

## Regulácia $\alpha$ -glukozidázy a $\beta$ -D-fruktofuranozidázy v priemyselných kmeňoch pekárskych kvasiniek a príprava rekombinantov nadprodukujúcich tieto enzýmy

MARGITA OBERNAUEROVÁ — JÚLIUS ŠUBÍK

**Súhrn.** Po raste za represných a derepresných podmienok sa stanovila aktivita  $\alpha$ -glukozidázy a  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy v sérii polyploidných priemyselných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae*, ako aj v produktoch ich meiózy. Z nich sa izolovali klony rôznej citlivosti na katabolickú represiu, charakteristické výraznou nadprodukciou  $\alpha$ -glukozidázy a  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy. Takéto kmene sa dajú použiť pri priemyselnej príprave uvedených enzýmov i pri hybridizačnom šľachtení pekárskych kvasiniek.

Jedným z najvýznamnejších kvalitatívnych znakov pekárskeho droždia je jeho kvasná aktivita v ceste. Prejavuje sa množstvom oxidu uhličitého uvoľneného pri skvasovaní sacharidov múky, resp. cukrov pridávaných do cesta [1, 2]. Voľné cukry v množstve 1—2 g v 100 g múky tvoria prevažne glukofruktózy, maltóza, sacharóza, v menšej miere glukóza a fruktóza [3, 4]. Obsah disacharidov v múke možno umele zvyšovať prídavkom sacharózy alebo amyláz degradujúcich škrob múky na maltózu [5].

Prvým stupňom metabolizmu sacharózy, resp. rafinózy v kvasinkách je ich extracelulárna hydrolýza  $\beta$ -D-fruktofuranozidázou (invertáza, EC 3.2.1.26) [6]. Na rozdiel od nich si katabolizmus maltózy primárne vyžaduje transport tohto disacharidu do bunky špecifickou maltózo-permeázou, kde sa potom hydrolyzuje  $\alpha$ -glukozidázami ( $\alpha$ -D-glukozid-glukohydroláza, EC 3.2.1.20) na glukózu vstupujúcu do metabolickej dráhy glykolýzy [7]. Súčasný stav poznatkov o biochemických vlastnostiach a genetickej špecifikácii enzýmových systémov využitia maltózy a sacharózy kvasinkami podrobne opisujú práce [6—8]. Aktivita týchto enzýmových systémov významne determinujú úžitkovú hodnotu pekárskych kvasiniek [8, 9], ktorú možno ďalej zvyšovať šľachtením produkčných kmeňov.

---

Ing. Margita Obernauerová, RNDr. Július Šubík, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Racionálne vedené šľachtenie kvasiniek si vyžaduje poznať vzťahy medzi technologickými vlastnosťami produkčných kmeňov, biochemickou aktivitou ich buniek a jej genetickým pozadím [10]. V tejto oblasti stále pretrvávajú nedostatok technických i vedeckých informácií, čo ovplyvňuje aj polyploidný charakter priemyselných kmeňov, ktoré sú vo výskume genetiky a biochémie eukaryotickej bunky menej vyhľadávané ako definované laboratórne kmene kvasiniek.

Táto práca nadväzuje na výskum maltózopermeázy priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek [11] sa zameriava na štúdium regulácie  $\alpha$ -glukozidázy a  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy v takýchto produkčných kmeňoch. Jej výsledky vyúsťujú navyše i do prípravy nových rekombinantov, vyznačujúcich sa nadprodukciou týchto enzýmov, ktoré sa dajú využiť jednak pri hybridizačnom šľachtení pekárskych kvasiniek, jednak ako produkčné kmene pri príprave enzýmových koncentrátov  $\alpha$ -glukozidázy, resp.  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy.

## Materiál a metódy

**Mikroorganizmy.** V práci sa použili tieto kmene kvasiniek rodu *Saccharomyces*, pochádzajúce zo zbierky mikroorganizmov Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave, resp. Slovniku, n. p., Trenčín: haploidné laboratórne kmene *S. cerevisiae* X 2180A (MATa, SUC2, ga12, CUP1), *S. cerevisiae* X 2180B (MAT $\alpha$ , SUC2, ga12, CUP1), *S. cerevisiae* DP1-1B/514 (MAT $\alpha$ , his1,  $\varrho^+$ , E<sub>514</sub><sup>R</sup>), diploidný laboratórny kmeň *S. cerevisiae* D (kmeň DT XII) [12], ako aj priemyselné kmene pekárskych kvasiniek domácej a zahraničnej proveniencie: *S. cerevisiae* L (licenčný kmeň V fy Vogelbusch), *S. cerevisiae* S (licenčný kmeň VG — FETT D/80 fy Vogelbusch), *S. cerevisiae* O (licenčný kmeň OOSF-RH/81 fy Vogelbusch), *S. cerevisiae* F (izolát fínskeho expedičného droždia), *S. cerevisiae* G (izolát holandského expedičného droždia), *S. cerevisiae* B (izolát belgického expedičného droždia) a *S. cerevisiae* M (izolát maďarského expedičného droždia).

**Spôsob kultivácie a kultivačné médiá.** Inokulá sa pripravili 24-hodinovou aeróbnou kultiváciou kmeňov v polosyntetickej pôde obsahujúcej 5 g/l peptónu, 5 g/l kvasničného autolýzáta, 20 g/l glukózy, zmes anorganických solí pri 30 °C [12]. Inokulum sa použilo na zaočkovanie tekutých polosyntetických médií obsahujúcich ako zdroj uhlíka glukózu (5 g/l, resp. 100 g/l), maltózu (200 g/l) alebo sacharózu (20 g/l). Bunky boli kultivované za trepania pri 30 °C v Erlenmayerových bankách naplnených do 1/10 objemu rastovým médiom.

