

REVIEW

Kmene pre kvasenie vysokoextraktívnych mladín

JAROSLAVA PÁTKOVÁ, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, ZOLTÁN DÖMÉNY, PETRA BAFRNCOVÁ

*Slovak Technical University – Faculty of Chemical Technology, Department of Biochemical Technology,
Bratislava, Slovak Republic*

Abstract

PÁTKOVÁ J., ŠMOGROVIČOVÁ D., DÖMÉNY Z., BAFRNCOVÁ P. (2000): **Strains for fermentation of high gravity worts.** Czech J. Food Sci., 18: 75–80.

The paper deals with isolation and construction of new strains usable for fermentation of high gravity worts. These worts cause stress for yeasts, and influence their metabolism and fermentation activity. It is reflected in fermentation speed and beer quality. Brewers' yeast with *STA2* genome for production of extracellular glucoamylase was obtained by gene manipulations, which is also used in industrial production. Operational experiments were successfully conducted with new strains of yeasts with these characteristics: ethanol-tolerant, osmotolerant, not glucose-repressed, higher flocculation capacity, ability to degrade turbidity-forming substances, influenced production of flavoring substances, but their larger-scale use is prevented by legislation.

Key words: brewers' yeasts; gene manipulations; HG; VHG; stress

Súhrn

PÁTKOVÁ J., ŠMOGROVIČOVÁ D., DÖMÉNY Z., BAFRNCOVÁ P. (2000): **Kmene pre kvasenie vysokoextraktívnych mladín.** Czech J. Food Sci., 18: 75–80.

Práca sa zaoberá možnosťami izolácie a konštrukcie nových kmeňov vhodných pre kvasenie vysokoextraktívnych mladín. Tieto mladiny sú stresovým prostredím pre kvasinky a tak ovplyvňujú ich metabolizmus a fermentačnú aktivitu, čo sa prejaví na rýchlosti fermentácie aj kvalite výsledného piva. Metódou génových manipulácií bola získaná pivovarská kvasinka so *STA2* génom na produkciu extracelulárnej glukoamylázy, ktorá je využívaná už aj v priemyselnej výrobe. Úspešné boli aj prevádzkové pokusy s novými kmeňmi kvasiniek vyznačujúcimi sa zvýšenou etanoltoleranciou, osmotoleranciou, nereprimovateľné glukózou, s vyššou flokulačnou schopnosťou, degradujúce zákalotvorné látky, popriprade s ovplyvnenou produkciou aromatických a chuťových látok, ich rozšíreniu však bránia legislatívne zákony.

Kľúčové slová: pivovarské kvasinky; génové manipulácie; HG; VHG; stres

Najnovšie vývojové trendy, ktoré vychádzajú predovšetkým z potreby znižovania nákladov na výrobné procesy, prenikajú aj do takých klasických biotechnológií, akou je aj výroba piva. Jednou z najväčších inovácií v procese výroby piva je kvasenie vysokoextraktívnych mladín (označované ako high-gravity, HG, HGB a very-high-gravity, VHGB), ktoré obsahujú viac ako 13 % hm. extraktu (THOMAS *et al.* 1996).

Kvasenie takýchto mladín vyžaduje použitie nových kmeňov, pretože kvasinky sú počas kvasenia vystavené extrémnym podmienkam – vysokej koncentrácii sachari-

dov, ktorá spôsobuje zvýšený osmotický tlak, zvýšenej koncentrácii nafermentovaného etanolu, nedostatku živín ako sú rozpustený kyslík a asimilovateľný dusík, zvýšenej viskozite prostredia a s tým spojenej zvýšenej koncentrácii rozpusteného oxidu uhličitého. Všetky tieto faktory ovplyvňujú aj vitalitu a fermentačnú aktivitu kvasiniek, a tak aj kvalitu finálneho výrobku.

Spôsoby získavania nových kmeňov

Existujú rôzne metódy získavania nových kmeňov pre laboratórne kmene, avšak ich aplikácia na priemyselné

kmene je spojená s mnohými problémami. Priemyselne používané kmene pivovarských kvasiniek ťažko sporulujú. Ak sporulujú, tak tvoria tetrády, ale väčšina ich spór je nevitálna. Zatiaľ čo laboratórne kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sú haploidné alebo diploidné, bežne v priemysle používané kvasinky sú polyploidné alebo aneuploidné, čo síce zvyšuje ich stabilitu, ale na druhej strane sťažuje možnosť génovej manipulácie a znižuje prejav náhodných, ako aj indukovaných mutácií (HAMMOND 1995).

Mnohé z vlastností, ktoré sú vyžadované pre nové kmene pri kvasení vysokoextraktívnych mladín, nie je možné presne geneticky definovať, a preto jednou z metód získavania nových kmeňov zostáva izolácia a selekcia kmeňov z prostredia s nepriaznivými alebo extrémnymi podmienkami, alebo priamo z rôznych častí technologických zariadení. Najčastejšie to býva pre získanie takých komplexných vlastností, ako je zvýšená osmo- a etanoltolerancia.

