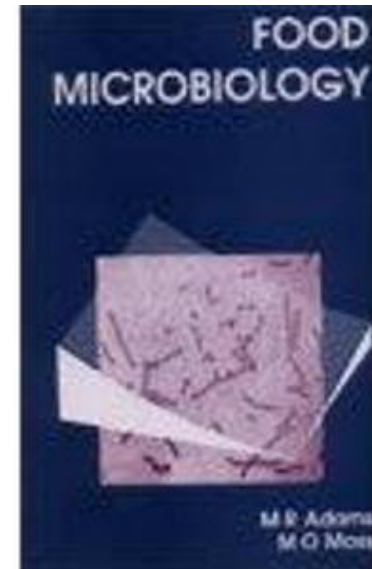
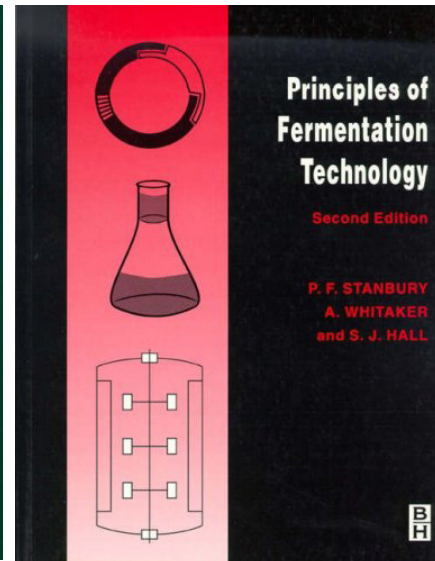
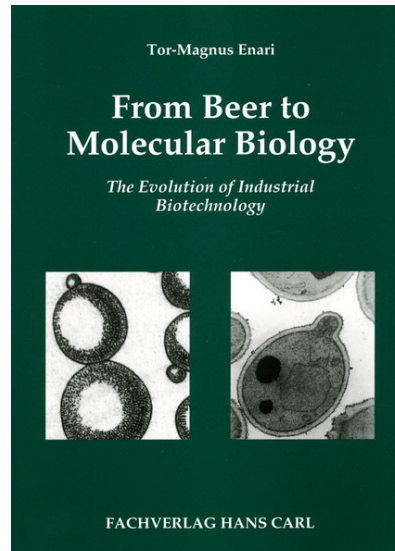
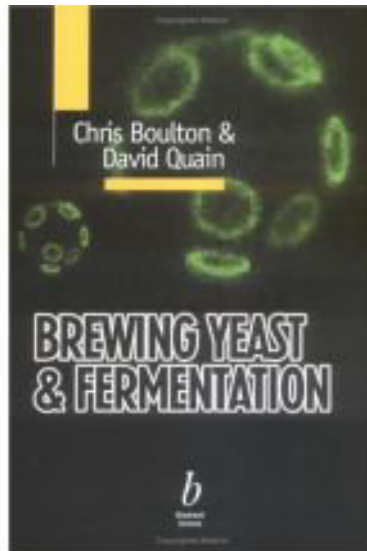
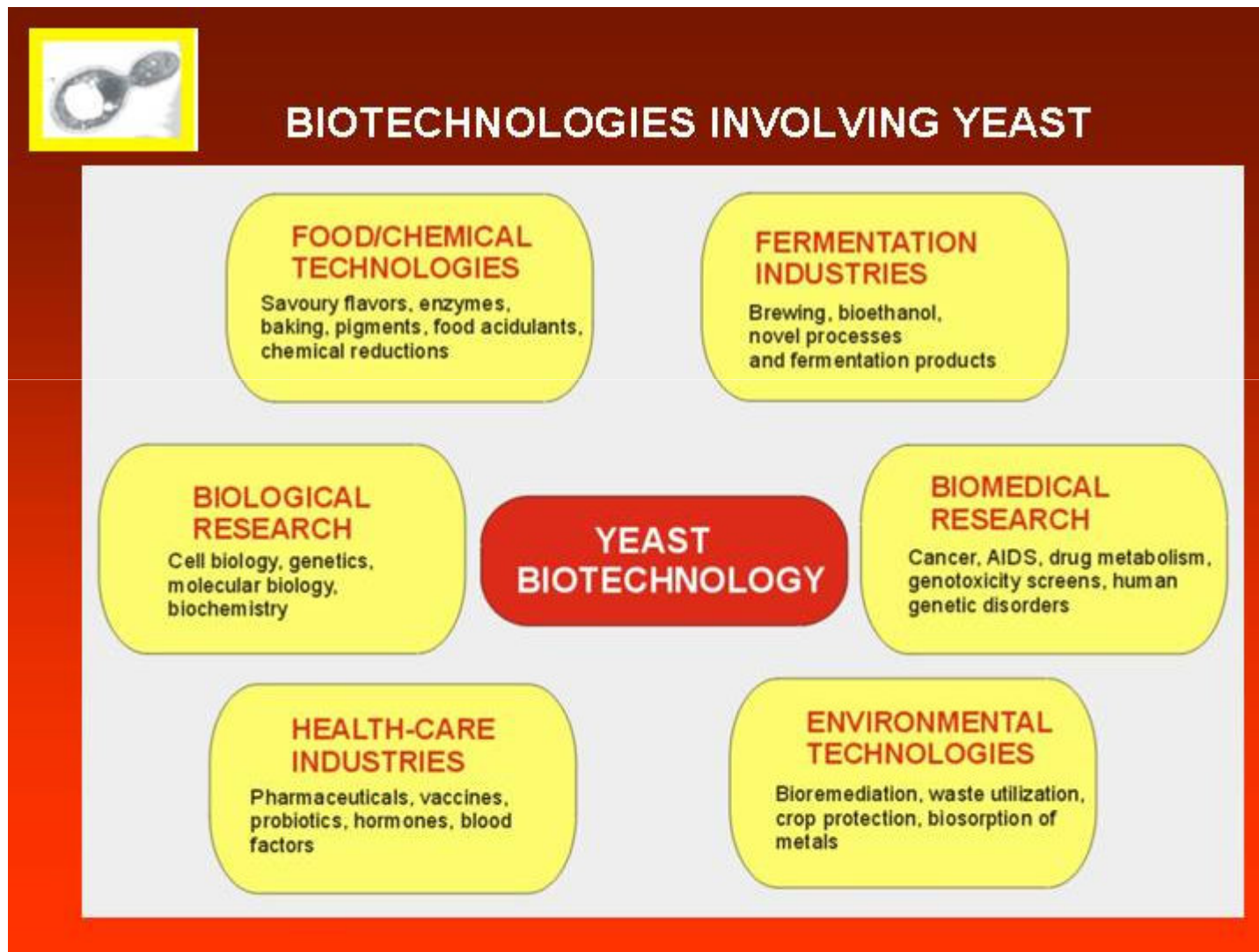


