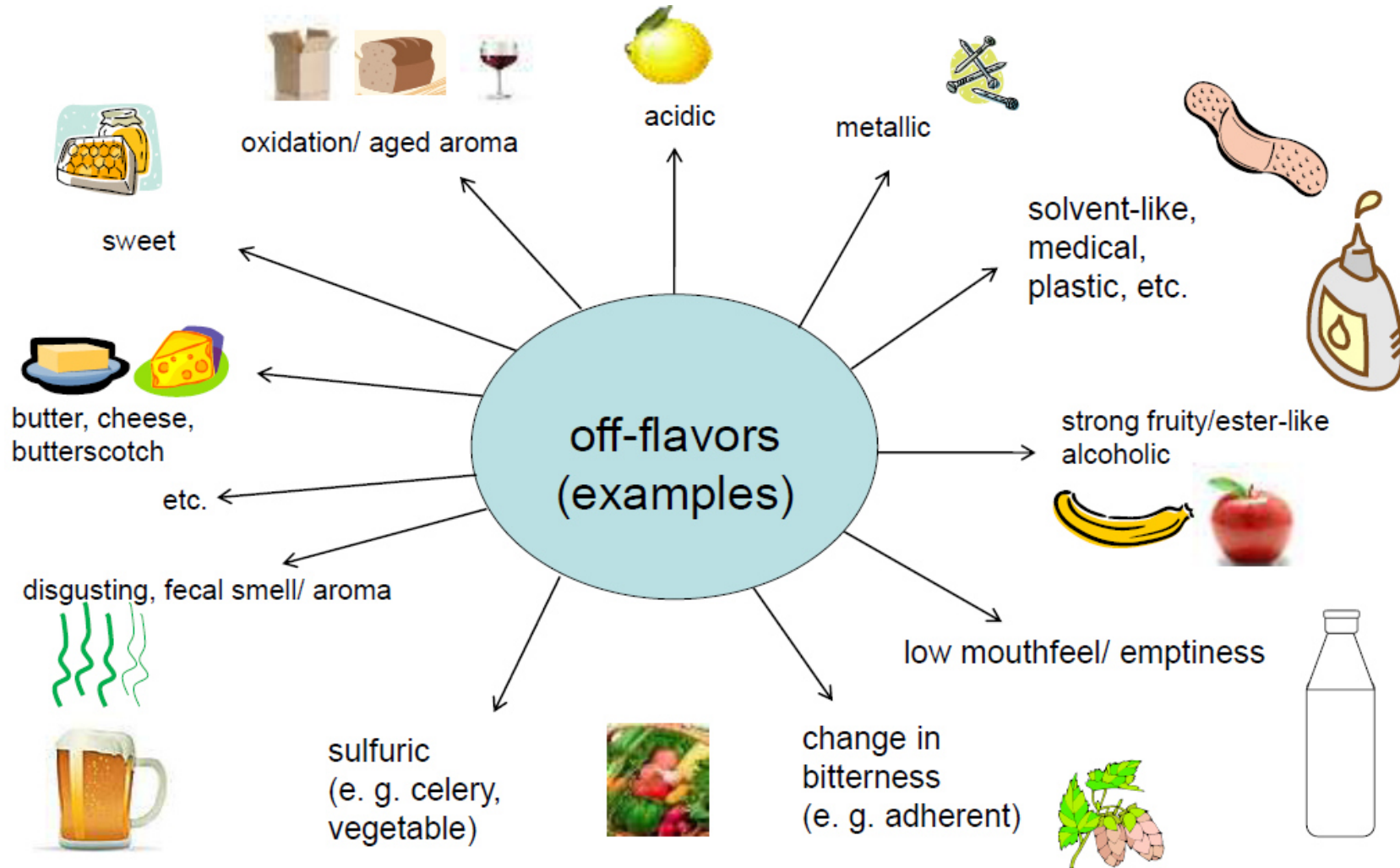


# Rozlišení kvasinek

(kultury na membránových filtrech)