Určité špecifické vlastnosti sú však už presne geneticky definované, a tak sa naskytá možnosť konštrukcie nových kmeňov pivovarských kvasiniek prípravou kmeňa s vopred presne stanovenými vlastnosťami pomocou génových manipulácií – fúziou protoplastov alebo transformáciou buniek technikou rekombinantnej DNA (HAMMOND 1995; ŠÍPICKÝ & ŠUBÍK 1992; TUBB & HAMMOND 1987). Pri fúzii protoplastov bola veľkým problémom vhodná metóda na selekciu vytvoreného hybridu. Táto sa však odstránila aplikovaním prietokovej cytometrie, a tak bola umožnená rýchla selekcia hybridov (BELL *et al.* 1998). Pri použití techniky rekombinantnej DNA na konštrukciu kmeňov s novými vlastnosťami je potrebné, aby vnesené gény boli konštitutívne exprimované s dostatočným počtom kópií a zároveň je potrebná vhodná metóda na jednoduchú selekciu transformovaných kmeňov. Tieto problémy boli vyriešené súčasne, integráciou požadovaných génov do plazmidov rezistentných na med' (HENDERSON *et al.* 1985), geneticín (JIMENEZ & DAVIES 1980) alebo herbicíd metylsulfometurón (CASEY *et al.* 1988). V bunkách sú tieto plazmidy zastúpené v počte 120 až 150 kópií, čo zabezpečí dostatočné množstvo produktov génov, a získanie rezistencie umožní rýchlu a jednoduchú selekciu transformovaných buniek.

Špeciálnym problémom transformácie pivovarských kvasiniek je nájdenie vhodného donora génu, ktorého produkt (najčastejšie extracelulárny enzým) musí spĺňať určité požiadavky: vykazovať aktivitu v rozmedzí pH 4–5,5, ako aj aktivitu pri fermentačnej teplote mladín 10–20 °C, rezistenciu pred inhibítormi prítomnými v mladine; rezistenciu k etanolu akumulovanému počas fermentácie mladiny; špecifickosť reakcií, neschopnosť inaktivovať ostatné extracelulárne enzýmy, inaktiváciu pri pasterizácii hotového piva a schopnosť uskutočniť požadované funkcie bez ovplyvnenia stability peny alebo organoleptických vlastností piva.

Používanie génovo manipulovaných mikroorganizmov je však v niektorých krajinách obmedzené zákonmi. Legislatívny rámec pre používanie génovo modifikovaných

organizmov je obsiahnutý v Smernici EÚ č. 90/219/EEC, ktorá obmedzuje využitie génovo modifikovaných organizmov pre potravinárske účely, a v Smernici EÚ č. 90/220/EEC o úmyselnom uvoľnení génovo modifikovaných organizmov do životného prostredia. Európska komisia schválila k Smernici EÚ 90/220 dodatok (Novel Food Regulation 258/97/EEC), v ktorom je požiadavka povinného označovania všetkých surovín, ktoré boli génovo manipulované. Tieto regulácie sú odpoveďou na požiadavky konzumentov na riziká génovo modifikovaných mikroorganizmov pre človeka a prostredie. V Slovenskej republike zatiaľ neexistuje zákon na obmedzenie používania génovo modifikovaných mikroorganizmov, ani na povinné označovanie výrobkov, kde takéto mikroorganizmy boli použité.

Kmene so zvýšenou osmotoleranciou

VHG mladiny obsahujú zvýšenú koncentráciu extraktov, z ktorých až 85 % tvoria sacharidy. Zvýšenie koncentrácie substrátu všeobecne vedie k zvýšenej metabolickej aktivite kvasiniek, avšak pri veľmi vysokých koncentráciách sa zvyšuje účinok osmotického tlaku na bunky, výsledkom čoho je zníženie rýchlosti rastu kvasiniek a ich fermentačnej aktivity (HARALDSON & BJÖRLING 1981).

Doteraz najpoužíwanejšou metódou na získanie kmeňov so zvýšenou osmotoleranciou je skríningová metóda, ktorá je aplikovaná na kvasinky vyizolované z prostredia s vysokou koncentráciou sacharidov (HARALDSON & BJÖRLING 1981) alebo chloridu sodného (SHARMA 1997).

Na prekonanie inhibičného efektu vysokej koncentrácie sacharidov, ako aj citlivosti na akumuláciu etanolu, bola použitá aj metóda hybridizácie. Bol vytvorený hybrid medzi vysoko fermentujúcou kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* a osmotolerantnou kvasinkou *Saccharomyces melis*. Skonštruovaný kmeň vykázal malé rozdiely vo fermentačnej rýchlosti pri nízkej koncentrácii sacharidov (4 % hm. glukózy) v porovnaní s rodičovským kmeňom. Pri koncentrácii sacharidov 35 % hm. bol však hybridný kmeň omnoho lepší, naprodukoval až 13,6 % hm. etanolu v porovnaní s 9 % hm. etanolu, ktorý naprodukoval rodičovský *Saccharomyces cerevisiae* (LEGMANN & MARGALITH 1986). Vyššiu osmo- a etanoltoleranciu ako rodičovské kmene vykázal aj fuzant kvasiniek *Saccharomyces uvarum* a *Saccharomyces diastaticus*, avšak inhibícia produkcie etanolu sa pri vyšších koncentráciách glukózy ešte stále prejavovala (D'AMORE *et al.* 1990).

Najnovšie výskumy zaoberajúce sa odpoveďou kvasiniek na osmotický stres umožňujú použitie techniky rekombinantnej DNA aj pri získavaní osmotolerantného kmeňa. Génovou manipuláciou regulačnej dráhy trehalózy, ktorá je považovaná za osmoprotektant v bunkách kvasiniek, bol získaný mutant vysokorezistentný na osmotický stres, ktorý vykázal zlepšenú fermentačnú aktivitu v podmienkach vysokokoncentrovaných substrátov (THEVELEIN 1998).