Kvasinky a biotechnologie

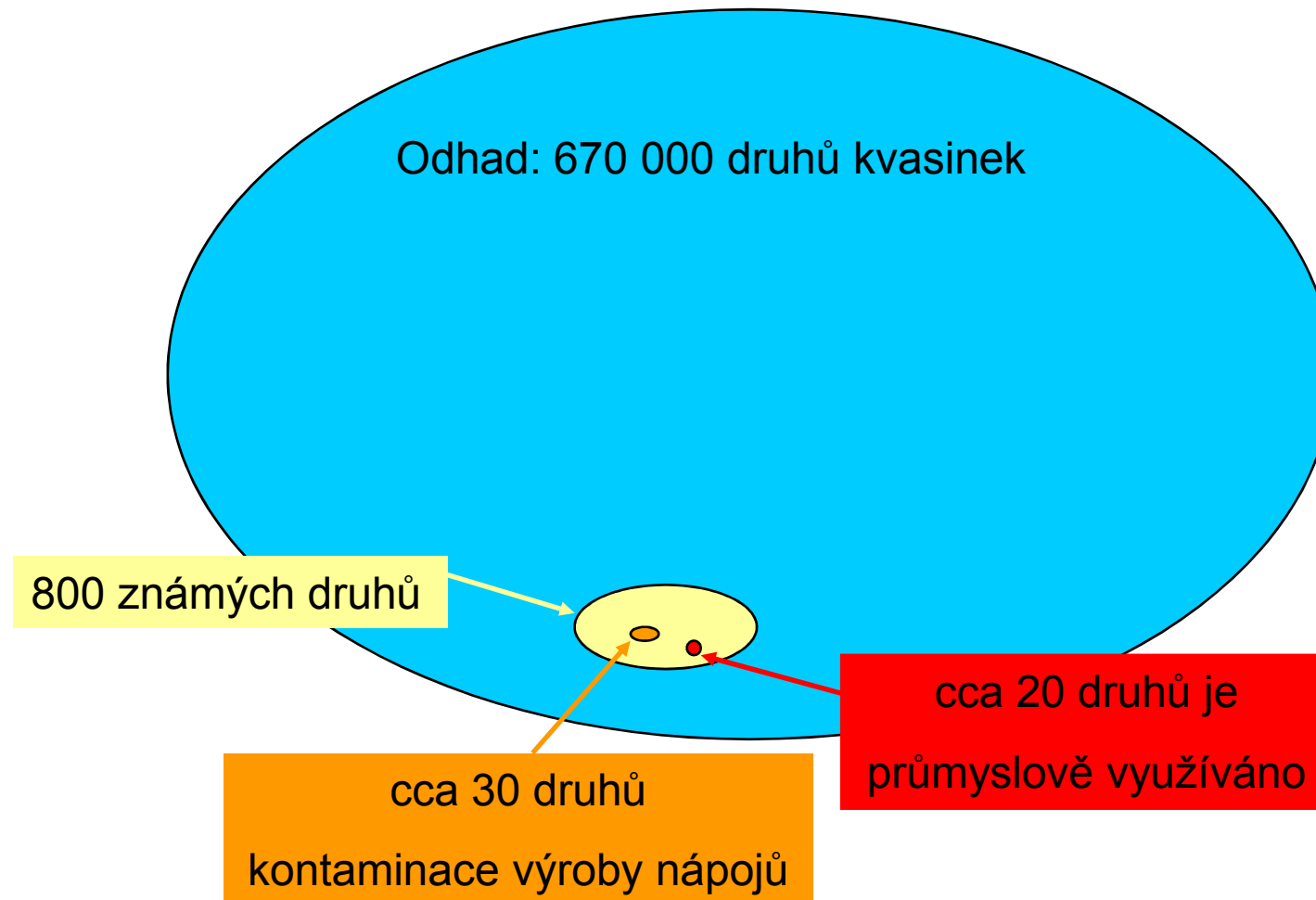
Jana Kopecká
223187@mail.muni.cz



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
- *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 *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*“

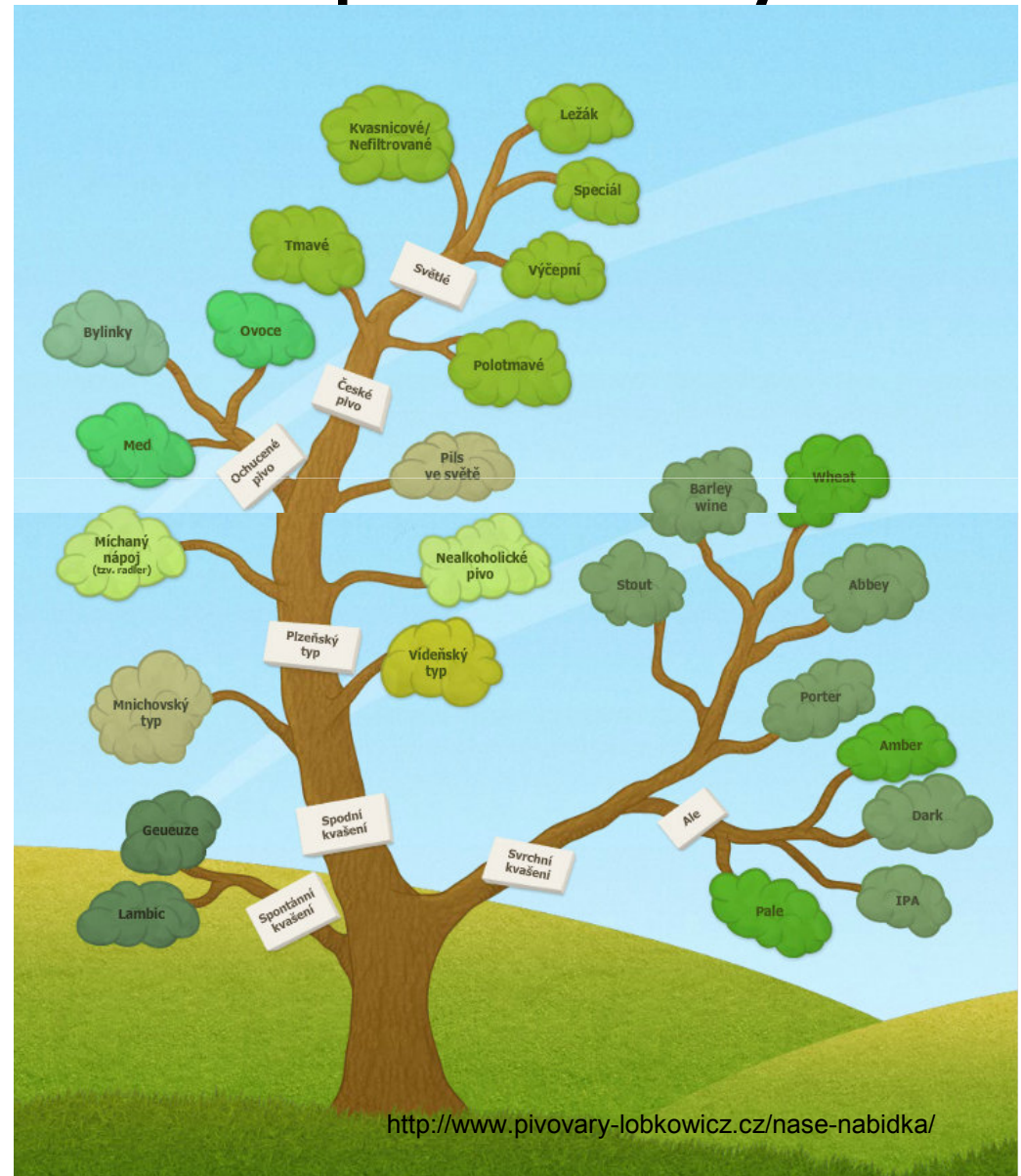
- 3-stupňový proces:
 - produkce biomasy (represe genové exprese) - glycerol
 - adaptační fáze - glycerol
 - produkční fáze – glycerol+metanol
- nutná optimalizace!!!
- sekretované i intracelulární proteiny
- velké denzity při kultivaci
- komerčně dostupný kit „*P. pastoris* Expression Kit“ (Invitrogen)

Klasické biotechnologie

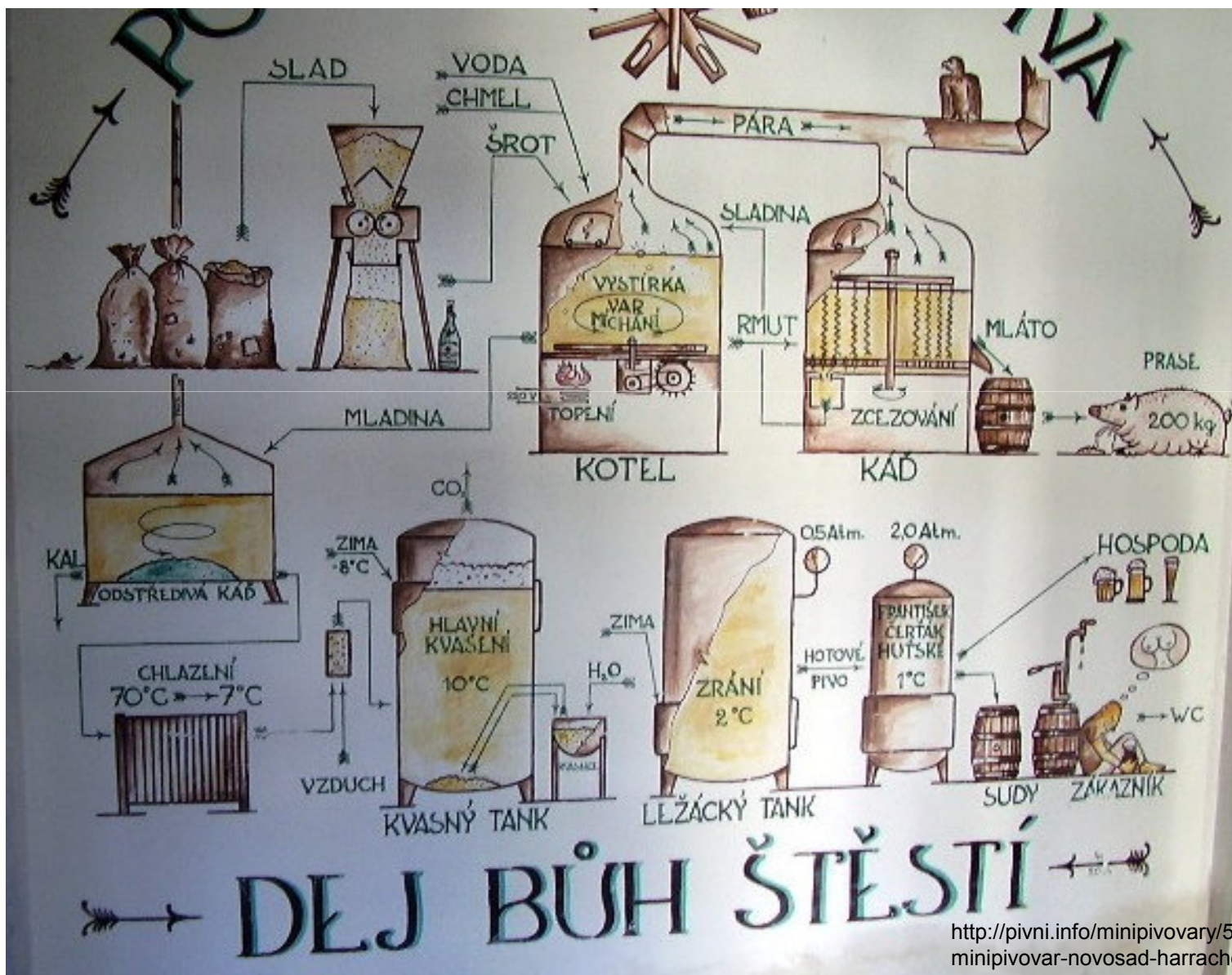
- výroba piva
- výroba vína
- výroba pečiva
- výroba lihovin
- SCP = single cell protein (krmná biomasa)
- využití převážně *S. cerevisiae*