# Mikrobiologická „čistota“



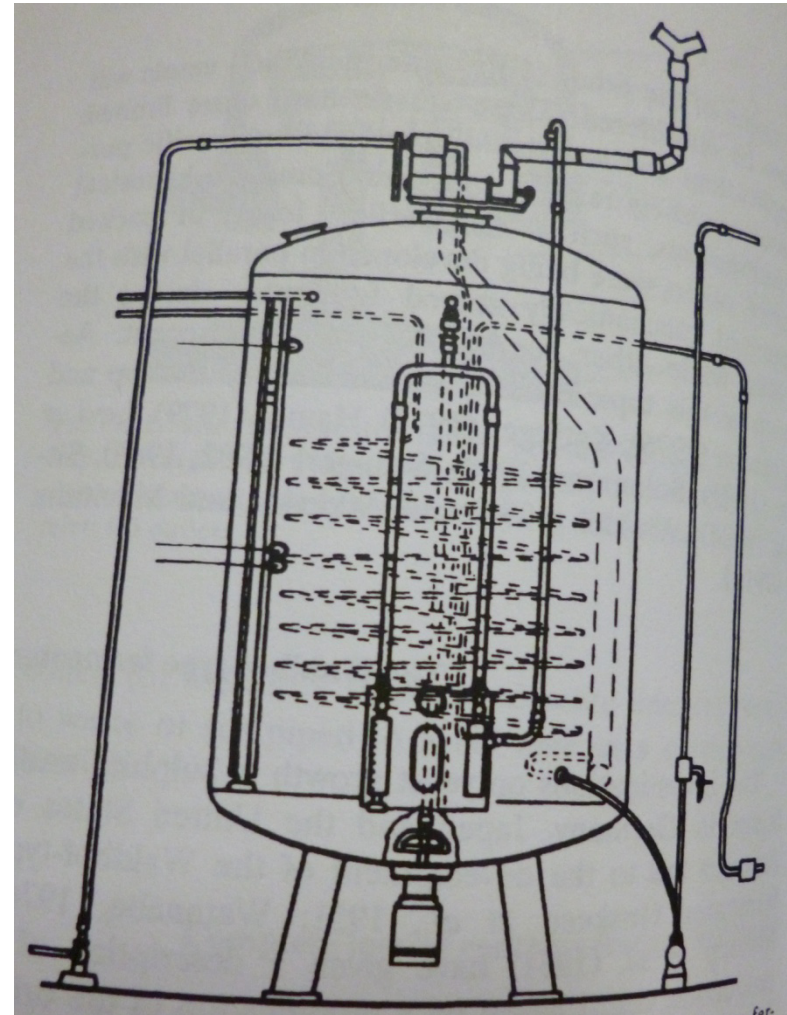
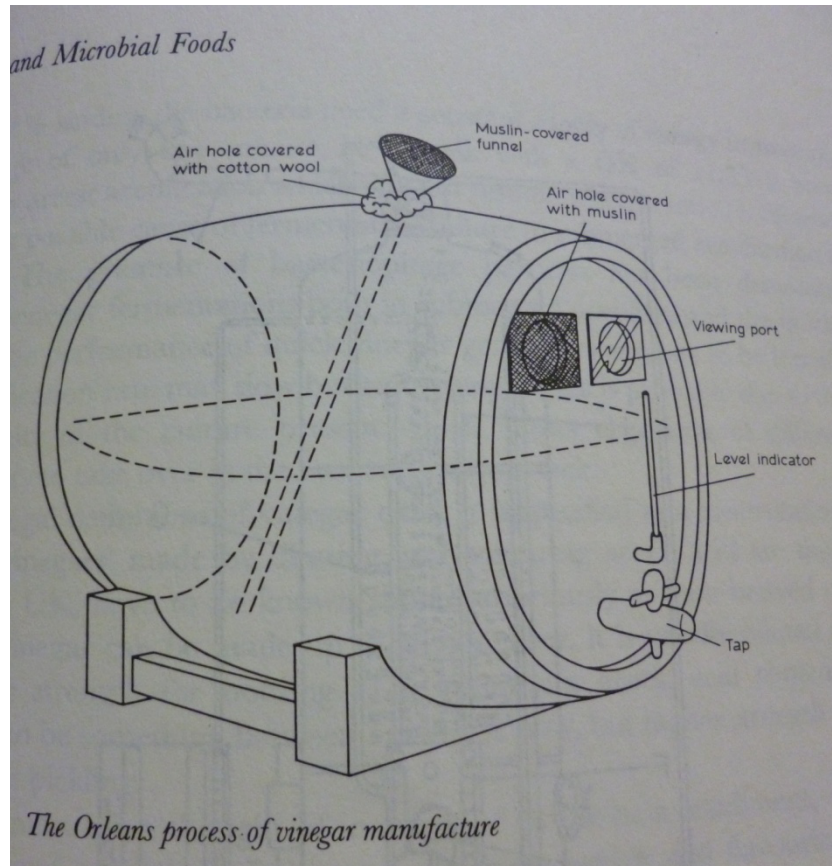
# Non-*Saccharomyces* kvasinky v pivu

- Pokusy s *Torulaspota delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus* a *Hanseniaspora uvarum*
  - využití cukrů, rezistence ke chmelovým látkám a etanolu, PCR fingerprinting, propagační testy, metabolismus aminokyselin, POF, zkušební kvašení (redukce extraktu, pH, koncentrace buněk ve vznosu, vedlejší produkty)
- Některé kmeny jsou vhodné pro produkci, některé pro pre-fermentaci s následným kvašením pomocí rodu *Saccharomyces*, některé nejsou vhodné pro produkci piva



Michel et al., dosud nepublikováno

# Fermentace vína





# Vinařské kvasinky

- „čisté kvašení“ kulturními kvasinkami
  - *S. cerevisiae* a *S. bayanus*
- „spontánní kvašení“
  - kvasinky z **povrchu bobulí**: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Metchnikowa*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*...
  - nízká fermentační aktivita, ale na začátku kvašení dominují
  - tolerance jiných mikroorganismů
  - *Saccharomyces* – schopnost dominovat

# Vinařské kvasinky - *Saccharomyces*

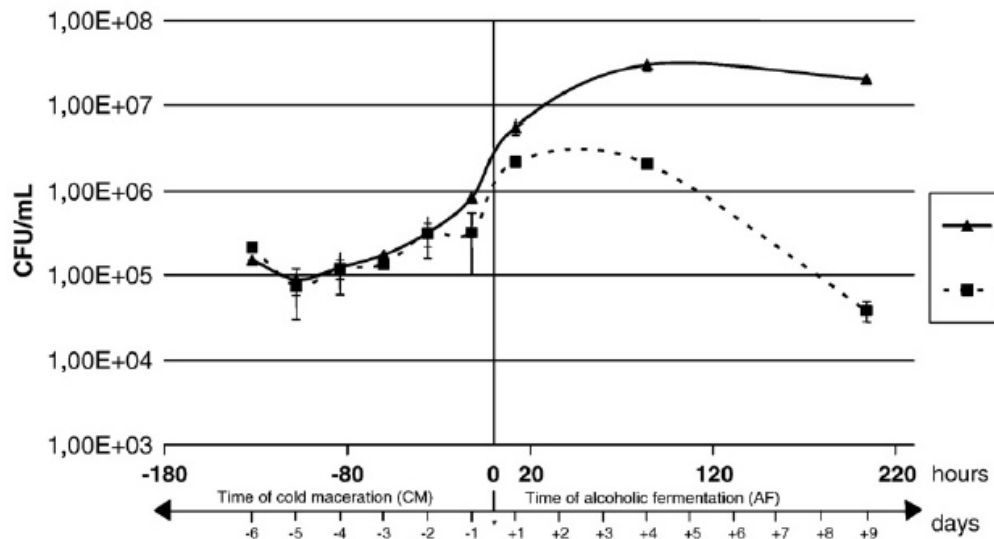
- tolerance k SO<sub>2</sub>
- kvašení do 25°C po dobu 7-14 dnů
- **autolýza kvasinek přispívá k buketu vína**
- tolerance k alkoholu (11-14%)
- nízká koncentrace zbytkových cukrů (2-5 g/l)
- produkce žádoucích esterů
- nízká produkce těkavých kyselin