Podľa hypotézy krížovej ochrany získanie tolerance k rôznym typom stresu môže byť dosiahnuté aj počas vy-

stavenia buniek inému typu stresu. Tak sa podarilo získať osmotolerantný kmeň po vystavení kmeňa napríklad krátkodobému teplotnému šoku (SHARMA 1997).

Kmene so zvýšenou etanoltoleranciou

Dôležitou vlastnosťou kmeňov kvasiniek pri kvasení vysokoextraktívnych mladín je aj etanoltolerancia. Doteraz sa predpokladalo, že pivovarské kvasinky sú schopné tolerovať iba 7–9 % obj. etanolu, množstvo dosahované pri kvasení 16–20 % hm. mladín. Vhodným prídavkom živín však tieto kvasinky tolerujú aj vyššie koncentrácie etanolu 14–16 % obj. (CASEY *et al.* 1983). Prídavok rôznych živín je však ekonomicky náročný a taktiež môže ovplyvniť organoleptické vlastnosti hotového piva.

Najčastejšie sa vysoko etanoltolerantné kmene podarilo získať selekciou kmeňov po ich izolácii z prostredia s vysokým obsahom alkoholu, avšak tie po čase stratili takto získanú etanoltoleranciu (BENÍTEZ *et al.* 1996).

Etanoltolerancia je v druhoch rodu *Saccharomyces* kontrolovaná veľkým množstvom génov, a preto je veľmi obtiažne získať etanoltolerantný mutant kvasiniek. Z metód génových manipulácií bola doteraz úspešne použitá len sexuálna hybridizácia, pričom izolovaný etanoltolerantný hybrid pivovarských kvasiniek si zachoval vyžadované vlastnosti pre výrobu piva (BENÍTEZ *et al.* 1996).

Zvýšenú etanoltoleranciu kmeňov kvasiniek je možné dosiahnuť aj pri raste v podmienkach vysokého osmotického tlaku (SHARMA 1997).

Kmene nereprimované glukózou

Jedným z limitujúcich faktorov pri kvasení vysokoextraktívnych mladín je zdržanie fermentácie zapríčinené represiou asimilácie maltózy glukózou. Na zlepšenie účinnosti asimilácie maltózy sa KODAMA *et al.* (1995) pokúsili o konštitutívnu expresiu *MAL* génov s vysokým počtom kópií plazmidov v pivovarských kvasinkách. V experimente s pivovarskou mladinou o koncentrácii extraktu 24 % hm. konštitutívna expresia *MALT* génu (maltózopermeáza) zvýšila rýchlosť fermentácie maltózy v prítomnosti glukózy (30% redukcia času potrebného na fermentáciu mladiny), zatiaľ čo expresia *MALS* (α -glukozidáza) a *MALR* (pozitívny regulátor) génov nemala efekt na dĺžku trvania fermentácie maltózy. Limitujúcim faktorom pri fermentácii maltózy v prítomnosti vysokej koncentrácie glukózy je teda maltózový prenášač, a nie maltáza (α -glukozidáza).

Boli izolované aj spontánne dereprimované mutanty, schopné využitia maltózy na médiu s výraznou koncentraciou glukózy. Tieto mutanty boli izolované z pôdy obsahujúcej nemetabolizovateľný glukózový analóg 2-deoxyglukózu a vykazovali výrazné zvýšenie rýchlosti využitia maltózy v prítomnosti glukózy (SILLS *et al.* 1987; STEWART *et al.* 1986).

Predkultiváciou kvasiniek v prítomnosti maltózy ako jediného zdroja uhlíka bola taktiež dosiahnutá redukcia času potrebného na fermentáciu maltózy v prítomnosti glukózy (KODAMA *et al.* 1995).

Kmene schopné skvasovať dextríny

V súčasnosti používané kmene pivovarských kvasiniek nedokážu skvasovať všetky sacharidy prítomné v mladine, ale len mono-, di- a trihexózy. Zvýšenie efektívnosti výroby piva by mohlo byť dosiahnuté konštrukciou pivovarského kmeňa kvasiniek schopného fermentovať dextríny a škrob.

Mnohí autori sa pokúšali vytvoriť kvasinky transformované amyloglukozidázovými génmi *DEX* získanými zo *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, avšak aj keď transformácia bola úspešná, výsledné pivo nebolo chutné, pretože došlo k produkcii 4-vinylguajakolu (SILLS *et al.* 1987). Gén kódujúci enzýmovú dekarboxyláciu kyseliny ferulovej prítomnej zo sladú alebo chmeľu na 4-vinylguajakol bol transformovaný súčasne s génom *DEX*. Neskôr sa metódou klasickej hybridizácie podarilo skonštruovať kmeň kvasiniek, ktoré fermentujú dextríny a neprodukujú 4-vinylguajakol. Vyrobené pivo bolo akceptovateľné, neobsahovalo ani známky fenolovej príchute, ale malo sýrny nádych (SILLS *et al.* 1987). Transformáciou pivovarských kvasiniek s génom kódujúcim glukoamylázu *STA2* zo *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (HAMMOND 1995), ktorá štiepi α -1,4 väzbu, sa podarilo vytvoriť kmeň pivovarských kvasiniek schopný produkovať enzým glukoamylázu. Modifikované kvasinky fermentovali mladinu rovnakou rýchlosťou ako rodičovský kmeň, ale skvasili oveľa väčšie množstvo dostupných sacharidov a tak naprodukovali až o 1 % obj. etanolu viac. Použitím génu glukoamylázy z iných mikroorganizmov, ako napríklad *Aspergillus niger* (TANG *et al.* 1996), *Aspergillus awamori* (HAMMOND 1995) a *Schwanniomyces castellii* (SILLS *et al.* 1987), ktorých glukoamyláza má α -1,4 aj α -1,6 hydrolytickú aktivitu, bola fermentácia ešte úspešnejšia a bolo vyrobené pivo so zníženou energetickou hodnotou veľmi dobrej kvality.