Různé typy piv = různé podmínky

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



Český ležák

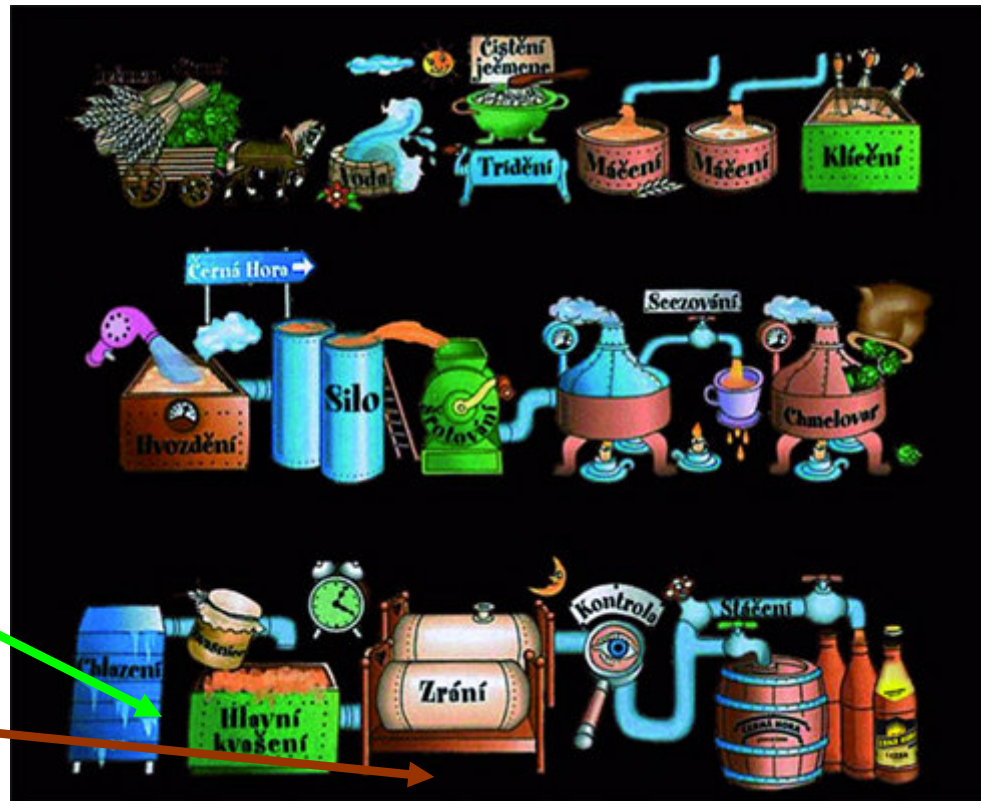


Fáze přípravy piva

- příprava mladina

- hlavní kvašení

- dokvážení



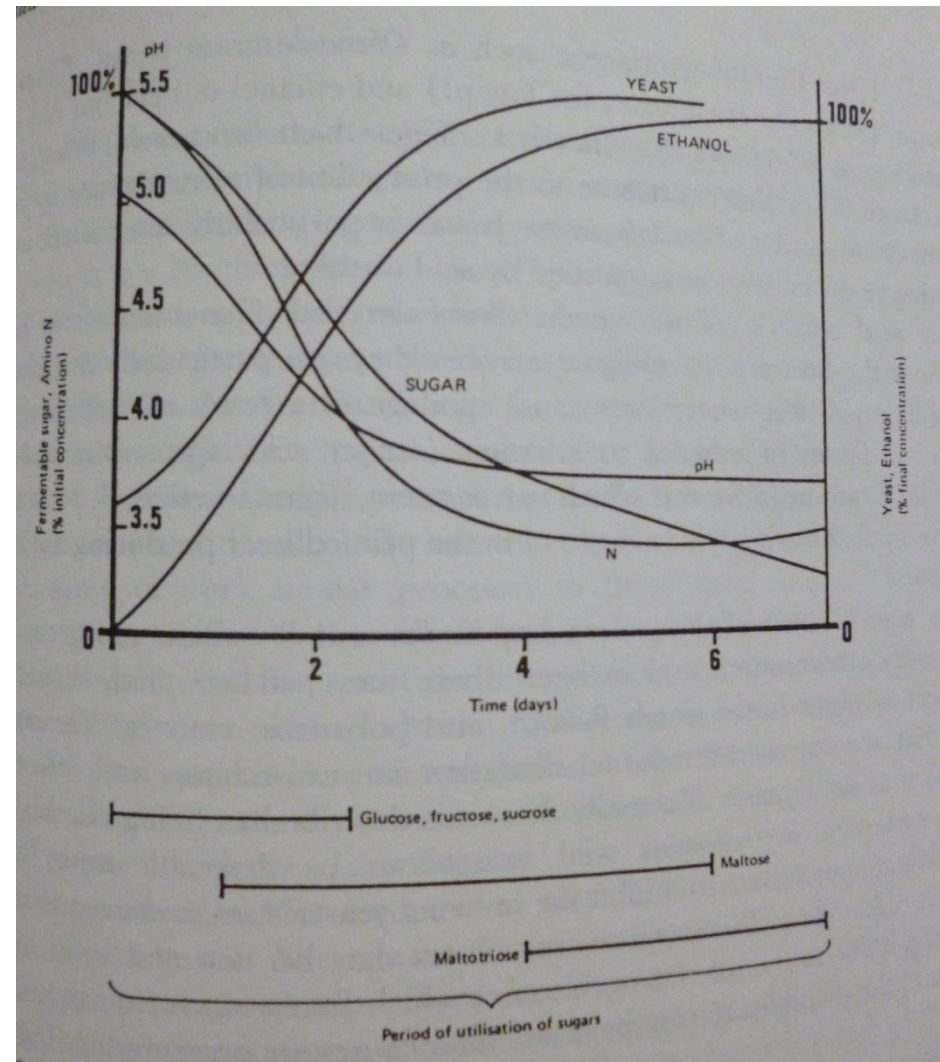
<http://www.pivovarcernahora.cz/pivovar-a-okoli/jak-varime-nase-pivo/>

Pivovarské kvasinky

- technologicky odlišné druhy
S. cerevisiae a *S. pastorianus*
- allopolyploidní, hybridní původ
 - průmyslový kmen *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70:
25 Mb, 2 subgenomy typ SC a SB, mt-genom typ SB,
36 chromozomů
 - laboratorní kmen *S. cerevisiae* S288c:
12 Mb, 16 chromozomů
- čistá kultura – vyrovnaný tvar (kulatý, oválný),
stabilní vlastnosti