# Vinařské kvasinky - *Saccharomyces*

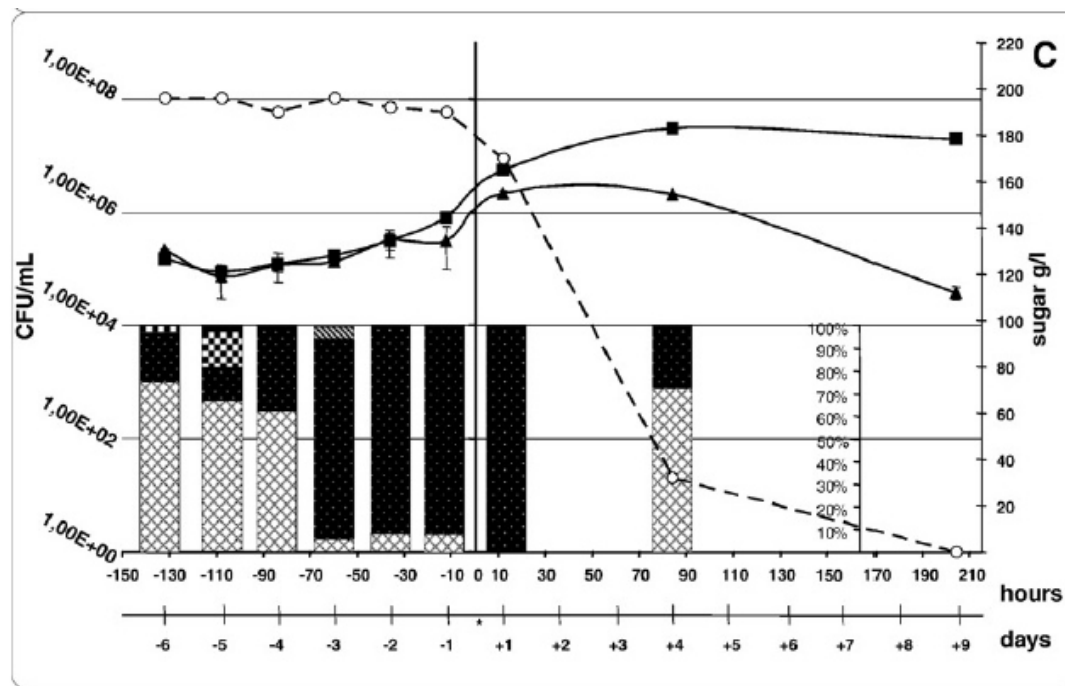
- nejčastěji diploidní, homozygotní a homotalické
- chromozomové polymorfizmy (rekombinace Ty retrotranspozonů či subtelomerických oblastí)
- geny PAU: adaptace na stresové podmínky při výrobě vína, jsou regulovány anaerobními podmínkami
- jiný počet kopií genu než u laboratorních kmenů (převážně geny důležité pro kvašení: membránové transportéry, metabolismus etanolu, geny pro rezistence, atd.)

# Spontánní kvašení

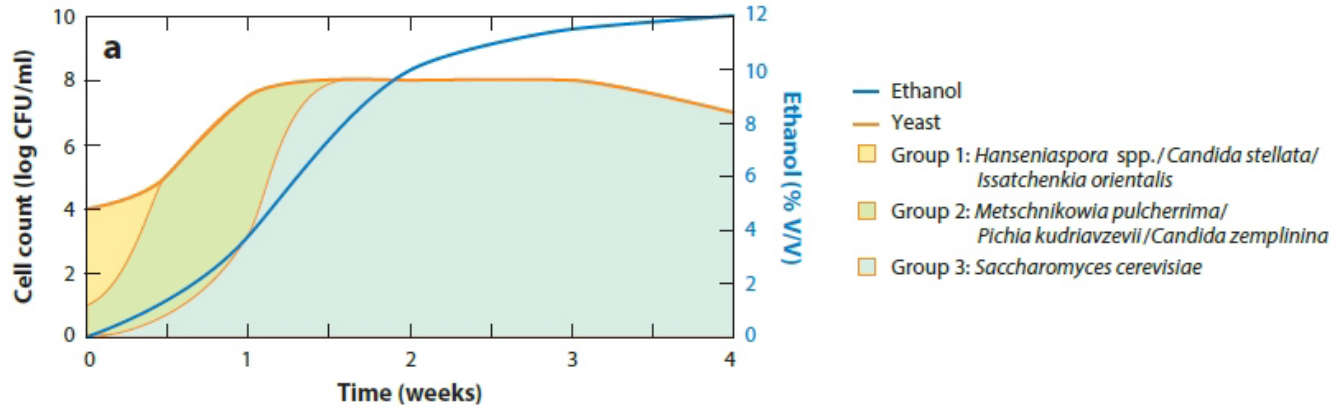
- v první fázi dominují kvasinky non-*Saccharomyces* - hodnoty až  $10^6 - 10^7$  CFU/ml (*Kloeckera*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*)
- tyto kvasinky jsou citlivější k alkoholu → následně převládá rod *Saccharomyces*
- ovlivňují chuť vína sekundárními metabolity
- populace kvasinek na bobulích a ve vinařském sklepě je značně odlišná!!



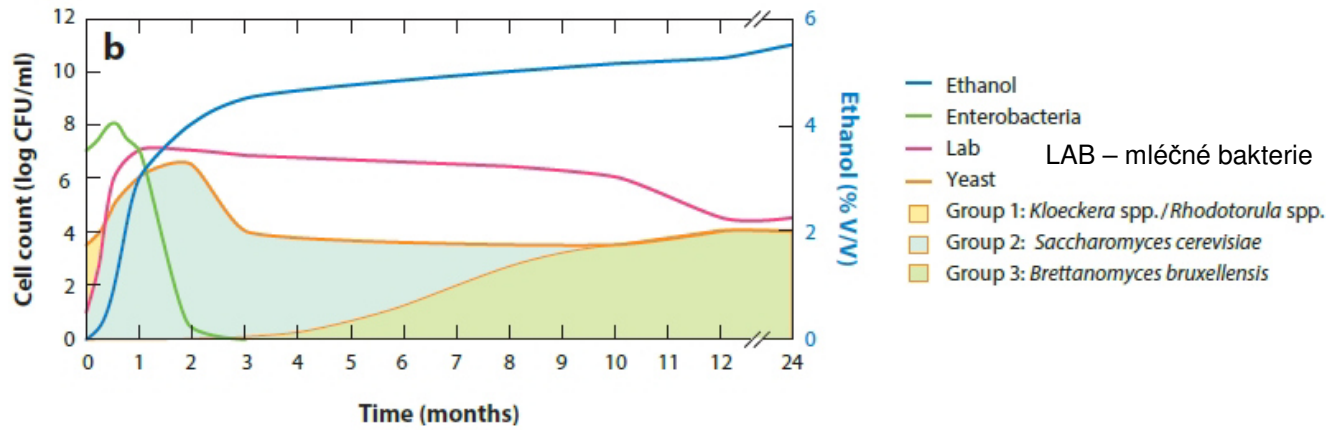
Průběh v čase: non-Saccharomyces kvasinky (NS) a celkový počet kvasinek (TY);  
0 h/\* = čas inokulace komerčním kmenem; (vinařství I, 2006 Merlot).  
Zott et al. 2008