Pevné polosyntetické pôdy boli rovnakého zloženia ako tekuté a navyše obsahovali agar (20 g/l, resp. 30 g/l). Glycerolové médium obsahovalo glycerol (20 g/l) namiesto glukózy. Pevné minimálne rastové médium obsahovalo glukózu (20 g/l), zmes anorganických solí [12] a zmes vitamínov; 10 mg inozitolu, 1 mg tiamín-HCl, 600  $\mu$ g pyridoxín-HCl, 600  $\mu$ g kyseliny nikotínovej, 600  $\mu$ g pantoténanu vápenatého, 10  $\mu$ g biotínu a 300  $\mu$ g riboflavínu v 1 l média. Deoxyglukózové médium sa pripravilo pridaním 2-deoxy-D-glukózy (0,15 mg/ml) do polosyntetického média, ktoré obsahovalo ako zdroj uhlíka rafinózu (20 g/l). Glukozamínové médium sa pripravilo pridaním sterilného roztoku D-glukozamínu do polosyntetického média s maltózou, ale bez anorganických solí tak, aby výsledná koncentrácia bola 7 mg/ml. Glukozamín a maltóza sa sterilizovali membránovou filtráciou.

*Chemická mutagenéza s EMS* [13, 14]. Na indukciu jadrových mutácií sa použil EMS (etylmetánsulfonát). Bunky kvasiniek ( $5 \cdot 10^7$ ) vyrastené v tekutej polosyntetickej pôde s glukózou sa suspendovali v 5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 mol/l), pH 7,0, obsahujúcim EMS (20 g/l). Po 90 min inkubácie pri 30 °C sa bunky odcentrifugovali, premyli sterilnou destilovanou vodou a suspendovali v 200 ml tekutej polosyntetickej pôdy s glukózou (100 g/l). Po premiešaní sa suspenzia buniek rozdelila po 10 ml do skúmaviek a inkubovala sa staticky dva dni pri 30 °C. Po vyrastení sa bunky premyli a vysiali v množstve  $2 \cdot 10^7$  buniek/Petriho misku na pevné selekčné pôdy.

*Fyzikálna mutagenéza UV-žiarením a  $\gamma$ -žiarením* [14]. Na indukciu mitotických rekombinácií, resp. mutácií sa v dávkach zodpovedajúcich približne 10 % prežitiu buniek ožiarenej populácie použili fyzikálne mutagény: UV-žiarenie alebo ionizujúce  $\gamma$ -žiarenie.

Mutagenéza UV-žiarením sa robila expozíciou suspenzie buniek ( $2 \cdot 10^5$  buniek/ml) v otvorenej Petriho miske za miešania vo vzdialenosti 45 cm od UV-žiarivky (20 W) 30 sekúnd až 3 minúty. Analýzou krivky odumierania sa stanovila dávka žiarenia zodpovedajúca približne 10 % prežitiu buniek. Mutagenéza  $\gamma$ -žiarením sa uskutočnila v suspenzii buniek ( $10^5$  buniek/ml) exponovaných zdroju ionizujúceho žiarenia ( $^{60}\text{Co}$ ) v čase úmernom dávke žiarenia 10–400 krad (0,1–4 kGy). Analýzou krivky odumierania buniek sa stanovila dávka žiarenia zodpovedajúca približne 10 % prežitiu buniek.

*Sporulácia a izolácia tetrád* [15, 16]. Bunky vyrastené v tekutom médiu alebo na povrchu pevného polosyntetického média obsahujúceho glukózu (20 g/l), alebo octan sodný (10 g/l) v prítomnosti ftalanu draselného (10 g/l), pH 5,5 sa premyli a inkubovali v tekutom alebo pevnom sporulačnom médiu obsahujúcom octan sodný (10 g/l), kvasničný autolyzát (0,5 g/l), resp. agar (3 g/l).

Po 7 dňoch inkubácie pri 30 °C sa vytvorené asky pozorovali mikroskopicky. Spóry sa izolovali mikromanipulátorom po natrávení steny aska enzymatickým výťažkom zo žalúdka slimákov (20 g/l).

*Farbenie spór — detekcia sporulácie* [17]. Suspenzia vysporulovanej kultúry kvasiniek sa naniesla na podložné sklo, fixovala teplom a farbila 1 min v roztoku malachitovej zelene (50 g/l) na vodnom kúpeli (70—80 °C). Preparát sa premyl v studenej vode a vyfarbil v roztoku safranínu (5 g/l) 1 min. Po premytí studenou vodou sa preparát pozoroval pod mikroskopom. Spóry sa zafarbili malachitovou zeleňou na zeleno a nevysporulované bunky safranínom na červeno.

*Indukcia mitotickej haploidácie* [18, 19]. Bunky kvasiniek sa vysiali na pevnú polosyntetickú glukózovú pôdu obsahujúcu 25 µg/ml benomylu. Po 3—4 dňoch rastu sa vyrastené kolónie zmyli sterilnou destilovanou vodou, zriedili a vysiali na polosyntetickú glukózovú pôdu bez benomylu. Po troch dňoch sa vyrastené kolónie podrobili analýze jadrových znakov a schopnosti sporulácie.

*Stanovenie párovacieho typu buniek.* Bunky nesporelujúcich klonov kvasiniek sa krížili s bunkami štandardných kmeňov X 2180A a X 2180B a mikroskopicky sa pozorovala tvorba zygot v 6. a 24. hodine kopulácie, ako aj tvorba askov po 7 dňoch sporulácie premytých buniek kopulačnej zmesi z 24. hodiny kríženia. Bunky analyzovaných klonov mali párovací typ opačný ako ten použitý štandardný kmeň, s ktorým analyzovaný klon tvoril pri krížení zygoty, resp. asky po sporulácii ich potomstva.

*Stanovenie aktivity  $\alpha$ -glukozidázy* [20, 21]. Aktivita  $\alpha$ -glukozidázy sa stanovila v bezbunkovom extrakte po mechanickom rozbití buniek.  $2 \cdot 10^8$  buniek sa suspendovalo v 0,2 ml fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol/dm<sup>3</sup>), pH 6,8. Pridali sa balotínové guľičky v takom množstve, aby ich povrch bol dostatočne zmáčaný. Bunky sa homogenizovali pri 0—2 °C na vibračnej trepačke Mikro-techna, Praha, typ VT, pri maximálnej frekvencii vibrácií dvakrát 3 min. Stupeň homogenizácie sa stanovil mikroskopicky. Po rozbití buniek sa k homogenátu pridalo 0,8 ml fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol/dm<sup>3</sup>), pH 6,8, premiešalo a scentrifugovalo. Supernatant sa použil na analýzu.