Hlavní kvašení

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

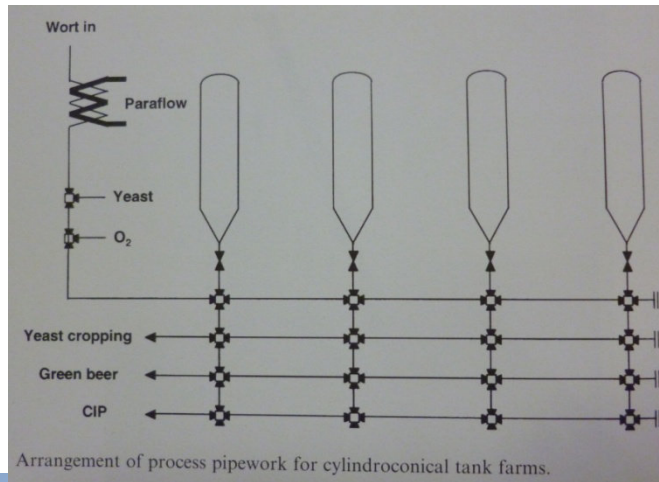


Hlavní kvašení – spilka



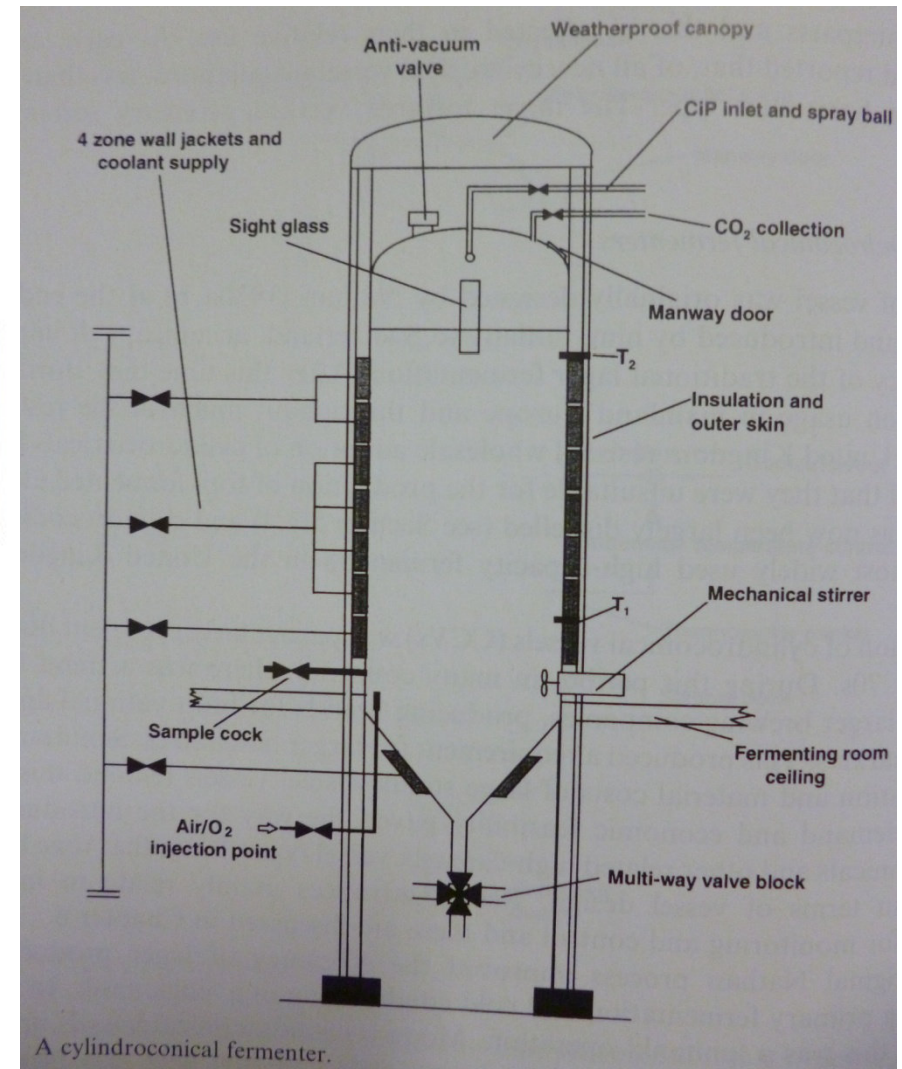
<http://www.protext.cz/english/zprava.php?id=11708>

Hlavní kvašení – CK tanky



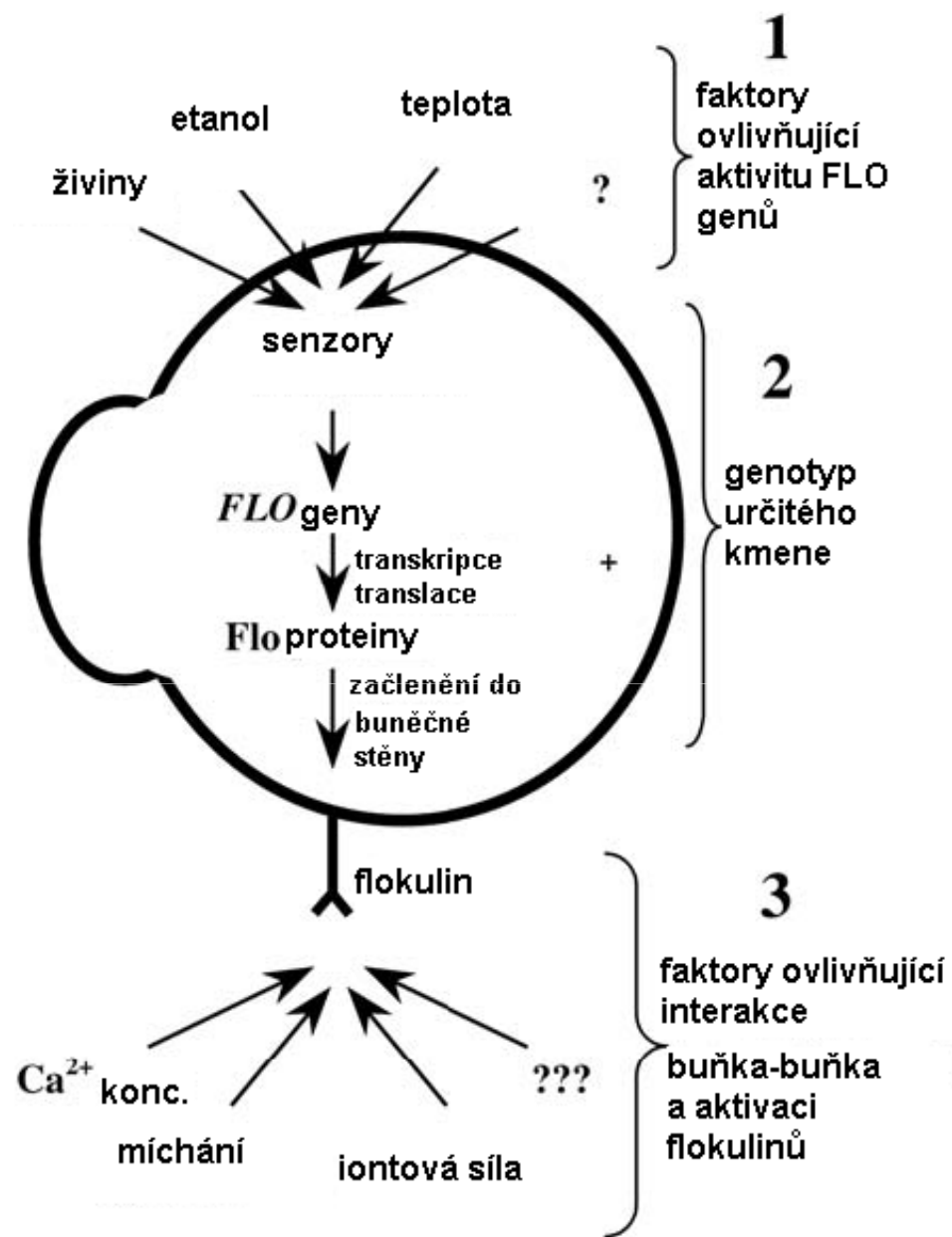
http://www.brewia.cz/index_4CZ.html

http://www.holidaycheck.cz/fullscreen-Pivovar+Velk%C3%A9+Popovice+CK+tanky-ch_ub-id_1159333861.html



Hlavní kvašení - flokulace

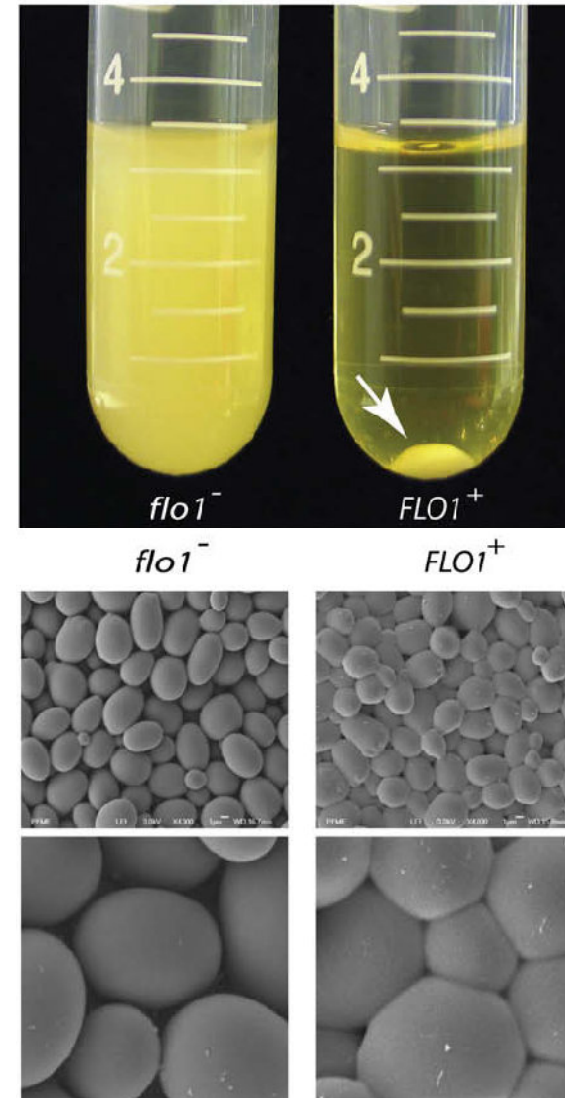
- reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se, tvořit větší celky (vločky, floky)
- !!na konci hlavního kvašení!!
- usnadňuje filtraci piva
- vliv složení média, genetické výbavy kmene (asi 33 genů), teploty, stavby a morfologie buňky...