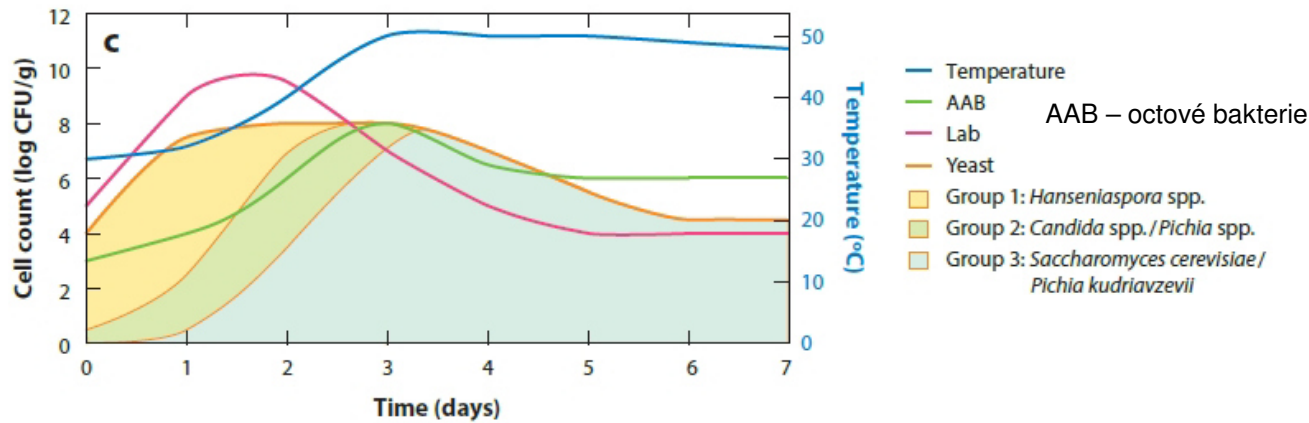
víno



lambic



kakao



# Vinařské kvasinky non-*Saccharomyces*

- **převážně aerobní:** *Pichia* spp., *Debaryomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus albidus*
- **s nízkou fermentační aktivitou** (citronkovitý tvar buňky): *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora guilliermondii* (*Kloeckera apis*), *Hanseniaspora occidentalis* (*Kloeckera javanica*)
- **s fermentativním metabolismem:** *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*), *Torulaspora delbrueckii* (*Candida colliculosa*), *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*), *Zygosaccharomyces bailii*

(Jolly et. al. FEMS Yeast Res, 2014)

# Vinařské kvasinky non-*Saccharomyces*

## vliv na aroma vína

terpenoidy, estery (160 esterů detekovaných ve víne), vyšší alkoholy (n-propanol, isobutanol, isoamyl alkohol, aktivní amyl alkohol;), glycerol, acetaldehyd, etyl acetát, kyselina octová a jantarová,  $\beta$ -glukozidásová aktivita (uvolnění těkavých složek z netěkavých prekurzorů), terpenoly (citronelol, nerol a geraniol)

(Jolly et. al. FEMS Yeast Res, 2014)

Produkce sekundárních metabolitů (mg/l) v syntetickém médiu různými kmeny non-*Saccharomyces*  
(Romano et al. 1997)

Phenotype	Acetaldehyde		Ethylacetate		N-propanol		Isobutanol		D-amyl alcohol		Isoamyl alcohol		N. of strains
	Range	Avg	Range	Avg	Range	Avg	Range	Avg	Range	Avg	Range	Avg	
Ka1	38.8–81.5	54.0	26.5– 40.9	32.6	1.5– 5.4	3.5	5.2– 9.9	8.0	7.9–11.2	10.4	18.7– 23.2	20.8	11
Ka2	6.5–12.6	9.4	25.2– 38.2	30.8	1.4– 6.1	3.9	5.3–11.2	8.4	7.7–12.6	9.4	18.5– 22.5	20.8	19
Cv	5.7–10.2	8.3	3.6– 8.2	5.2	2.8– 5.4	3.4	5.0– 7.8	6.4	5.6–11.0	8.1	8.2– 15.7	12.2	8
Cs1	29.5–47.8	36.6	3.9– 10.8	5.5	4.0–11.1	7.2	10.2–18.0	14.5	3.8– 9.0	6.0	5.0– 12.8	10.3	6
Cs2	31.2–57.9	45.0	3.7– 6.0	4.4	3.4– 8.0	5.9	11.0–13.2	12.5	5.0– 8.8	7.0	42.7–160.5	87.7	6
Cs3	4.5– 8.2	5.9	63.6–175.7	109.3	3.4– 7.5	5.3	10.2–13.1	11.5	5.0– 6.5	5.8	42.2– 58.2	49.4	3
Cs4	6.8– 8.5	7.7	5.0– 6.2	5.6	3.8– 5.4	4.6	11.0–12.5	11.8	6.8– 7.8	7.3	35.8– 38.8	37.3	2
Cs5	39.2–62.6	50.9	5.2– 5.7	5.5	3.8– 4.8	4.3	41.1–70.1	55.6	5.0– 6.2	5.6	50.3– 54.0	52.2	2
Cs6	2.5	2.5	3.7	3.7	5.0	5.0	12.5	12.5	5.8	5.8	9.8	9.8	1
Zf1	46.0–67.5	52.4	1.4– 8.2	3.6	3.8– 5.5	4.4	3.3– 8.2	4.9	1.7– 3.0	2.1	14.8– 20.6	17.3	9
Zf2	30.2–35.5	33.1	1.9– 7.8	5.3	2.6– 8.9	5.4	3.6– 9.1	6.0	1.5– 3.1	2.0	13.8– 21.0	16.1	11