Aktivita  $\alpha$ -glukozidázy sa stanovila v reakčnej zmesi, ktorá obsahovala 0,5 mg *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranozidu (PNPG) v 0,5 ml fosfátového tlmivého roztoku (0,5 mol/dm<sup>3</sup>), pH 6,8 a supernatant z homogenátu buniek. Po 5 min inkubácie pri 30 °C sa reakcia zastavila pridaním 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 g/l). Vzniknuté modré sfarbenie sa meralo spektrofotometricky pri 410 nm. Aktivita  $\alpha$ -glukozidázy sa vyjadrila ako množstvo PNPG (µmol) rozloženého

za 1 min v prepočte na 1 mg bielkovín. Bielkoviny sa stanovili Folinovým činidlom [22].

*Stanovenie aktivity  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy* [23]. Bunky, ktoré rástli 24 hodín aerobne pri 30 °C, sa dvakrát premyli destilovanou vodou, resuspendovali v destilovanej vode a stanovila sa ich koncentrácia. Z nariadenej zásobnej suspenzie ( $2 \cdot 10^8$  buniek/ml) sa potrebné množstvo buniek zobralo na stanovenie sušiny a aktivity  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy.

Hydrolyza sacharózy sa uskutočnila v reakčnej zmesi, ktorá obsahovala citrátový tlmivý roztok ( $0,025 \text{ mol/dm}^3$ ), pH 4,5, bunky kvasiniek ( $10\text{--}200 \text{ }\mu\text{g}$  suchej hmotnosti) a sacharózu ( $0,1 \text{ mol/dm}^3$ ) pri 30 °C 5 minút. Reakcia sa zastavila vložení skúmaviek na 2 min do vriaceho vodného kúpeľa s nasledujúcim ochladením v ľade. Bunky sa oddelili centrifugáciou a supernatant sa použil na stanovenie glukózy komerčným enzýmovým BIO-Lachema testom. Aktivita  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy sa vyjadrila ako množstvo enzýmu v 1 mg sušiny, ktoré zhydrolyzuje 1  $\mu\text{mol}$  sacharózy za minútu za uvedených experimentálnych podmienok (U/mg).

## Výsledky a diskusia

*$\alpha$ -glukozidáza priemyselných kmeňov a ich meiotických produktov.* Aby sa zistil spôsob regulácie  $\alpha$ -glukozidázy v priemyselných kmeňoch pekárskych kvasiniek, nechali sa bunky týchto mikroorganizmov rásť v polosyntetickom médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka a energie maltózu, sacharózu, nízku a vysokú koncentráciu glukózy. Po 16 až 20 h raste sa bunky premyli a aktivita intracelulárnej  $\alpha$ -glukozidázy sa stanovila v extrakte mechanicky rozbitých buniek.

Zistilo sa, že maximum aktivity  $\alpha$ -glukozidázy sa dá pozorovať pri všetkých testovaných kmeňoch kvasiniek po ich raste na maltóze (tab. 1), ktorá je súčasne substrátom i induktorom syntézy enzýmu. Bunky kmeňov vyrastených v prítomnosti nereprimujúcich koncentrácií sacharózy, resp. glukózy boli schopné syntetizovať  $\alpha$ -glukozidázu i v neprítomnosti maltózy. Aktivita konštitutívne syntetizovanej  $\alpha$ -glukozidázy bola kmeňovo závislá a dosiahla maximum u *S. cerevisiae* F a M. Minimálna hladina  $\alpha$ -glukozidázy sa tvorila u *S. cerevisiae* D a B, kde jej aktivita nedosiahla ani 10 % aktivity nameranej po raste buniek na maltóze. Tieto kmene možno preto pokladať za kmene s indukčnou syntézou  $\alpha$ -glukozidázy, čo je v súlade aj s indukčnou povahou ich maltózopermeázy [11]. Bez ohľadu na indukčnú, resp. konštitutívnu

Tabuľka 1. Aktivita  $\alpha$ -glukozidázy buniek priemyselných kmeňov pekárskeho kvasiniek vyrastených na rôznych substrátoch  
 Table 1. Activity of  $\alpha$ -glucosidase in the cells of industrial strains of baker's yeast grown on different substrates

Kmeň <sup>1</sup>	Aktivita $\alpha$ -glukozidázy [ $\mu$ mol PNPG/min/mg bielkovín] <sup>2</sup>			
	maltóza <sup>3</sup> [20 g/l]	sacharóza <sup>4</sup> [20 g/l]	glukóza <sup>5</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>5</sup> [100 g/l]
<i>S. cerevisiae</i> D	3,42	0,03	0,05	0,02
<i>S. cerevisiae</i> L	3,72	0,86	0,96	0,03
<i>S. cerevisiae</i> S	4,49	0,42	0,41	0,02
<i>S. cerevisiae</i> O	1,46	0,45	0,31	0,04
<i>S. cerevisiae</i> F	3,96	1,21	0,81	0,03
<i>S. cerevisiae</i> G	3,75	0,52	0,41	0,06
<i>S. cerevisiae</i> B	3,89	0,21	0,16	0,02
<i>S. cerevisiae</i> M	3,67	1,16	0,54	0,07

<sup>1</sup>Strain; <sup>2</sup>Activity of  $\alpha$ -glucosidase ( $\mu$ mol PNPG/min/mg of proteins; PNPG — *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside); <sup>3</sup>Maltose; <sup>4</sup>Saccharose; <sup>5</sup>Glucose.