Kmene degradujúce zákalotvorné látky

Určité proteíny prítomné v mladine sú nevyhnutné na udržanie stability peny, ale niektoré (albumín, jačmenný hordeín, proteíny bohaté na cystín) sa spoluúčastňujú na tvorbe chladových zákalov a tým menia fyzikálnu stabilitu hotového piva (BILINSKI *et al.* 1987). Ich množstvo vo VHG mladinách je zvýšené a tak konštrukcia pivovarských kvasiniek, ktoré vylučujú do mladiny proteázy degradujúce zákalotvorné proteíny počas fermentácie, by mohla byť alternatívou exogénneho prídavku proteáz. Súčasne by takéto kmene s proteázovou aktivitou slúžili na obohatenie mladiny asimilovateľným dusíkom, ktorého je vo vysokoextraktívnych mladinách nedostatok. Zatiaľ sa však nepodarilo nájsť vhodný kmeň *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý by vykazoval požadovanú aktivitu proteáz pri pH mladiny a teplote jej fermentácie. Z iných rodov kvasiniek iba *Saccharomycopsis fibuligera* a *Torulopsis magnoliae* produkujú vhodné extracelulárne proteázy s aktivitou pri pH mladiny a teplote jej fermentácie. Pivovarské kvasinky boli úspešne transformované s génom

zo *Saccharomyopsis fibuligera*, avšak v priebehu fermentácie aktivita extracelulárnej proteázy výrazne poklesla a taktiež sa mierne znížila výsledná koncentrácia etanolu v pive (BILINSKI *et al.* 1987).

So zvyšovaním extraktu mladiny sa zvyšuje aj jej viskozita, čo je spôsobené predovšetkým prítomnosťou jačmenných β -glukánov. Jačmenné β -glukány sa tiež spolupodieľajú na tvorbe zákalov, sedimentov a gélov vo výslednom pive a spôsobujú ťažkosti pri filtrácii piva. Transformáciou génov kódujúcich β -glukanázu do pivovarských kvasiniek by sa tieto problémy odstránili. Doteraz boli kmene pivovarských kvasiniek transformované génmi klonovanými z *Bacillus subtilis* (HINCHLIFFE & BOX 1984), *Trichoderma reesei* (PENTILLÄ *et al.* 1987) a z jačmeňa (BERGHOF & STAHL 1991). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté klonovaním génu z *Trichoderma reesei*. Transformované kmene úspešne degradovali mladinové β -glukány, čím sa výrazne zlepšila filtrovateľnosť piva, zatiaľ čo rýchlosť fermentácie a charakter hotového piva zostali nezmenené. Takisto výborné výsledky boli dosiahnuté aj pri transformácii kmeňov jačmennou β -glukanázou, ktorá je vhodnejšia pre podmienky výroby piva, pretože má optimálnu aktivitu pri pH 4,7, zatiaľ čo bakteriálna pri pH 6,7.

Kmene so zvýšenou flokulačnou schopnosťou

So zvyšovaním extraktu mladín z 12 až na 23 % hm. bolo pozorované znižovanie rýchlosti flokulácie kvasiniek (SUIHKO *et al.* 1993). Mechanizmus flokulácie je doteraz len veľmi málo objasnený, pretože s riadením flokulácie je spojené množstvo génov (*FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *TUP1*, *SSN6*), ktorých skutočná úloha je ešte stále objektom výskumu. Zatiaľ bol naklonovaný a použitý na transformáciu neflokulujúcich kvasiniek na flokulujúce len gén *FLO1* (HAMMOND 1995). Flokulácia kvasiniek však začala už v prvých hodinách fermentácie a nie až v závere fermentácie ako zvyčajne, a preto bola dosiahnutá nižšia rýchlosť fermentácie, ako aj nižší počet buniek. Na zabezpečenie vhodného priebehu flokulácie je teda potrebné vložiť gén *FLO1* tak, aby bol exprimovaný až v závere fermentácie.

Flokulujúci kmeň kvasiniek vhodný pre priemyselné použitie získali URANO *et al.* (1993). Konverziou neflokulujúceho kmeňa pivovarských kvasiniek na flokulujúci pomocou elektrofúzie použitím *Saccharomyces cerevisiae* (*FLO5*), následnou selekciou hybridov a ich skríningom sa im podarilo izolovať vhodný kmeň.

Aj fúziou protoplastov vysokoflokulujúcej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a kvasinky schopnej produkovať killer toxíny bol získaný vysokoflokulujúci kmeň, navyše aj s killer charakteristikou (JAVADEKAR *et al.* 1995).