(Verstrepen et al., 2003, upraveno)

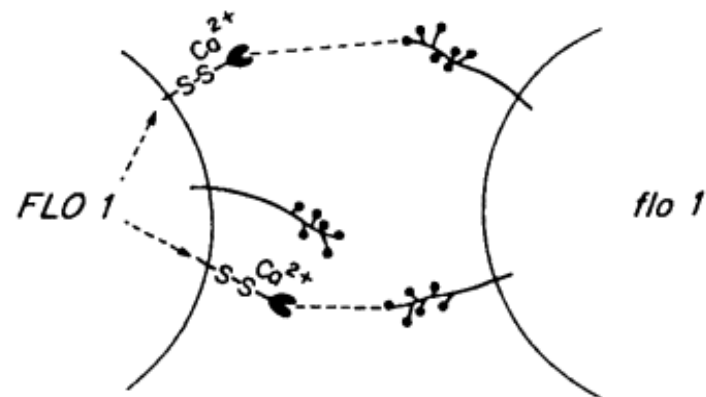
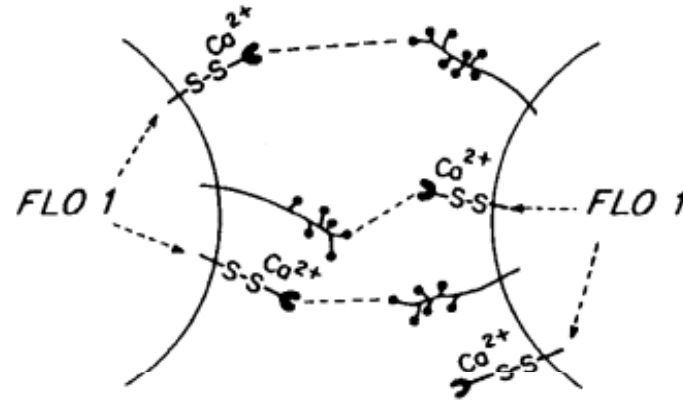
FLO geny

- 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
- Ca^{2+} udržují správnou konformaci zymolektinové vazebné sítě,
- !novější práce ionty Ca^{2+} jsou přímo zapojeny v uhlovodíkových vazbách

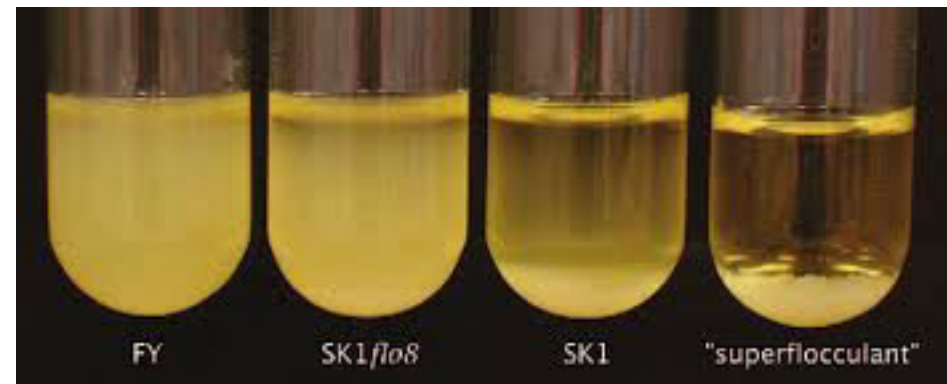


(Miki a kol., 1982, upraveno)

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)



Dokvášení

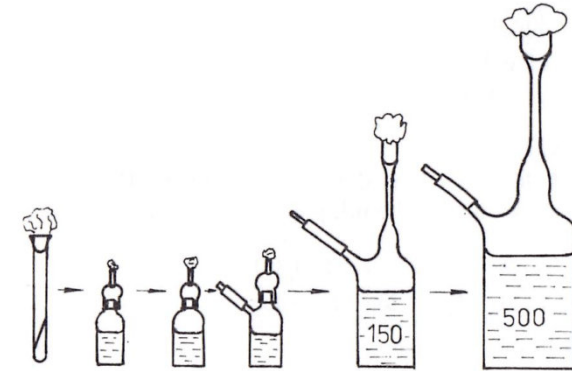
- dle stupňovitosti piva
- 3 a více týdnů za nízkých teplot ($0,5-4^{\circ}\text{C}$)
- sycení piva, dotváření chuti
- CK tanky nebo ležácké tanky
- autolýza kvasinek je **nežádoucí**



Propagace kvasnic



www.destila.cz



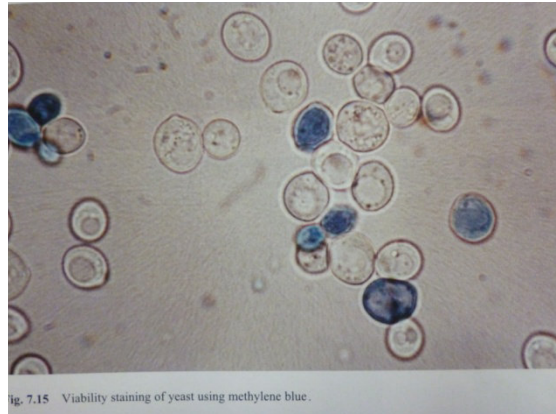
Obr. 16. Schéma propagace se sledem propagačních nádob
Kvasná mikrobiologie, Tvrdoh a Báležová, 1982