Tabuľka 2. Aktivita  $\alpha$ -glukozidázy v meiotických produktoch kmeňov *S. cerevisiae* B a *S. cerevisiae* S

Table 2. Activity of  $\alpha$ -glucosidase in meiotic products of the strains *S. cerevisiae* B and *S. cerevisiae* S

Klon <sup>1</sup>	MAT <sup>2</sup>	Sporu- lácia <sup>3</sup>	Aktivita $\alpha$ -glukozidázy <sup>4</sup> [ $\mu$ mol PNPG/min/mg <sup>4</sup> bielkovín] <sup>4</sup>	
			glukóza <sup>5</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>5</sup> [100 g/l]
<i>S. cerevisiae</i> B		+	0,16	0,02
<i>S. cerevisiae</i> B1A	a		0,14	0,12
<i>S. cerevisiae</i> B1B	a		0,10	0,05
<i>S. cerevisiae</i> B1C		+	0,06	0,09
<i>S. cerevisiae</i> B4A	$\alpha$		0,02	0,03
<i>S. cerevisiae</i> B4B	a		0,16	0,11
<i>S. cerevisiae</i> B5A		+	0,06	0,09
<i>S. cerevisiae</i> B5C	a		0,04	0,09
<i>S. cerevisiae</i> B5D	a		0,05	0,11
<i>S. cerevisiae</i> B6A	a		0,20	0,13
<i>S. cerevisiae</i> S		+	0,41	0,02
<i>S. cerevisiae</i> S1A	$\alpha$		0,07	0,11
<i>S. cerevisiae</i> S13A	$\alpha$		0,07	0,03
<i>S. cerevisiae</i> S14A	a		0,93	0,31
<i>S. cerevisiae</i> S15A	$\alpha$		0,06	0,12
<i>S. cerevisiae</i> S21A	$\alpha$		0,09	0,14
<i>S. cerevisiae</i> S31A	$\alpha$		0,19	0,15
<i>S. cerevisiae</i> S34A	a		0,35	0,29

<sup>1</sup>Clone; <sup>2</sup>Mating type allele; <sup>3</sup>Sporulation; <sup>4</sup>Activity of  $\alpha$ -glucosidase [ $\mu$ mol PNPG/min/mg of proteins] (PNPG — *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside); <sup>5</sup>Glucose.

charakter, syntéza  $\alpha$ -glukozidázy všetkých študovaných kmeňov bola silne reprimovaná rastom v prítomnosti vysokej koncentrácie glukózy a dosahovala iba 1 až 2 % maximálnej aktivity (tab. 1).

Štúdiom metabolickej premeny  $\alpha$ -glukozidázy sa zistilo, že tento enzým na rozdiel od maltózopermeázy [11] je stabilný a nepodlieha rýchlej inaktivácii. Bunky kmeňov *S. cerevisiae* O resp. M inkubované vo fosfátovom tlmivom roztoku (0,05 mol/dm<sup>3</sup>), pH 6,8, 24 hodín pri 30 °C mali v porovnaní s kontrolou aktivitu  $\alpha$ -glukozidázy nezmenenú.

V snahe objasniť genetické pozadie syntézy  $\alpha$ -glukozidázy sa sledovala aktivita konštitutívne tvorenej  $\alpha$ -glukozidázy a jej citlivosť na glukózovú represiu i v meiotických produktoch vybraných priemyselných kmeňov kvasiniek. Vzhľadom na vysokú letalitu spór a nízku frekvenciu sporulácie priemyselných kmeňov spôsobenú ich polyploidným charakterom, bolo možné enzýmu zodpovedajúce aktivity stanoviť iba v neúplných tetrádach (tab. 2 a 3).

Tabuľka 3. Aktivita  $\alpha$ -glukozidázy v meiotických produktoch kmeňa *S. cerevisiae* M  
Table 3. Activity of  $\alpha$ -glucosidase in meiotic products of the strain *S. cerevisiae* M

Klon <sup>1</sup>	MAT <sup>2</sup>	Sporulácia <sup>3</sup>	Aktivita $\alpha$ -glukozidázy [ $\mu$ mol PNPg/min/mg bielkovín] <sup>4</sup>	
			glukóza <sup>5</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>5</sup> [100 g/l]
<i>S. cerevisiae</i> M		+	0,54	0,07
<i>S. cerevisiae</i> M2A	a		1,26	0,44
<i>S. cerevisiae</i> M2B	a		2,16	0,08
<i>S. cerevisiae</i> M2C		+	0,67	0,05
<i>S. cerevisiae</i> M4A	a		0,24	—
<i>S. cerevisiae</i> M4B	a		0,32	—
<i>S. cerevisiae</i> M6A	a		0,35	—
<i>S. cerevisiae</i> M6C	a		0,58	—
<i>S. cerevisiae</i> M6D		+	0,69	0,10
<i>S. cerevisiae</i> M7A	$\alpha$		0,03	—
<i>S. cerevisiae</i> M7B	a		1,48	—
<i>S. cerevisiae</i> M8A	a		0,67	—
<i>S. cerevisiae</i> M8B	a		0,03	—
<i>S. cerevisiae</i> M8C	a		1,53	—
<i>S. cerevisiae</i> M8D	$\alpha$		0,73	—
<i>S. cerevisiae</i> M9A	$\alpha$		0,41	—
<i>S. cerevisiae</i> M9B	a		0,47	—
<i>S. cerevisiae</i> M9C	a		0,16	—
<i>S. cerevisiae</i> M10B		+	1,79	0,08
<i>S. cerevisiae</i> M11A	a		0,69	—
<i>S. cerevisiae</i> M11B	a		0,15	—
<i>S. cerevisiae</i> M13A		+	1,51	—
<i>S. cerevisiae</i> M15A	a		0,21	—
<i>S. cerevisiae</i> M15C		+	1,47	0,05
<i>S. cerevisiae</i> M17A	a		0,88	—

<sup>1-5</sup> See Table 2.

Analýza aktivity  $\alpha$ -glukozidázy v meiotických produktoch kmeňa *S. cerevisiae* B potvrdila indukčný charakter jej syntézy pri tomto kmeni. Z 10 analyzovaných meiotických produktov sa nenašiel ani jeden, kde by konštitutívna aktivita  $\alpha$ -glukozidázy výrazne prevýšila aktivitu materského polyploidného kmeňa.

Komplexnejšie genetické pozadie syntézy  $\alpha$ -glukozidázy sa pozorovalo v prípade kmeňov *S. cerevisiae* S a *S. cerevisiae* M (tab. 2 a 3). Po sporulácii oboch kmeňov vznikli meiotické produkty väčšinou s konštitutívnym fenotypom, objavil sa však i fenotyp indukčný (S1A, S13A, S15A, S21A, M7A, M8B, M9C, M11B, M15A). U *S. cerevisiae* S zo 7 životaschopných spór z 34 analyzovaných tetrád sa iba v prípade spóry S14A zistila aktivita  $\alpha$ -glukozidázy signifikantne vyššia ako aktivita polyploidného kmeňa (tab. 1).