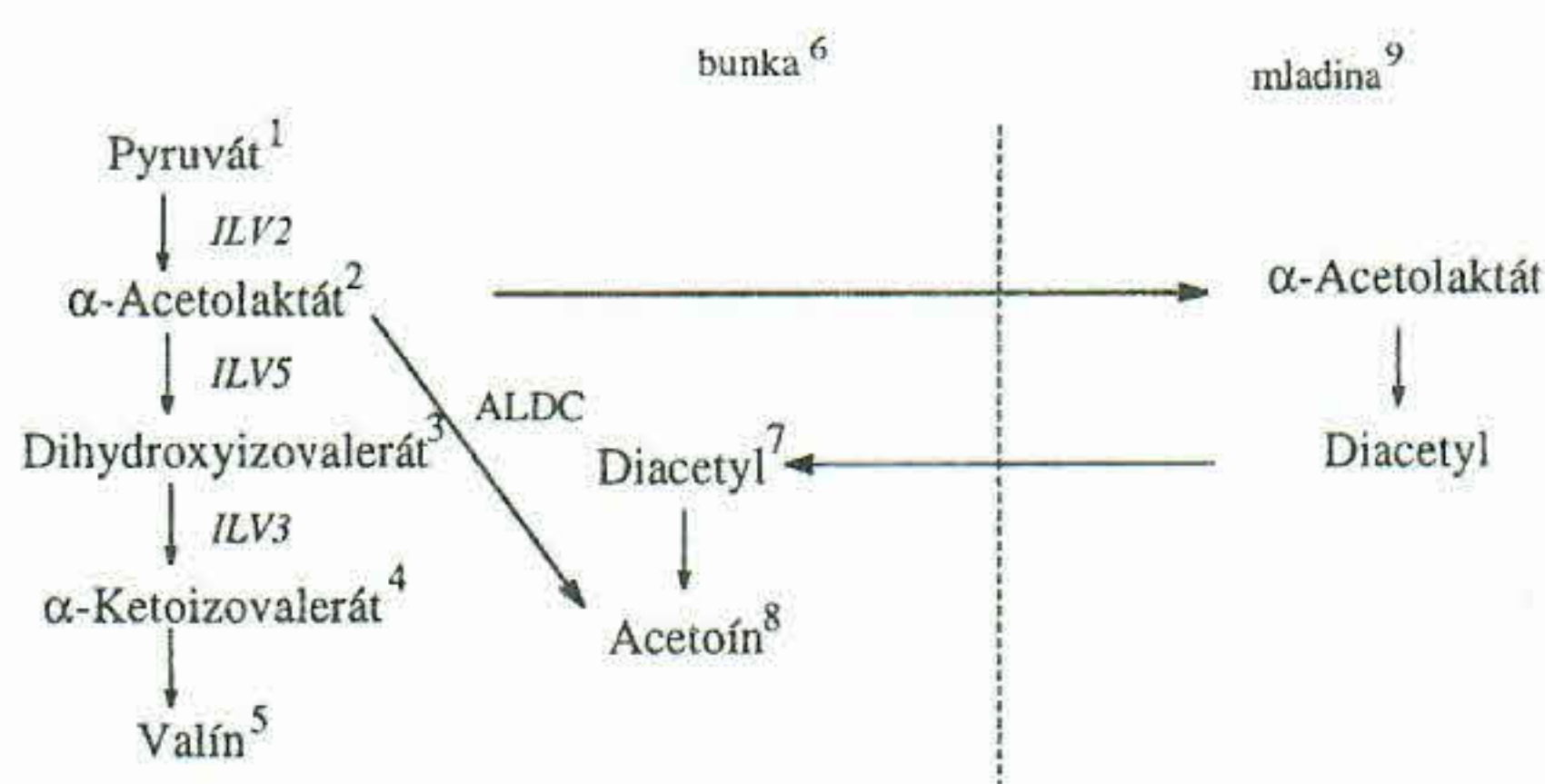
Kmene ovplyvňujúce výsledný charakter piva

Pri kvasení vysokoextraktívnych mladín dochádza k zmenám v tvorbe diacetyl, esterov a vyšších alkoholov (CALDERBANK & HAMMOND 1994). Ďalšou možnosťou využitia nových kmeňov by teda mohlo byť ovplyvnenie produk-

cie látok, ktoré sú zodpovedné za organoleptické vlastnosti piva – jeho chuť a vôňu. Bolo by potrebné skonstruovať kmene schopné nielen eliminovať tvorbu nežiaducich látok v pive, ale aj kmene produkujúce vyššie koncentrácie látok pozitívne ovplyvňujúcich charakter a stabilitu piva.

Hlavnou látkou, ktorej tvorba spôsobuje nepríjemnú chuť piva a ktorej odstránením by sa skrátil čas potrebný na dozrievanie piva, je diacetyl. Diacetyl v pive vzniká oxidatívnou dekarboxyláciou α -acetolaktátu a je konvertovaný v priebehu zrenia piva kvasinkami na acetoín. Acetolaktátdehydrogenáza katalyzuje konverziu α -acetolaktátu priamo na acetoín (obr. 1). Transformáciou pivovarských kvasiniek týmto enzýmom z *Enterobacter aerogenes* (SUIHKO *et al.* 1990; ONNELA *et al.* 1996), *Klebsiella terrigena* (ONNELA *et al.* 1996), *Lactococcus lactis* (GOELLING & STAHL 1988) a *Acetobacter aceti* var. *xylinum* (TADA *et al.* 1995; YAMANO *et al.* 1994) sa podarilo vyrobiť pivo, ktorého obsah diacetyl hneď po hlavnom kvasení bol pod hranicu chuťového vnemu, a tak sa výrazne skrátil čas potrebný na výrobu piva požadovanej kvality.