# Vinařské kvasinky non-*Saccharomyces*

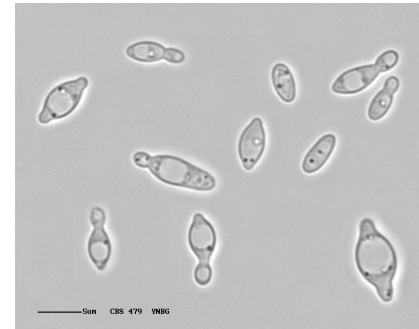
***Pichia* spp.**



<http://www.kimchitech.co.kr>

1600 © Linda Barnett

***Debaryomyces* spp.**



<http://www.tehnologijahrane.com>

***Rhodotorula* spp.**

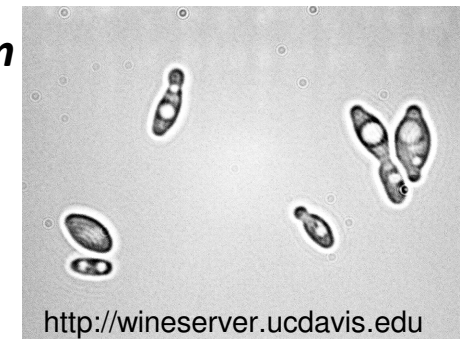


<http://www.tehnologijahrane.com>

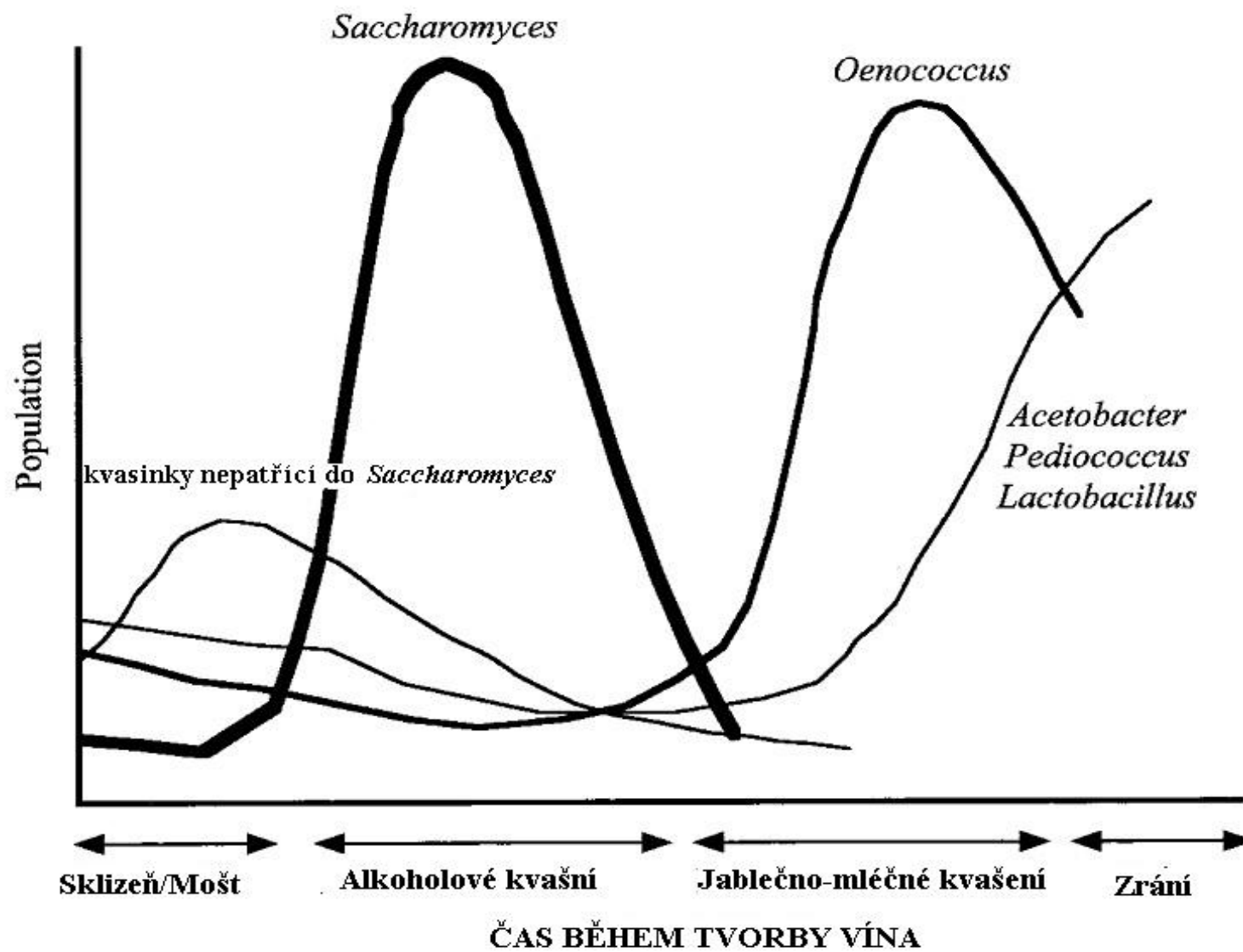


[de.wikipedia.org](http://de.wikipedia.org)