Oveľa vyššia frekvencia meiotických produktov s aktivitou konštitutívne syntetizovanej  $\alpha$ -glukozidázy vyššou ako v materskom polyploidnom kmeni sa pozorovala u kvasiniek *S. cerevisiae* M (tab. 3). Hoci zvýšená konštitutívne tvorená hladina  $\alpha$ -glukozidázy produktov meiózy kmeňa M sa viazala väčšinou na bunky párovacieho typu MATa, objavili sa i pohlavne neaktívne, sporujúce klony s aktivitou enzýmu približne trikrát vyššou ako mal základný kmeň *S. cerevisiae* M. Syntéza  $\alpha$ -glukozidázy v týchto klonoch bola však citlivá na glukózovú represiu a dosahovala aktivitu zodpovedajúcu polyploidnému kmeňu. Z pohlavne aktívnych meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M, charakteristických konštitutívnou nadprodukciou  $\alpha$ -glukozidázy, sa podrobnejšie študoval iba klon M2A. Zistilo sa, že pri tomto klone je syntéza  $\alpha$ -gluko-

Tabuľka 4. Aktivita  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy buniek priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek vyrastených za derepresných a represných podmienok  
Table 4. Activity of  $\beta$ -D-fructofuranosidase in the cells of industrial strains of baker's yeast grown under the non-repressive and repressive conditions

Kmeň <sup>1</sup>	Aktivita $\beta$ -D-fruktofuranozidázy [U/mg suš] <sup>2</sup>	
	glukóza <sup>3</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>3</sup> [100 g/l]
<i>S. cerevisiae</i> D	3,51	0,13
<i>S. cerevisiae</i> L	1,21	0,18
<i>S. cerevisiae</i> S	1,20	0,37
<i>S. cerevisiae</i> O	2,00	0,10
<i>S. cerevisiae</i> F	1,26	0,18
<i>S. cerevisiae</i> G	2,12	0,22
<i>S. cerevisiae</i> B	3,07	0,28
<i>S. cerevisiae</i> M	3,64	0,34

<sup>1</sup>Strain; <sup>2</sup>Activity of  $\beta$ -D-fructofuranosidase [U/mg of dry wt]; <sup>3</sup>Glucose.



zidázy výrazne rezistentná proti katabolickej represii, ktorej pleiotropný charakter sa pozoroval aj v prípade  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy.

V snahe zvýšiť hladinu konštitutívne tvorenej  $\alpha$ -glukozidázy na úrovni kvasiniek rastúcich na maltóze (tab. 1), podrobil sa kmeň M2A mutačnému šľachteniu. Po chemickej mutagenéze s etylmetylsulfonátom (EMS) sa selektovali mutantné klony rezistentné proti analógu glukózy, 2-deoxy-D-glukóze, resp. D-glukozamínu, slúžiacim ako nemetabolizovateľné katabolické represory [24, 25]. Z 23 selektovaných a podrobnejšie analyzovaných mutantov však ani jeden nemal aktivitu konštitutívne syntetizovanej  $\alpha$ -glukozidázy za derepresných alebo represných podmienok vyššiu ako klon M2A. Vzhľadom na to, že tento klon mal bunkový obsah DNA viac ako dvakrát vyšší v porovnaní s haploidnými kmeňmi kvasiniek, je pravdepodobné, že za fenotyp rezistencie sú zodpovedné mutácie cytoplazmatického charakteru [26] nesúvisiace s mechanizmom katabolickej represie [27].

Relatívne vysoká aktivita konštitutívne tvorenej  $\alpha$ -glukozidázy v bunkách klonu M2A sa ukázala byť recesívna. Po krížení kmeňa M2A s maltózonegatívnym kmeňom DPI-1B/514 vznikol hybrid MDP, ktorého bunky stratili konštitutívny charakter syntézy  $\alpha$ -glukozidázy. Jej aktivitu (0,15  $\mu$ mol PNPG/min/mg bielkovín) v bunkách MDP sa nepodarilo zvýšiť mutáciou ani mitotickou rekombináciou indukovanou fyzikálnymi mutagénmi, UV-žiarením, resp.  $\gamma$ -žiarením. Neúspešné boli aj pokusy, ktorých cieľom bolo meiózou alebo mitotickou haploidizáciou pripraviť z hybridu MDP klony pohlavia MAT $\alpha$ , ktoré by mali znaky hyperprodukcie  $\alpha$ -glukozidázy podobné ako kmeň M2A.

*$\beta$ -D-fruktofuranozidáza priemyselných kmeňov a ich meiotických produktov.* Bunky laboratórneho i priemyselných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae* po 24 h raste v polosyntetickej pôde obsahujúcej ako zdroj uhlíka a energie glukózu (5 g/l, resp. 100 g/l), maltózu (20 g/l) alebo sacharózu (20 g/l) sa premyli a podrobili analýze aktivity extracelulárnej  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy. Zistilo sa, že jej aktivita je pri jednotlivých kmeňoch odlišná a je zrejme fenotypickým obrazom ich genotypu. Jej maximum sa stanovilo v bunkách vyrastených za derepresných podmienok v prítomnosti nízkej koncentrácie glukózy (tab. 4), pričom sa tieto aktivity výrazne neodlišovali od aktivít buniek vyrastených na maltóze alebo sacharóze. Konštitutívne syntetizovaná  $\beta$ -D-fruktofuranozidáza podliehala pri všetkých kmeňoch silnej katabolickej represii a po raste v prítomnosti vyšších koncentrácií glukózy dosahovala pri väčšine kmeňov iba 5–10 % maximálnej aktivity stanovenej po raste buniek za derepresných podmienok.