Ďalšou možnosťou zníženia tvorby diacetyl v pive je ovplyvnenie dráhy jeho prekursora α -acetolaktátu. Túto dráhu je možné ovplyvniť buď znížením rýchlosti tvorby α -acetolaktátu, alebo nadmernou syntézou enzýmov, ktoré premieňajú α -acetolaktát na valín. Mutáciou génu *ILV2* boli získané mutanty s veľmi nízkou aktivitou acetolaktátsyntetázy (GJERMENSEN *et al.* 1988), a tak hladina α -acetolaktátu aj diacetyl v pive bola veľmi nízka. Nevýhodou bolo, že kvasinky fermentovali mladinu neefektívne. Transformáciou kvasiniek génmi *ILV3* a *ILV5* (VILLA *et al.* 1995), ktorých nadmerná expresia zvýšila aj množstvo ich produktov v bunke, sa zvýšil tok cez dráhu syntézy valínu a tým sa znížila tvorba diacetyl.

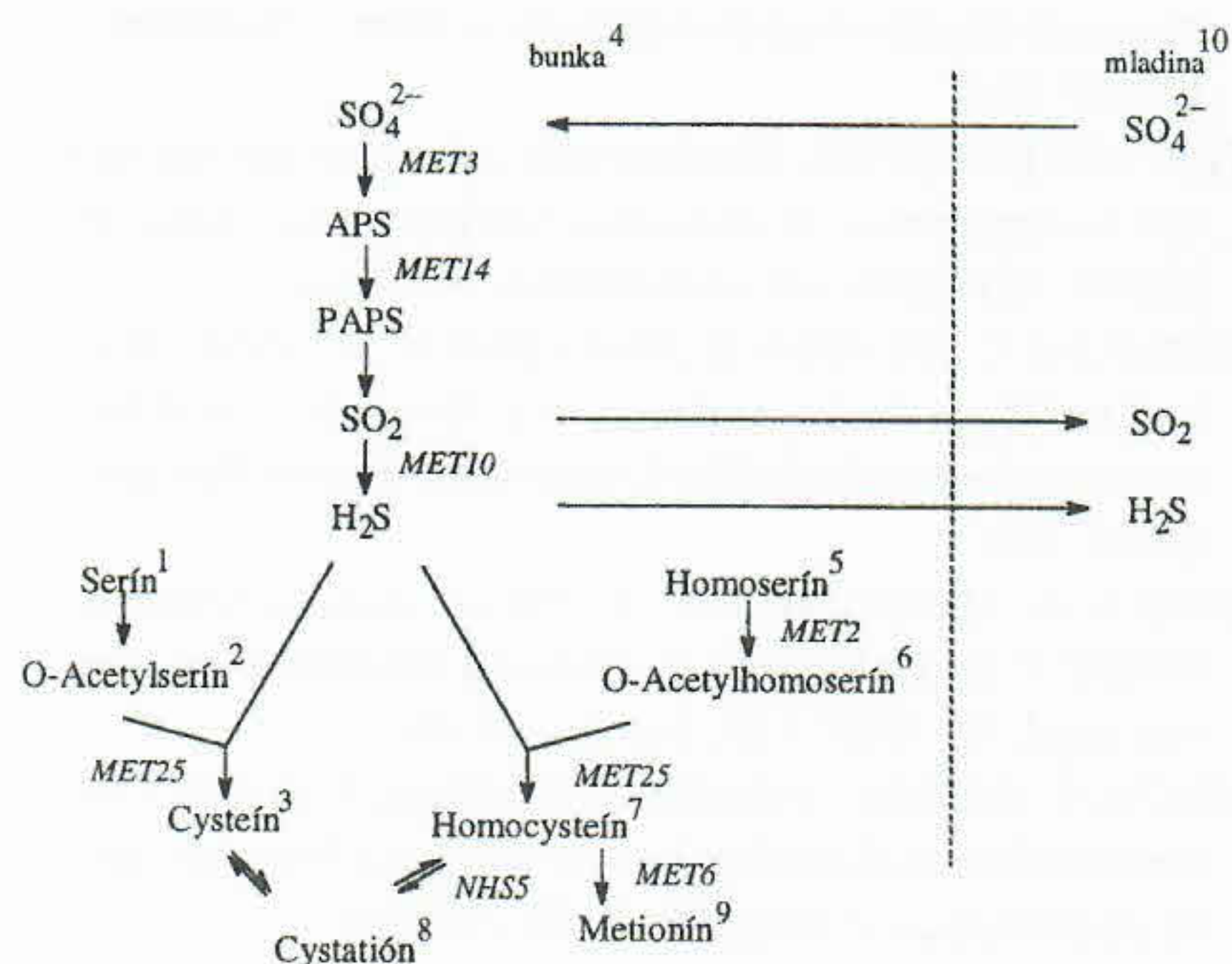


Gény – Genes: *ILV2* = acetolaktátsyntetáza – acetolactate synthetase; *ILV5* = reduktoizomeráza – reductoisomerase; *ILV3* = dihydroxyaciddehydratáza – dihydroxyaciddehydratase; ALDC = α -acetolaktátdekarboxyláza – α -acetolactate decarboxylase