***Hanseniaspora uvarum*  
(*Kloeckera apiculata*)**



<http://wineserver.ucdavis.edu>



**Poměrné zastoupení kvasinek izolovaných z různých vinic a vinařských sklepů**  
Sabate et al. 2002

Isolation source	Species	Frequency (%) of isolation	Isolation source	Species	Frequency (%) of isolation	
Soil <sup>1</sup>	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	60	Garnacha grape variety <sup>1</sup> (1996 vintage)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	
	Unidentified pattern I	20		Carinyena grape variety <sup>1</sup> (1995 vintage)	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	75
	Unidentified pattern II	10			<i>Cryptococcus uniguttulatum</i>	10
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	5			<i>Candida zeylanoides</i>	10
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	5			<i>Aureobasidium pullulans</i>	5
Bark <sup>1</sup>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	35	Carinyena grape variety <sup>1</sup> (1996 vintage)	<i>Candida zeylanoides</i>	90	
	<i>Cryptococcus uniguttulatum</i>	25		<i>Aureobasidium pullulans</i>	10	
	<i>Candida zeylanoides</i>	15				
	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	10				
	<i>Rhodotorula</i> sp.	15				
Leaves <sup>1</sup>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	35	Must <sup>1</sup>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	60	
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	30		<i>Aureobasidium pullulans</i>	15	
	<i>Cryptococcus uniguttulatum</i>	25		<i>Pichia kluyveri</i>	10	
	<i>Cryptococcus ater</i>	5		<i>Candida stellata</i>	5	
	<i>Rhodotorula</i> sp.	5		<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	5	
Garnacha grape variety <sup>1</sup> (1995 vintage)	<i>Cryptococcus uniguttulatum</i>	65	Fermentation vat <sup>2</sup>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5	
	<i>Cryptococcus ater</i>	15		<i>Candida sorbosa</i>	76.7	
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	10		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	10		<i>Rhodotorula</i> sp.	10	
Garnacha grape variety <sup>1</sup> (1996 vintage)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100		<i>Candida zeylanoides</i>	3.3	

<sup>1</sup> Twenty colonies were analysed

<sup>2</sup> Thirty colonies were analysed

# Pekařské kvasinky

- stálost technologických vlastností
- aerobní metabolismus
- aglutinace a **autolýza je nežádoucí** (trvanlivost)
- cílem je získat co největší biomasy  
(rychlé množení, bez alkoholového kvašení)

# Lihovarské kvasinky

- melasové zápary
- vysoká tolerance k alkoholu (až 11%) a teplotě
- vysoká rychlost kvašení 24-48 hod
- osmotolerance (využití koncentrovanějších melas)
- nežádoucí je aglutinace a sedimentace

# SCP (Single Cell protein)

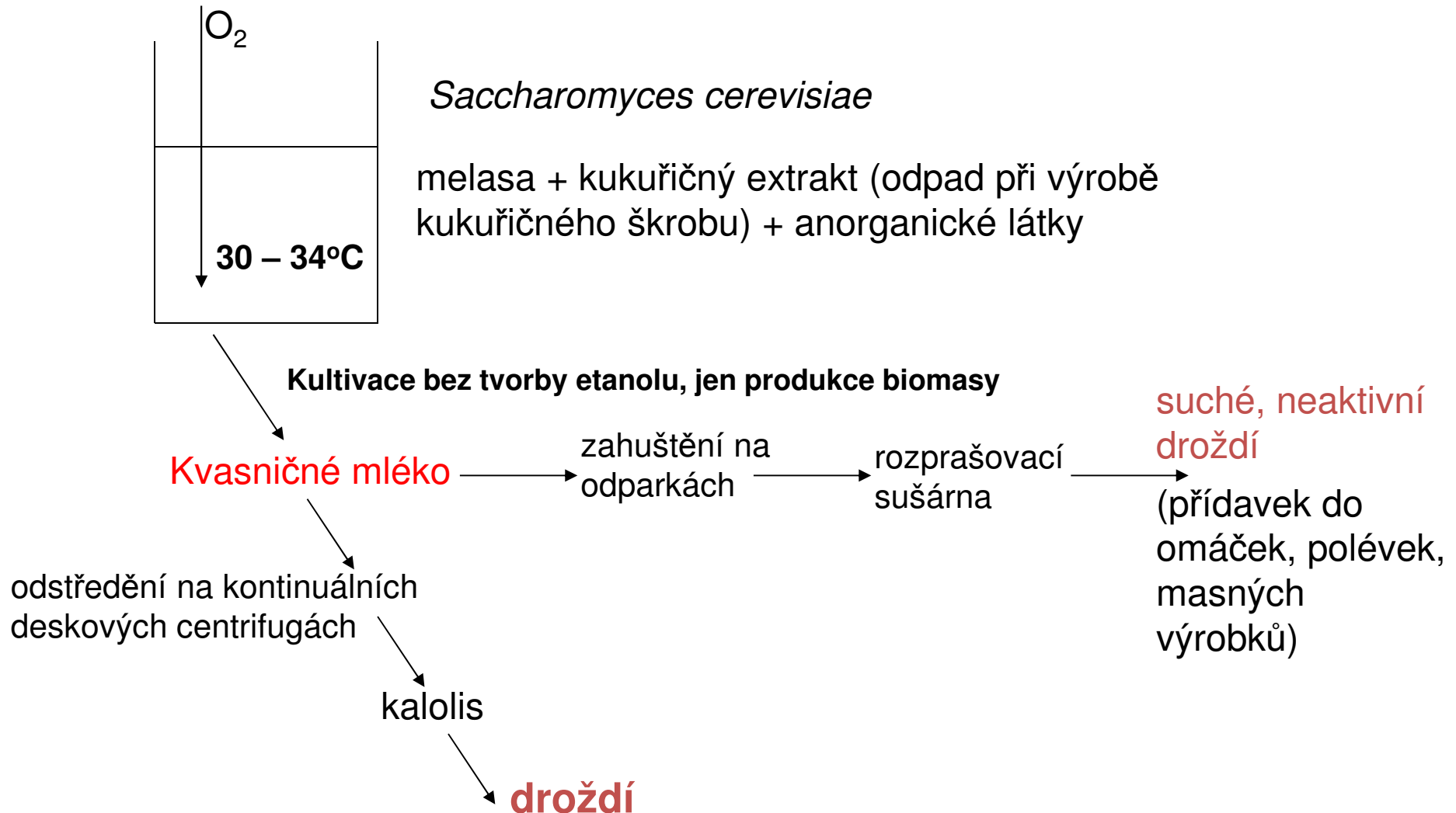
- *S. cerevisiae* - pro potravinářské účely sušení biomasy při vyšších teplotách → přísada do polévek, omáček, masných výrobků, ...
- pro krmivářské účely se využívá *Saccharomyces* ojedinele (většinou ke zkrmení nekvalitního droždí)
- využití i rodu *Candida* - produkce min. 50% bílkovin v sušině, menší nároky na výživu a tolerance medií s vyšším obsahem solí  
*Candida utilis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. robusta*, *C. scottii*, *C. ingens*, *C. crusei*, *C. mogii*, *C. boidinii* atd.
- vyjímečně i ostatní kvasinkovité mikroorganismy jako *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorfa*, *Hansenula capsulata*, "*Pichia pastoris*"
- SCP (bakterie, kvasinky) obsahuje 70-80% hm. čistých bílkovin