Pivovar Ježek

Kontrola kvasinek

- vitální barvení



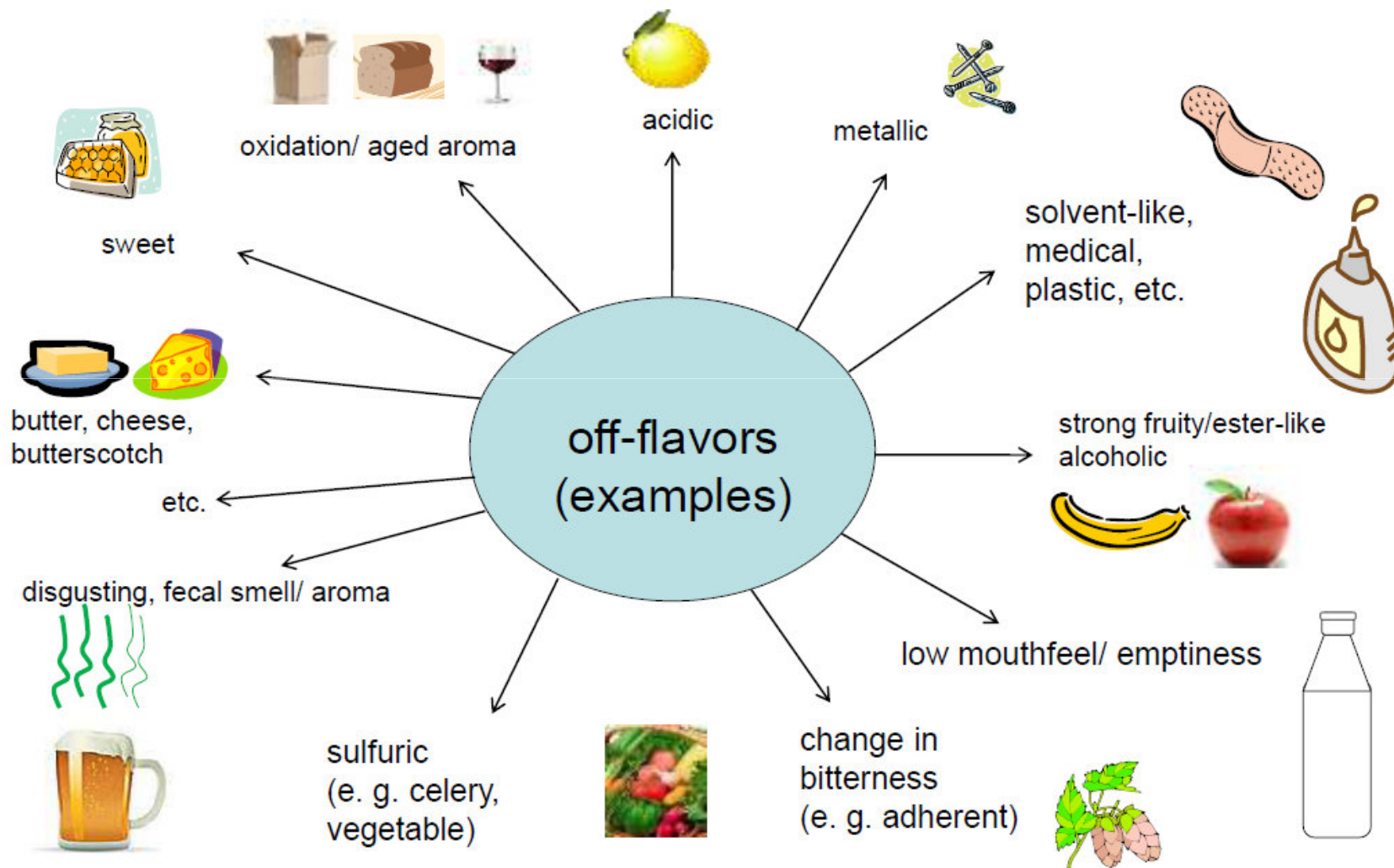
- acidifikační test



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

Mikrobiologická „čistota“



Vinařské kvasinky

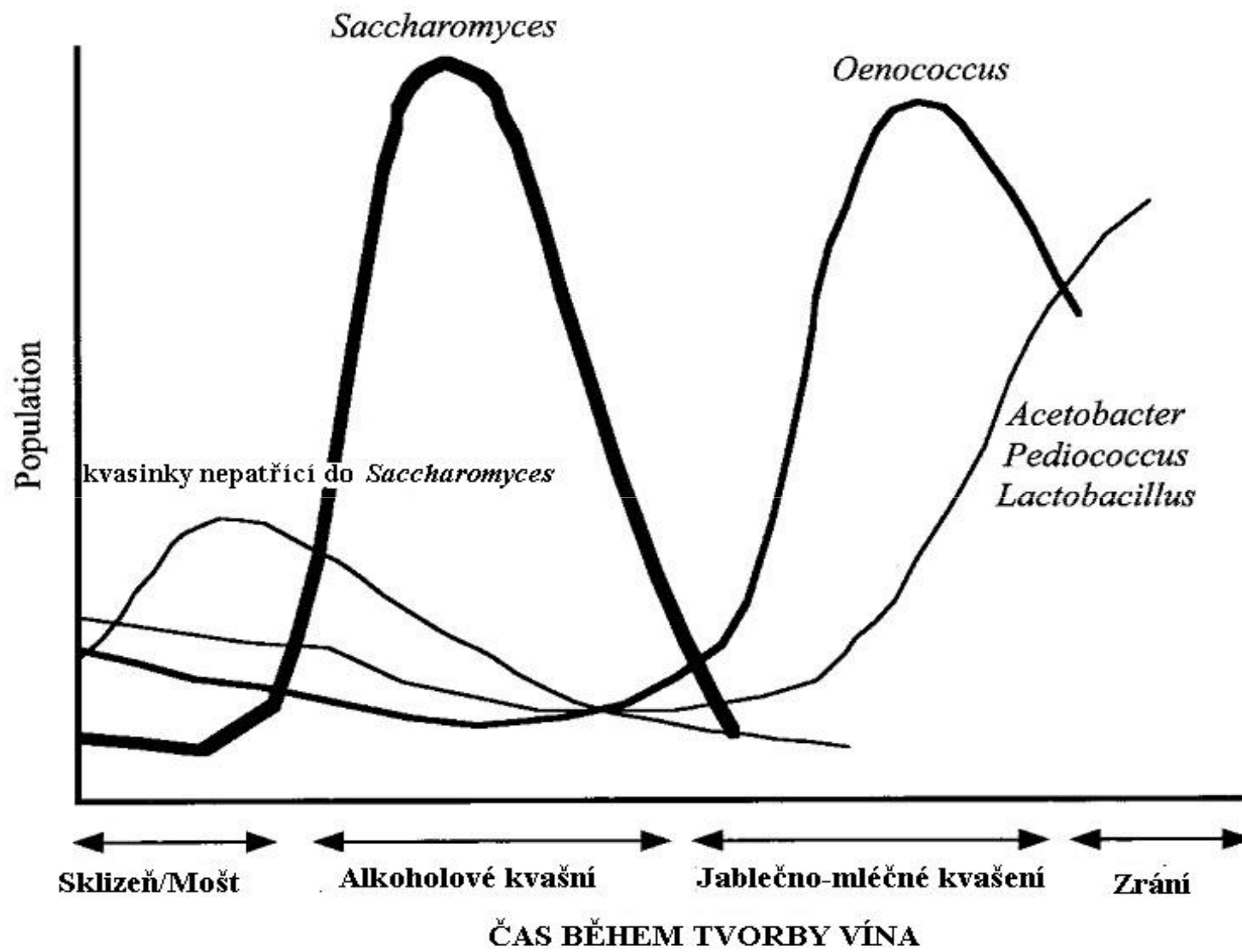
- „čisté kvašení“ kulturními kvasinkami
 - *S. cerevisiae*, *S. bayanus*
- „spontánní kvašení“
 - kvasinky z povrchu bobulí: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Metchnikowa*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotula*, *Cryptococcus*, *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*...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

Vinařské kvasinky

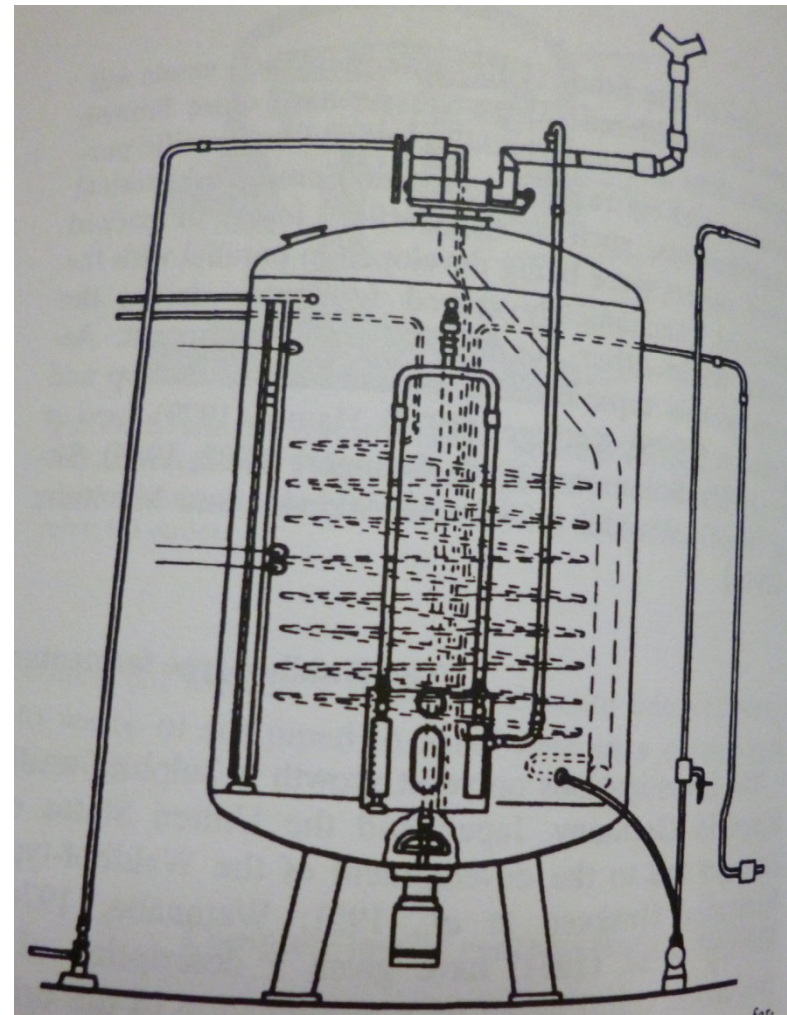
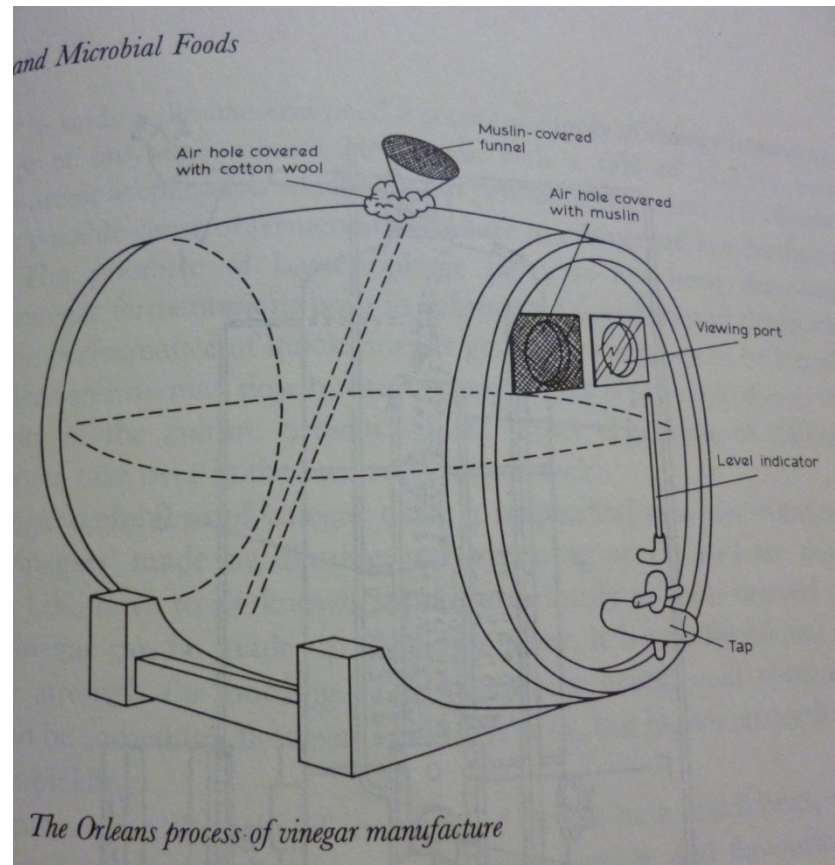
- tolerance k SO_2
- kvašení do 25°C po dobu 7-14 dnů
- autolýza kvasinek přispívá k buketu vína
- tolerance k alkoholu (11-14%)
- nízká koncentrace zbytkových cukrů (2-5 g/l)
- produkce žádoucích esterů
- nízká produkce těkavých kyselin