¹pyruvate; ² α -acetolactate; ³dihydroxyisovaline; ⁴ α -ketoisovaline; ⁵valine; ⁶yeast; ⁷diacetyl; ⁸acetoine; ⁹wort

Obr. 1. Dráha syntézy valínu v *Saccharomyces cerevisiae* a miesto aktivity α -acetolaktátdekarboxylázy (HAMMOND 1995, modifikované) – The path of valine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and the site of α -acetolactate decarboxylase (HAMMOND 1995, modified)

Látkou negatívne ovplyvňujúcou charakter piva je aj sírovodík. Úspešne sa podarilo transformovať kvasinky génom *NHS5* (HAMMOND 1995), čím sa zvýšila rýchlosť syntézy cystatiónu a tak znížila koncentrácia sírovodíka. Úspešná bola aj transformácia génom *MET25* (OMURA *et al.* 1995), čím sa zvýšila rýchlosť syntézy metionínu a tak znížila koncentrácia sírovodíka (obr. 2). Potlačením tvorby sírovodíka sa výrazne skrátila doba zrenia piva (až o dva týždne) a súčasne sa zlepšili jeho organoleptické vlastnosti.



Gény – Genes: *MET2* = homo-serín-acetyltransferáza – homoserine acetyltransferase; *MET3* = ATP-sulfuryláza – ATP-sulfurylase; *MET6* = homo-cystein-metyltransferáza – homocysteine methyltransferase; *MET10* = siričitanreduktáza – sulfitereductase; *MET14* = adenylsulfátkináza – adenylsulfatekinase; *MET25* = O-acetylhomoserín – O-acetylhomoserine; O-acetyl-serínsulfhydráza – O-acetylserinesulfhydrase; *NHS5* – cystatió-β-syntáza – cystation-β-synthase

APS = adenylsulfát – adenylsulfate; PAPS = 3'-fosfoadenylsulfát – 3'-phosphoadenylsulfate

¹serine; ²O-acetylserine; ³cysteine; ⁴yeast; ⁵homoserine; ⁶O-acetylhomoserine; ⁷homocysteine; ⁸cystatione; ⁹methionine; ¹⁰wort

Obr. 2. Metabolická dráha využitia síranov v *Saccharomyces cerevisiae* (OMURA *et al.* 1995, modifikované) – Metabolic path of sulfate utilization in *Saccharomyces cerevisiae* (OMURA *et al.* 1995, modified)

Podarilo sa zvýšiť aj produkciu látok, ktoré napomáhajú stabilite charakteru piva, alebo zlepšujú jeho vlastnosti. Tak sa podarilo inaktíváciou *MET2* génu (HANSEN & KIELLAND-BRANDT 1996a, b) zvýšiť množstvo oxidu siričitého v pive, ktorý pôsobí ako antioxidant, zvýšením množstva génov pre alkoholacetyltransferázu zvýšiť množstvo acetátsterov, ako aj izoamylacetátu, a tak pozitívne ovplyvniť chuť piva (BENÍTEZ *et al.* 1996).

Literatúra

BELL P. J. L., DEERE D., SHEN J., CHAPMAN B., BISSINGER P. H., ATTFIELD P. V., VEAL D. A. (1998): A flow cytometric

method for rapid selection of novel industrial yeast hybrids. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 1669–1672.

BENÍTEZ T., GASENT-RAMÍREZ J. M., CASTREJÓN F., CODÓN A. C. (1996): Development of new strains for the food industry. Biotechnol. Prog., **12**: 149–163.

BERGHOF K., STAHL U. (1991): Improving the filterability of beer by the use of β-glucanase active brewer's yeast. Bioeng. **7**: 27–32.

BILINSKI C. A., RUSSEL I., STEWART P. R. (1987): Applicability of yeast extracellular proteinases in brewing: Physiological and biochemical aspects. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 495–499.

CALDERBANK J., HAMMOND J. R. M. (1994): Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. J. Amer. Soc. Brew. Chem., **52**: 84–88.

CASEY G., MAGNUS C. A., INGLEDEW W. M. (1983): High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. Biotechnol. Lett., **5**: 429–434.

CASEY G. P., XIAO W., RANK G. H. (1988): A convenient dominant selection marker for gene transfer in industrial strains of *Saccharomyces* yeast: *SMR1* encoded resistance to the herbicide sulfometuron methyl. J. Inst. Brew., **94**: 93–97.

D'AMORE T., PANCHAL C. J., STEWART G. G. (1987): The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort. J. Inst. Brew., **93**: 472–476.

D'AMORE T., PANCHAL CH. J., RUSSEL I., STEWART G. G. (1990): A study of ethanol tolerance in yeast. Crit. Rev. Biotechnol., **9**: 287–404.

GJERMENSEN C., NILSSON-TILGREN T., PETERSEN J. G., KIELLAND-BRANDT M. C., SIGSGAARD P., HOLMBERG S. (1988): Towards diacetyl-less brewer's yeast. Influence of *ilv2* and *ilv5* mutations. J. Basic Microbiol., **28**: 175–183.

GOELLING D., STAHL U. (1988): Cloning and expression of an α-acetolactate decarboxylase gene from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 1889–1891.