# SCP

- melasa – v současné době jen ve výjimečných případech
- lihovarské výpalky, sulfitové výluhy (po výrobě celulózy) nebo hydrolyzáty dřeva
- „citrolouhy“ (po výrobě kyseliny citrónové)
- syrovátka a další “odpady“ z potravinářské výroby, případně zemědělství
- n-alkany
- etanol, metanol – mohou být připraveny velmi čisté a získané SCP je nejvyšší kvality
- **mikrobní biomasa se vyznačuje vysokým obsahem nukleových kyselin (především RNA) v korelaci s obsahem bílkovin a pohybuje se v rozmezí 8-15% sušiny. Max. denní dávka pro člověka je 2 g nukleových kyselin, což odpovídá asi 20 g mikrobiální biomasy**

# Výroba potravinářské biomasy – SCP

## *S. cerevisiae*





# Kde získat informace?

- Saccharomyces Genome Database

- [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)

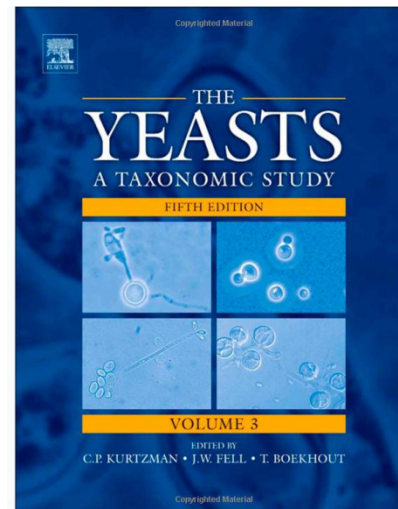


- Gene Ontology Consortium

- [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)

- genomové sekvence, ale i funkční informace o genech ve spojení s jejich aminokyselinovou sekvencí

- odborné knihy a články



# Kde získat kvasinky?

- **NCTC** National Collection of Type Cultures (UK)
- **NCIB** National Collection of Industrial Bacteria (UK)
- **DSMZ** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, (Německo)
- **CBS** Centraalbureau voor Schimmecultures (Holandsko)
- **CCM** Česká sbírka mikroorganismů (Brno)
- **RIBM** Výzkumný ústav pivovarský a sladařský (Praha)
- **CCDM** Sbírka mlékařských mikroorganismů
- **NCYC** National Collection of Yeast Cultures (UK)
- **TUM** Hefezentrum, Technische Universität München (Německo)
- nebo např. Pivní obchod OGAR Brno

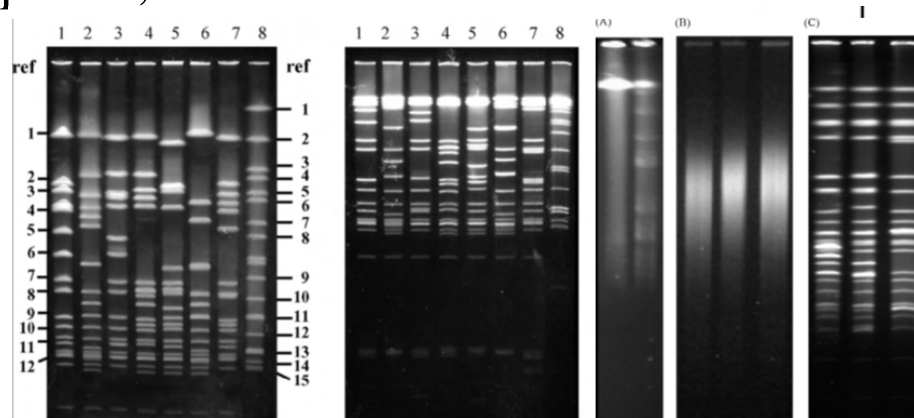


# Identifikace a rozlišení technologických kvasinek

- často velice problematické!!!
- produkční kmen x kontaminace
- tolerance k teplotám (30 x 37°C)
- mikroskopie, charakter růstu kolonií (pigment, selekční média)
- využití cukrů
- produkce nejrůznějších látek (diacetyl, pentadion, atd.)

# Identifikace a rozlišení technologických kvasinek

- provozní laboratoř analýzu DNA a PCR nedělá  
→ spolupráce s výzkumnými ústavami, univerzitami
- PCR a RFLP metody
  - ITS region, HIS4 gen, ...
- RFLP mtDNA
- Karyotypizace, MALDI-TOF



# Multiplex PCR

pro v současné době platné druhy rodu *Saccharomyces*

- druhově specifické primery (Muir et al., 2011, FEMS Yeast Res:552-563)