Analýzou DNA buniek študovaných kmeňov sa zistilo, že tieto priemyselné kmene s výnimkou diploidného laboratórneho kmeňa *S. cerevisiae* D sú poly-

Tabuľka 5. Hyperprodukcia  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy a jej rezistencia proti katabolickej represii v meiotických produktoch kmeňa *S. cerevisiae* M

Table 5. Hyperproduction of  $\beta$ -D-fructofuranosidase and its resistance to catabolite repression in meiotic products of the strain *S. cerevisiae* M

Klon <sup>1</sup>	MAT <sup>2</sup>	Sporu- lácia <sup>3</sup>	Aktivita $\beta$ -D-fruktofuranozidázy [U/mg suš.] <sup>4</sup>		Rezistencia buniek <sup>5</sup>	
			glukóza <sup>6</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>6</sup> [100 g/l]	2-deoxy-D- glukóza [0,15 g/l]	D-glukoza- mín [7 g/l]
<i>S. cerevisiae</i> M		+	4,14	0,34	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M2A	a		16,75	8,58	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M2B	a		3,53	0,51	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M2C		+	6,47	0,63	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M3A	a			0,22	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M3B		+		0,77	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M4A	a		7,03	1,83	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M4B	a			0,29	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M6A	a			0,07	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M6B	a		15,63	12,62	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M6C	a			0,35	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M6D		+	7,15	0,68	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M7A	$\alpha$			0,13	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M7B	a		18,27	2,67	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M8A	a		3,69	0,53	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M8B	a			0,33	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M8C	a		16,35	8,73	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M8D	$\alpha$			0,34	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M9A	$\alpha$			0,28	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M9B	a		16,87	8,01	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M9C	a			1,13	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M10A		+		0,74	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M10B		+	5,98	0,33	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M11A	a		2,94	0,11	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M11B	a			0,29	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M11C		+		0,34	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M13A		+	9,29	3,78	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M13B	a			0,44	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M15A	a		11,27	1,46	—	—
<i>S. cerevisiae</i> M15C		+	3,77	0,34	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M17A	a		13,40	4,62	—	+
<i>S. cerevisiae</i> M17B		+		0,38	+	+
<i>S. cerevisiae</i> M17C		+		1,03	+	+

+ / — znamená rast / nerast za uvedenej koncentrácie analóga glukózy; Growth / non-growth under the mentioned concentration of glucose analogue.

<sup>1</sup>Clone; <sup>2</sup>Mating type allele; <sup>3</sup>Sporulation; <sup>4</sup>Activity of  $\beta$ -D-fructofuranosidase [U/mg of dry wt]; <sup>5</sup>Cell resistance; <sup>6</sup>Glucose; <sup>7</sup>2-Deoxy-D-glucose; <sup>8</sup>D-Glucosamine.

ploidné [10]. Biochemické aktivity týchto kmeňov sú preto výsledkom exprese a interakcie génov, ktoré sa v genóme buniek môžu vyskytovať v jednej alebo viacerých alelách. Ich pôvod môže byť prirodzený alebo je výsledkom experimentálneho zásahu. Na objasnenie genetického pozadia syntézy  $\beta$ -D-frukto-

furanozidázy v produkčných kmeňoch kvasiniek sa študovala jej aktivita i v meiotických produktoch vybraných kmeňov *S. cerevisiae* B, S a M.

Zistilo sa, že aktivita  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy závisí od génovej výbavy askospór. Bunky náhodne vybraných meiotických produktov kmeňov *S. cerevisiae* B a S kultivovaných za rovnakých podmienok mali aktivitu  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy v rozsahu 50 až 200 % aktivity pôvodného polyploidného kmeňa. Vo všetkých prípadoch jej syntéza bola citlivá na glukózovú represiu.

Na rozdiel od týchto kmeňov rozsiahlejšia analýza meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M odhalila i existenciu askospór syntetizujúcich  $\beta$ -D-fruktofuranozidázu vo vysokých hladinách, dokonca i v prítomnosti vyšších koncentrácií glukózy (tab. 5). Takéto meiotické produkty sa vyskytovali takmer v každej tetráde a pozoruhodné bolo, že aktivita  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy po raste buniek za derepresných podmienok bola niekedy viac ako dvakrát vyššia v porovnaní so základným kmeňom *S. cerevisiae* M. Väčšina izolovaných spór bola pohlavne aktívna, párovacieho typu prevažne MATa a nesporulovala. Popri nich vznikli i sporulujúce a pohlavne neaktívne meiotické produkty. V niektorých hyperproduktujúcich klonoch aktivita  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy za derepresných podmienok rastu dosahovala hodnoty 15–20 U/mg sušiny, čo je viac ako dvojnásobok aktivity pôvodného kmeňa *S. cerevisiae* M, dosahujúce takto maximum aktivity najlepších  $\beta$ -D-fruktofuranozidázu hyperproduktujúcich kmeňov kvasiniek doteraz opísaných v odbornej literatúre [28–32]. Bunky niektorých klonov, ako M2A, M6B, M8C a M9B, mali aktivitu  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy dokonca aj po raste v prítomnosti vysokej koncentrácie glukózy minimálne trikrát vyššiu, ako bolo maximum ktoréhokoľvek z analyzovaných produkčných kmeňov a takmer 30 až 100-krát vyššiu, ako bola aktivita ich buniek po raste za represných podmienok.

Rezistencia proti katabolickej represii býva často spojená so zmenou citlivosti rastúcich buniek na štruktúrne analógy glukózy, ako sú 2-deoxy-D-glukóza a D-glukózamín. Štúdium vzájomného vzťahu hyperprodukcie  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy, jej rezistencie proti glukózovej represii a citlivosti buniek na analógy glukózy však nepotvrdilo takúto koreláciu. Naopak, väčšina meiotických produktov kmeňa M, schopných vytvoriť vysokú hladinu  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy i za podmienok katabolickej represie, bola dokonca citlivejšia na inhibičný účinok analógov glukózy ako bunky klonov s katabolicky reprimovateľnou  $\beta$ -D-fruktofuranozidázou. Znamená to, že štruktúra receptora, ktorý sa zúčastňuje na mechanizme katabolickej represie, sa môže meniť v smere vzrastu i poklesu jeho afinity ku glukóze, jej analógom alebo ku katabolicky aktívnym produktom ich metabolizmu.