HAMMOND J. R. M. (1995): Genetically-modified brewing yeast for the 21st century. Progress to date. Yeast, **11**: 1613–1625.

HANSEN J., KIELLAND-BRANDT M. C. (1996a): Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulphite in beer. J. Biotechnol., **50**: 75–87.

HANSEN J., KIELLAND-BRANDT M. C. (1996b): Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. J. Biotechnol., **49**: 1–12.

HARALDSON A., BJÖRLING T. (1981): Yeast strains for concentrated substrates. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **13**: 34–38.

HENDERSON R. C. A., COX B. S., TUBB R. S. (1985): The transformation of brewing yeasts with a plasmid containing the gene for copper resistance. Curr. Genetics, **8**: 471–475.

HINCHLIFFE E., BOX W. G. (1984): Expression of the cloned endo-1,3-1,4-β-glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genetics, **8**: 471–475.

JAVADEKAR V. S., SIVARAMAN H., GOKHALE D. V. (1995): Industrial yeast strain improvement: construction of a highly

- flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *J. Ind. Microbiol.*, **15**: 94–102.
- JIMENEZ A., DAVIES J. (1980): Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, **287**: 869–871.
- KODAMA Y., FUKUI N., ASHIKARI T., SHIBANO Y. (1995): Improvement of maltose fermentation efficiency: Constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **53**: 24–29.
- LEGMANN R., MARGALITH P. L. (1986): Ethanol formation by hybrid yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 198–202.
- OMURA F., SHIBANO Y., FUKUI N., NAKATANI K. (1995): Reduction of hydrogen sulphide production in brewing yeast by constitutive expression of *MET25* gene. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **53**: 58–62.
- ONNELA M. L., SUIHKO M. L., PENTTILÄ M., KERANEN S. (1996): Use of modified alcohol dehydrogenase, ADH1, promoter in construction of diacetyl non-producing brewer's yeast. *J. Biotechnol.*, **49**: 101–109.
- PENTTILÄ M. E., SUIHKO M. L., LEHTINEN U., NIKKOLA M., KNOWLES J. K. C. (1987): Construction of brewer's yeasts secreting fungal endo- β -glucanases. *Curr. Genetics*, **12**: 413–420.
- SHARMA S. C. (1997): A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**: 11–15.
- SILLS M. A., PANCHAL CH. J., RUSSELL I., STEWART G. G. (1987): Production of amylolytic enzymes by yeast and their utilisation in brewing. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **5**: 105–115.
- STEWART G. G., BILINSKI C. A., RUSSELL I. (1986): Genetic manipulation of brewer's and other industrial yeast strain in order to improve their substrate utilisation capabilities. In: GIM86 Symp. Genet. Ind. Microor. Split, Yugoslavia: 1–10.
- SUIHKO M. L., BLOMQUIST K., PENTTILÄ M., GISLER R., KNOWLES J. (1990): Recombinant brewer's yeast strains suitable for accelerated brewing. *J. Biotechnol.*, **10**: 173–178.
- SUIHKO M. L., VILPOLA A., LINKO M. (1993): Pitching rate in high gravity brewing. *J. Inst. Brew.*, **99**: 341–346.
- ŠIPIČKÝ M., ŠUBÍK, J. (1992): Genetika kvasiniek. Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.
- TADA S., TAKEUCHI T., SONE H., YAMANO S., SCHOFIELD M. A. (1995): Pilot-scale brewing with industrial yeasts produce the α -acetolactate decarboxylase of *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum*. In: EBC Congr. Brussels: 369–376.
- TANG G., ZHONG L., YANG K., ZHENG Y., CAO X. (1996): Construction of a brewing yeast having glucoamylase activity and its fermentation characteristics. *Chin. J. Biotechnol.*, **12**: 263–267.
- THEVELEIN J. (1998): Nutrient-induced signal transduction and its importance in industrial application of yeasts. In: XXVII. Výročná Konf. o kvasinkách. Smolenice.
- THOMAS K. C., HYNES S. H., INGLEDEW W. M. (1996): Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochem.*, **4**: 321–333.
- TUBB R. S., HAMMOND J. R. M. (1987): Yeast Genetics. In: PRIEST F. G., CAMPBELL I.: *Brewing Microbiology*. Elsevier Appl. Sci. Publ. Ltd., London: 47–82.
- URANO N., SATO M., SAHARA H., KOSHIMO S. (1993): Conversion of a non-flocculent brewer's yeast to flocculent ones by electrofusion. *J. Biotechnol.*, **28**: 249–261.
- VILLA K. D., LEE S., GOOSSENS E., DEBOURG A., MASSCHELEIN C. A. (1995): Control of vicinal diketone production by brewer's yeast. I. Effects of *ILV5* and *ILV3* gene amplification on vicinal diketone production and *ILV* enzyme activity. *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **53**: 49–53.
- YAMANO S., KONDO K., TANAKA J., INOUE T. (1994): Construction of a brewer's yeast having α -acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* integrated in the genome. *J. Biotechnol.*, **32**: 173–178.

Kontaktná adresa:

Ing. JAROSLAVA PÁTKOVÁ, Slovenská technická univerzita, Katedra biochemickej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, tel.: + 421 7 59 32 57 15, fax: + 421 7 52 96 70 85, e-mail: patkova@chtf.stuba.sk