M – marker

1 – *S. cerevisiae*<sup>T</sup>

2 - *S. bayanus*<sup>T</sup>

3 - *S. arboricola*<sup>T</sup>

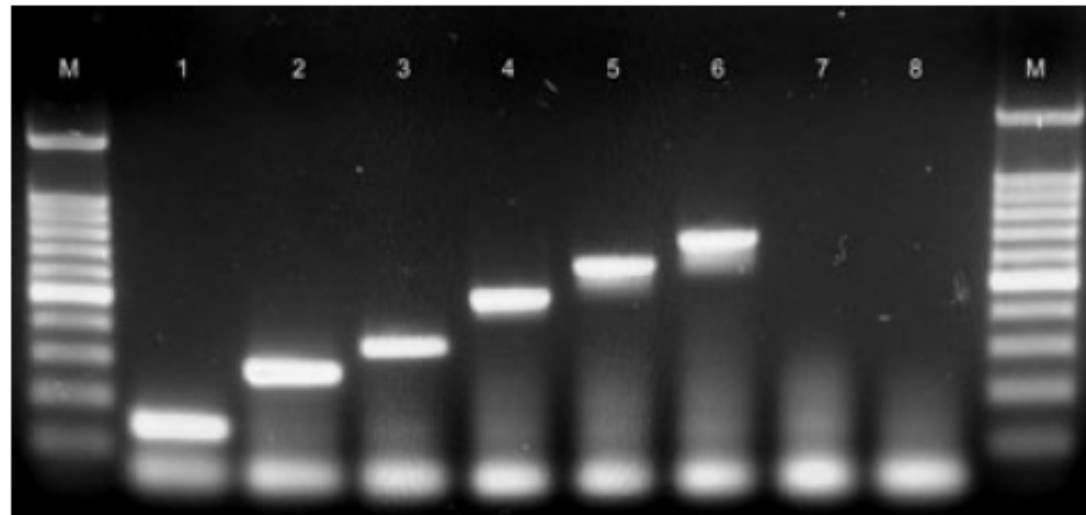
4 – *S. mikatae*<sup>T</sup>

5 - *S. kudriavzevii*<sup>T</sup>

6 - *S. paradoxus*<sup>T</sup>

7 - *S. pastorianus*<sup>T</sup>

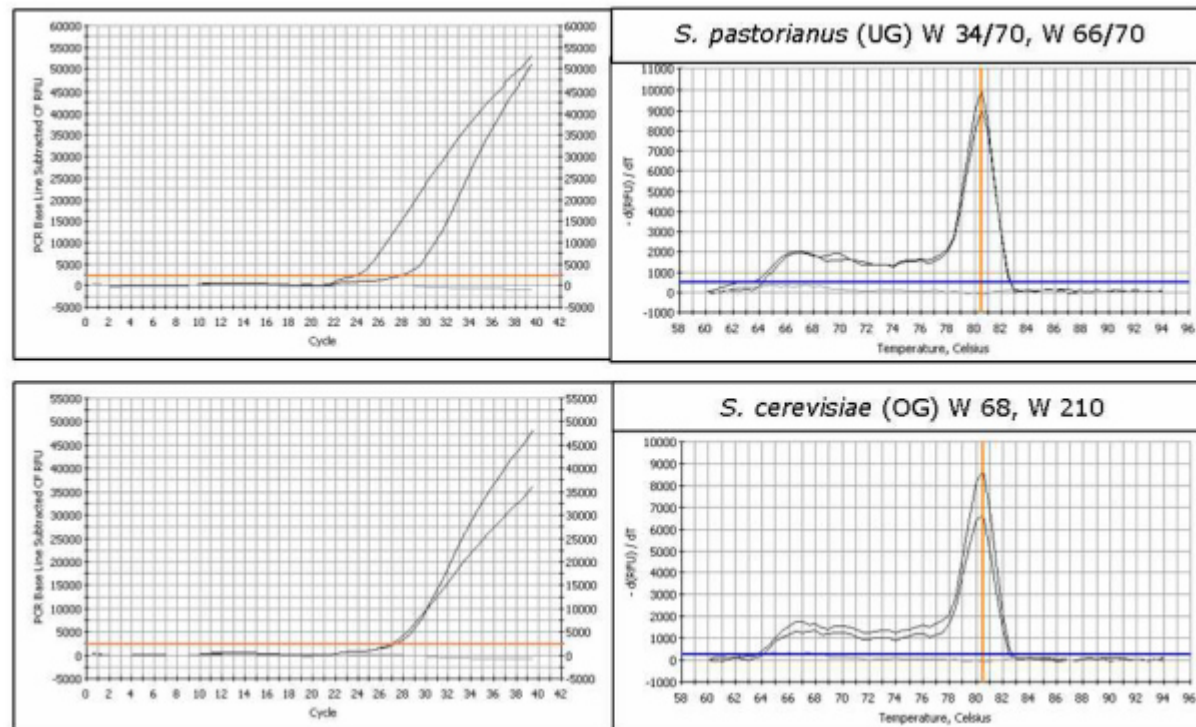
8 – negativní kontrola



*S. eubayanus*<sup>T</sup> (primery dle Pengelly a Wheals, 2013, FEMS Yeast Res:156-161)

# Real time PCR (Hutzler, 2010)

- systém pro rozlišení spodních a svrchních pivovarských kvasinek (UG LRE1; UG 300, OG; OG-Wein)
- identifikace spodních pivovarských kvasinek na základě úseku mtDNA



# Tabulka pro real-time PCR

Art	Stamm	PCR-System					
		Sc-GRC3	Sce	OG-COXII	Sbp	UG-LRE1	UG-300
<i>S. bayanus</i>	DSM 70412T, 70547, BTII K 1-C-3	-	-	-	+	-	-
	70411, 70508	-	-	-	+	+	+
<i>S. bayanus/pastorianus</i>	CBS 2440, 6017	-	-	-	+	+	+
<i>S. pastorianus</i>	CBS 1503, 1513, 1538, DSM 6580NT, 6581	-	-	-	+	+	+
<i>S. pastorianus</i> (UG)	W 26, 44, 34/70, 34/78, 44, 54, 59, 69, 84, 105, 109, 120, 128, 168, 172, 180, 194, 199, 206 (Bruchhefen) W 71, 144 (Staubhefen) CBS 1484, 5832, CBS 6903, NBRC 2003, BTII K B-I-4, B-J-4, B-J-5	+	+	-	+	+	+
	W 120 (Bruchhefe) W 66, 66/70, 204 (Staubhefen) CBS 5832, CBS 6903	+	+	-	+/-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70424, 70449T, 70451, CBS 1464, 8803, BT II K 3-A-1, 3-C-3, 3-G-1, 5-A-7, 6-I-1, 6-F-4	+	+	+	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (OG)	W 68, 127, 149, 175, 205, BTII K 5-A-8 (Weizenbier)	+	+	+	-	-	-
	W 148, 184, 208 (Altbier)	+	+	+	-	-	-
	W 165, 177 (Kölschbier)	+	+	+	-	-	-
	W 210, 211, 213 (Alebiere)	+	+	+	-	-	-
	W Bingen, Bordeaux, Eperney, Laureiro, Stein, Wädensvill (Wein)	+	+	+	-	-	-
	W B4 (Brennerei) W S2 (Sekt)	+	+	+	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	CBS 1782, DSM 70487, BTII K 1-B-8, 1-H-7, 2-A-7, K 2-F-1, 3-D-2, 3-H-2, 3-H-4	+	+	+	-	-	-
<i>S. cariocanus</i>	CBS 7995, 8841	-	+	-	-	-	-
	CBS 5313	+	+	+	-	-	-
<i>S. kudriavzevii</i>	CBS 8840	-	-	-	-	-	-
<i>S. mikatae</i>	CBS 8839	-	-	-	-	-	-
<i>S. paradoxus</i>	CBS 406, 432, 2908, 5829, 7400, 8436	-	+	-	-	-	-