Vinařské kvasinky

- 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.)



Fermentace vína



Pekařské kvasinky

- stálost technologických vlastností
- aerobní metabolismus
- aglutinace a **autolýza je nežádoucí**

Lihovarské kvasinky

- melasové zápary
- vysoká tolerance k alkoholu a teplotě
- vysoká rychlost kvašení

SCP (Single Cell protein)

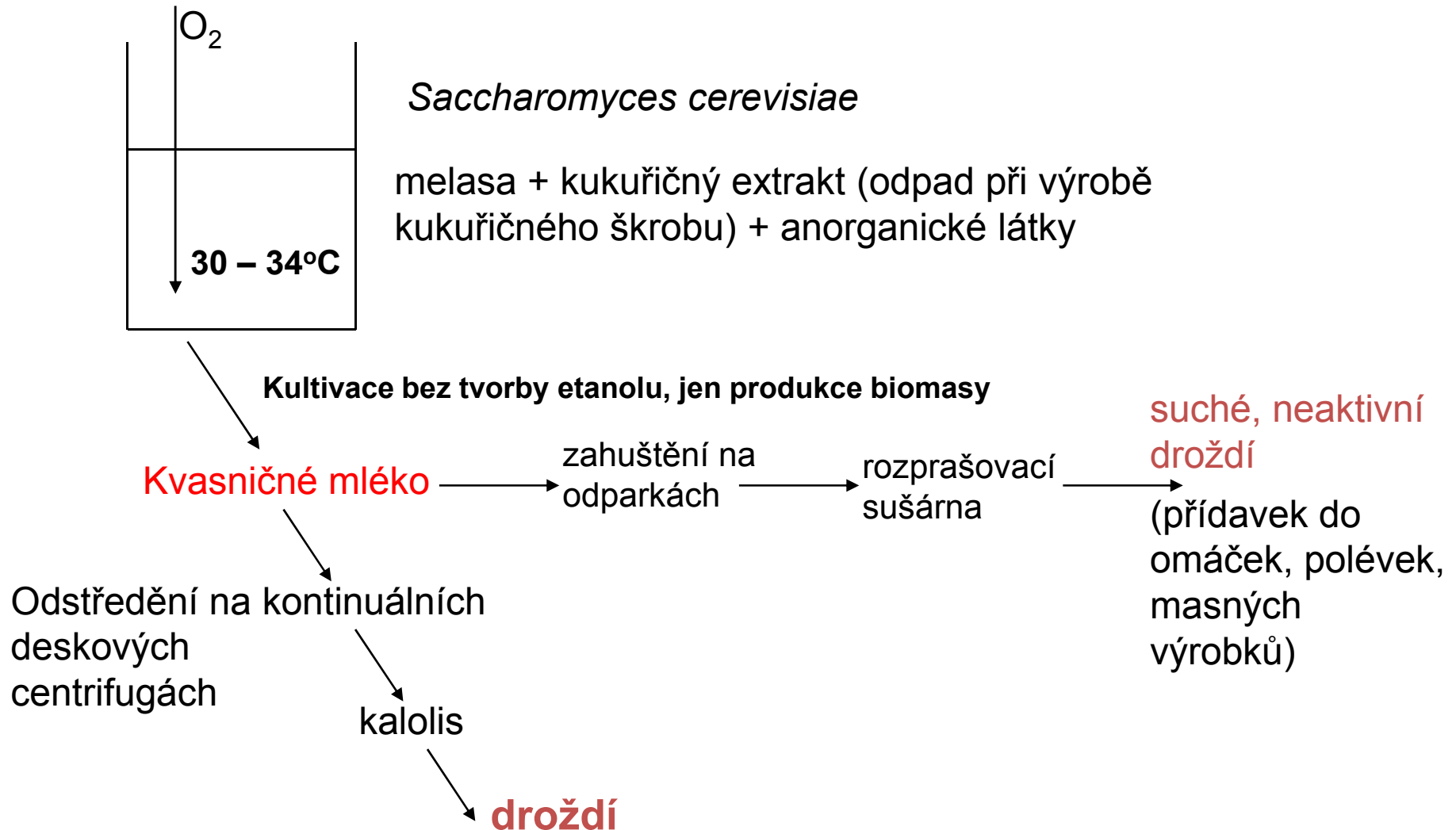
- *S. cerevisiae* - pro potravinářské účely sušení biomasy při vyšších teplotách → přísada do polévek, omáček, masných výrobků,...
- pro krmivářské účely se využívá *Saccharomyces* ojedinele (většinou ke zkrmení nekvalitního droždí)
- využití i rodu *Candida* - produkce min. 50% bílkovin v sušině, menší 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.
- Vyjíměčně i ostatní kvasinkovité mikroorganismy jako *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorfa*, *Hansenula capsulata*, "*Pichia pastoris*"

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
- SCP (bakterie, kvasinky) obsahuje 70-80% hm. čistých bílkovin
- mikrobiální biomasa se vyznačuje vysokým obsahem nukleových kyselin (především RNA). Jejich obsah je 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

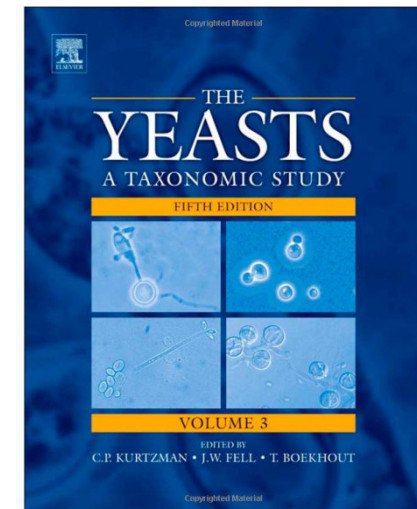


- Gene Ontology Consortium

- 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 Sběrka mlékařských mikroorganismů

- NCYC National Collection of Yeast Cultures (UK)