Vychádzajúc z týchto poznatkov pokúsili sme sa stupeň rezistencie proti katabolickej represii syntézy  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy, resp. jej hyperprodukciu ďalej zvýšiť mutačným šľachtením. Bunky klona M2A sa podrobili chemickej

mutagenéze etylmetánsulfonátom (EMS) a mutantné klony rezistentné proti analógom glukózy sa selektovali na deoxyglukózovej, resp. glukozamínovej pôde. Na základe rýchlosti rastu buniek na selekčných pôdach, resp. na polosyntetickej pôde s glukózou sa vybralo 40 nezávisle izolovaných mutantov, ktoré sa podrobili analýze aktivity  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy po raste buniek za represných i derepresných podmienok. Zistilo sa, že napriek fenotypu rezistencie proti 2-deoxy-D-glukóze, D-glukázamínu, resp. obom analógom glukózy súčasne, stupeň nadprodukcie  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy ani stupeň rezistencie proti katabolickej represii kmeňa M2A sa nepodarilo ďalej zvýšiť. Tieto výsledky naznačujú, že mechanizmus rezistencie proti katabolickej represii a nadprodukcia  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy kmeňa M2A je nadradený a odlišný od mechanizmu, ktorý sa uplatňuje v bunkách rezistentných proti štruktúrnym analógom glukózy.

Štiepne pomery v tetradách i úzka spätosť rezistencie proti katabolickej represii s hyperprodukciou  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy v meiotických produktoch kmeňa *S. cerevisiae* M naznačujú, že oba tieto fenotypické znaky kontroluje pravdepodobne ten istý gén. Naviac, povaha tohto génu (génov) je recesívna.

Potvrdila to i biochemicko-genetická analýza hybridu MDP, pripraveného krížením indukovaného, respiračne deficitného klonu M2A so štandardným

Tabuľka 6. Genetické a biochemické vlastnosti nesporulujúcich klonov izolovaných po mitotickej haploidizácii hybridu MDP benomylom  
Table 6. Genetic and biochemical properties of non-sporulating clones isolated after the mitotic haplodization of MDP hybrid induced by benomyl

Klon <i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>	MAT <sup>2</sup>	Rast na minimálnej pôde <sup>3</sup>	Aktivita $\beta$ -D-fruktofuranozidázy [U/mg suš.] <sup>4</sup>	
			glukóza <sup>5</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>5</sup> [100 g/l]
MDP	<i>a/α</i>	+	2,62	0,34
M2A	<i>a</i>	+	16,75	8,57
DPI-1B-514	<i>α</i>	—	0,63	0,30
MDP 1-4	<i>α</i>	—		0,87
MDP 1-11	<i>α</i>	—		0,92
MDP 1-15	<i>α</i>	—		0,22
MDP 1-19	<i>α</i>	+	3,67	1,94
MDP 1-28	<i>α</i>	+	8,42	1,27
MDP 2-8	<i>α</i>	+		0,44
MDP 2-14	<i>a</i>	+		0,53
MDP 2-17	<i>α</i>	+		0,49
MDP 3-2	<i>a</i>	+	8,46	6,44
MDP 3-6	<i>α</i>	+		0,20
MDP 3-17	<i>α</i>	+		0,68
MDP 3-33	<i>α</i>	—		0,20

<sup>1</sup>*S. cerevisiae* clone; <sup>2</sup>Mating type allele; <sup>3</sup>Growth on the minimal medium; <sup>4</sup>Activity of  $\beta$ -D-fructofuranosidase [U/mg of dry wt]; <sup>5</sup>Glucose.

laboratórnym kmeňom DPI-1B/514 a produktov jeho mitotickej haploidizácie. Zistilo sa, že bunky hybridu nie sú schopné nadprodukcie  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy a navyše, jej syntéza bola citlivá na glukózovú represiu (tab. 6). Hoci bunky hybridu MDP sporulovali, nepodarilo sa z neho pripraviť životaschopné spóry. Bunky sa preto podrobili mitotickej haploidizácii indukovanej rastom kmeňa v prítomnosti benomylu (25  $\mu$ g/ml). Po haploidizácii sa objavili klony vyštiepujúce charakteristické znaky jedného i druhého rodiča, čo spolu so sporuláciou potvrdilo hybridný charakter kmeňa MDP. Našli sa tak auxotrofné klony nerastúce na minimálnej syntetickej pôde, ako aj klony rezistentné proti katabolickej represii. S výnimkou klonov MDP 2-14 a MDP 3-2, ktoré boli párovacieho typu MATa, väčšina nesporulujúcich klonov bola pohlavia MAT $\alpha$ , s rôznym stupňom katabolickej represie syntézy  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy, ktorý však v ani jednom z analyzovaných klonov neprevýšil úroveň klonu M2A.

*Rekombinanty kvasiniek S. cerevisiae nadproduktujúce  $\alpha$ -glukozidázu a  $\beta$ -D-fruktofuranozidázu. Výsledky práce prinášajú nové poznatky o regulácii metabolismu maltózy a sacharózy v priemyselných kmeňoch pekárskych kvasiniek. Ukazujú, že pri väčšine produkčných kmeňoch na rozdiel od laboratórných*

Tabuľka 7. Meiotické produkty kvasiniek *S. cerevisiae* nadproduktujúce  $\alpha$ -glukozidázu a  $\beta$ -D-fruktofuranozidázu

Table 7. Meiotic products of the yeast *S. cerevisiae* over-producing  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -D-fructofuranosidase

Kmeň <sup>1</sup>	MAT <sup>2</sup>	Sporulácia <sup>3</sup>	Aktivita			
			$\alpha$ -glukozidázy [ $\mu$ mol PNPG/min/mg bielkovín] <sup>4</sup>		$\beta$ -D-fruktofuranozidázy [U/mg suš.] <sup>5</sup>	
			glukóza <sup>6</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>6</sup> [100 g/l]	glukóza <sup>6</sup> [5 g/l]	glukóza <sup>6</sup> [100 g/l]
<i>S. cerevisiae</i> M2B	a	+	2,16	0,08		
<i>S. cerevisiae</i> M10B		+	1,79	0,08		
<i>S. cerevisiae</i> M15C		+	1,47	0,05		
<i>S. cerevisiae</i> M6B	a				15,63	12,62
<i>S. cerevisiae</i> M9B	a				16,87	8,01
<i>S. cerevisiae</i> M15A	a				11,27	1,46
<i>S. cerevisiae</i> M17A	a				13,40	4,62
<i>S. cerevisiae</i> M2A	a		1,26	0,44	16,75	8,58
<i>S. cerevisiae</i> M6D		+	0,69	0,10	7,15	0,68
<i>S. cerevisiae</i> M7B	a		1,48		18,27	2,67
<i>S. cerevisiae</i> M8C	a		1,53		16,35	8,73
<i>S. cerevisiae</i> M13A		+	1,51		9,29	3,78