- Pivní obchod OGAR Brno

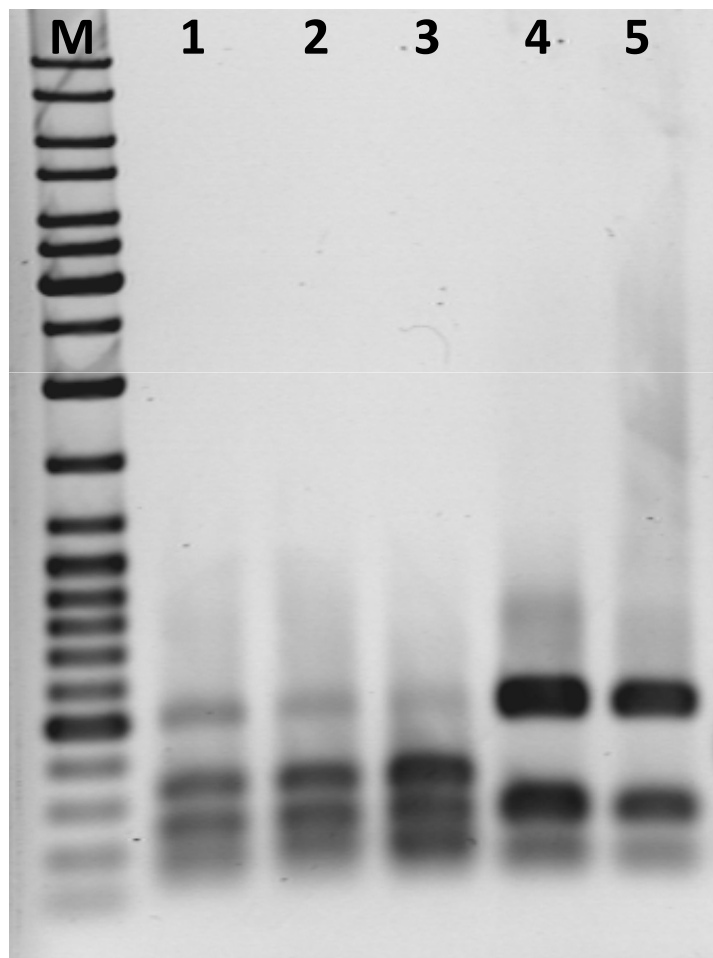
Identifikace a rozlišení kvasinek

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

Identifikace a rozlišení kvasinek

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

Štěpení ITS oblast



M – marker

1 – *S. pastorianus* RIBM 95

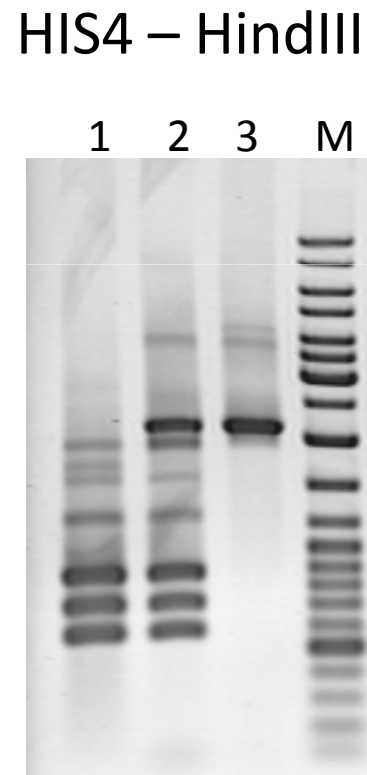
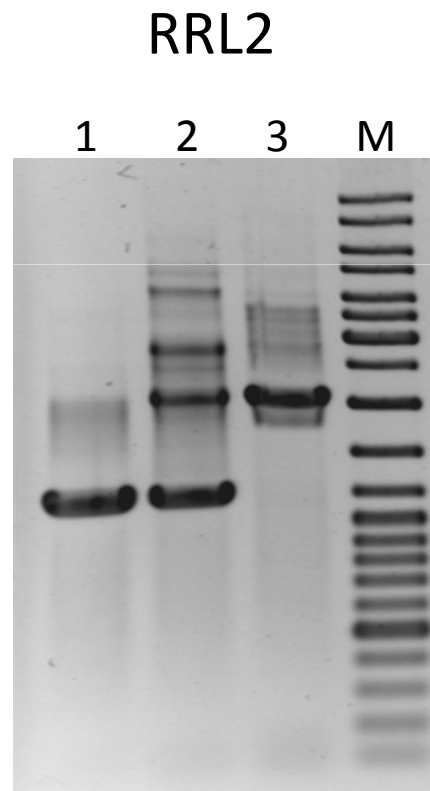
2 - *S. cerevisiae* RIBM 139

3 - *S. cerevisiae* DSM 70449^T

4 – *S. pastorianus* DSM 6580^T

5 - *S. bayanus* DSM 70412^T

Region RRL2, gen HIS4



M – marker

1 - *S. cerevisiae* DSM 70449^T

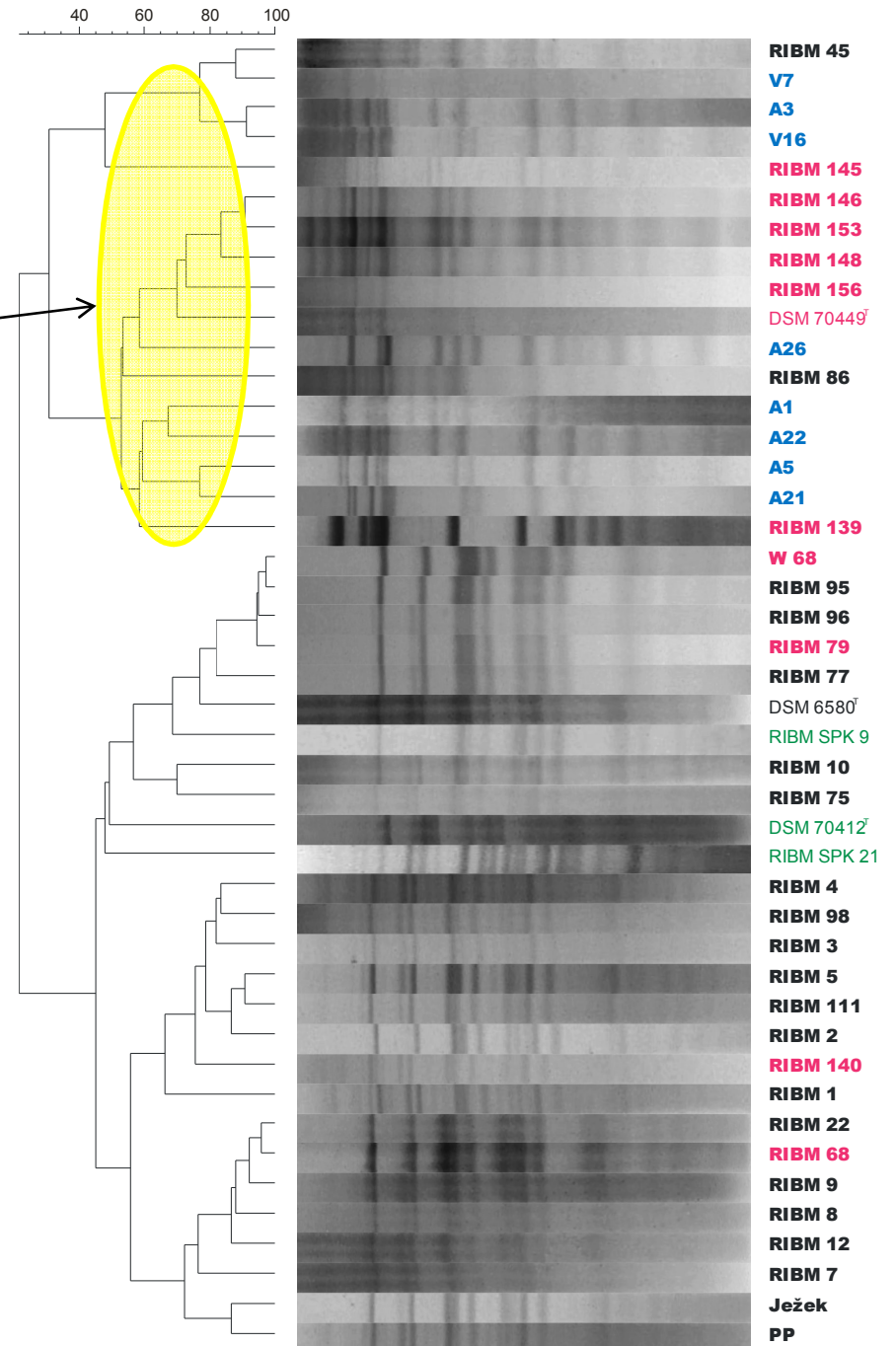
2 – *S. pastorianus* DSM 6580^T

3 - *S. bayanus* DSM 70412^T

mtDNA - RsaI

- svrchní kmeny
a vinařské kvasinky

S. pastorianus - bottom fermenting
S. cerevisiae - top fermenting
S. cerevisiae - wine
S. bayanus



RAPD

- svrchní a vlnářské kmény kvasinek
- *Lachancea kluyveri* „*S. kluyveri*“
- *S. bayanus*

S. pastorianus - bottom fermenting
S. cerevisiae - top fermenting
S. cerevisiae - wine
S. bayanus