<sup>1</sup>Strain; <sup>2</sup>Mating allele type; <sup>3</sup>Sporulation; <sup>4</sup>Activity of  $\alpha$ -glucosidase [ $\mu$ mol PNPG/min/mg of proteins] (PNPG — *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside); <sup>5</sup>Activity of  $\beta$ -D-fructofuranosidase [U/mg of dry wt]; <sup>6</sup>Glucose.

má syntéza  $\alpha$ -glukozidázy i  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy konštitutívny charakter, pričom je silne reprimovaná vyššími koncentráciami skvasiteľných cukrov. Syntéza oboch enzýmových systémov je pod komplexnou genetickou kontrolou, ktorá sa diferenciálne prejavuje v rôznych kmeňoch, resp. meiotických produktoch s rozdielnou genetickou komplexnosťou.

Výsledky práce demonštrujú aj to, že genetickou manipuláciou a racionálnym výberom priemyselných kmeňov, resp. produktov ich meiózy možno pripraviť úplne nové kombinácie génov, ktoré u kvasiniek kontrolujú nadprodukciiu  $\alpha$ -glukozidázy,  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy, resp. ich rezistenciu proti represnému účinku glukózy a jej katabolitov. Takéto kmene (tab. 7) predstavujú zdroj vhodnej biomasy na izoláciu  $\alpha$ -glukozidázy, resp.  $\beta$ -D-fruktofuranozidázy [33] a ekonomicky zvýhodňujú nielen prípravu ich enzýmových koncentrátov, ale aj technologické postupy, v ktorých sa enzýmy aplikujú. Navyše, takéto kmene význačných vlastností sú potenciálnym zdrojom genetickej informácie žiadaných vlastností a dajú sa využiť pri rekombinačnom šľachtení a konštrukcii nových, priemyselne významných kmeňov kvasiniek [34].

#### Literatúra

1. BURROWS, S., In: *Economic Microbiology*. Vol. 4. Ed.: A. H. Rose. London, Academic Press 1979, s. 31.
2. OURA, E. — SUOMALAINEN, H. — VISKARI, R., In: *Economic Microbiology*. Vol. 7. Ed.: A. H. Rose. Oxford, Academic Press 1982, s. 87.
3. SAUNDERS, R. M. — NAG, H. — KLINE, L., *Cereal Chem.*, 49, 1972, s. 86.
4. REED, G. — PEPPLER, H. J.: *Yeast Technology*. Westport, The AVI Publ. Co. Inc. 1973.
5. HAMPL, J. — HOLÝ, Č. — HAVEL, F. — KADLEC, F. — PŘÍCHODOVÁ, J.: *Jakost pekárenských a cukrárenských výrobků*. Praha, SNTL 1981.
6. ŠUBÍK, J. — OBERNAUEROVÁ, M., *Kvasný Prům.*, 31, 1985, č. 6, s. 135.
7. OBERNAUEROVÁ, M. — ŠUBÍK, J., *Kvasný Prům.*, 33, 1987, č. 4, s. 108.
8. OBERNAUEROVÁ, M.: *Vplyv biochemických vlastností a genetického pozadia produkčných kmeňov na kvalitu pekárskoho droždia*. (Ašpirantské minimum). Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1985.
9. ŠUBÍK, J., *Bull. PV (Bratislava)*, 23 (3), 1984, č. 1, s. 11.
10. ŠUBÍK, J. — DUDÍKOVÁ, E. — GBELSKÁ, Y. — JURÍKOVÁ, K. — LEŠKOVÁ, Z. — OBERNAUEROVÁ, M. — TAKÁCSOVÁ, G. — HALÁDOVÁ, K.: *Výskum optimalizácie biochemických vlastností pekárskych kvasiniek genetickými metódami*. (Výskumná správa). Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1983.
11. ŠUBÍK, J. — OBERNAUEROVÁ, M. — GBELSKÁ, Y., *Sbor. ÚVTIZ — Potr. Vědy*, 1, 1983, s. 87.
12. ŠUBÍK, J. — BEHÚŇ, M. — ŠMUGÁŇ, P. — MUSÍLEK, V., *Biochim. biophys. Acta*, 343, 1974, s. 363.

13. FINK, G. R.: *Methods in Enzymol.*, 17A, 1970, s. 59.
14. DAVIES, P. J. — EVANS, W. E. — PARRY, J. M., *Mutat. Res.*, 29, 1975, s. 301.
15. PRESCOTT, D. M.: *Methods in Cell Biology*. Vol. 11. Yeast Cell. New York—San Francisco—London, Academic Press 1975.
16. ŠUBÍK, J. — KOVÁČOVÁ, U. — TAKÁČSOVÁ, G., *Eur. J. Biochem.*, 73, 1977, s. 275.
17. GJERMENSEN, C. — SIGSGAARD, P., *Carlsberg Res. Commun.*, 46, 1981, s. 1.
18. HASTIE, A. C.: *Nature*, 226, 1970, s. 771.
19. KAPPAS, A. — GEORGOPOULOS, S. G. — HASTIR, A. C., *Mutat. Res.*, 26, 1974, s. 17.
20. Van WIJK, R. — OUWEHAND, J. — van de BOS, T. — KONIGSBERGER, V. V., *Biochim. biophys. Acta*, 186, 1969, s. 178.
21. NEEDLEMAN, R. B. — FEDEROFF, H. J. — ECCLESHALL, T. R. — BUCHFERER, B. — MARMUR, J., *Biochemistry*, 17, 1978, s. 4657.
22. LOWRY, O. U. — ROSENBOROUGH, N. J. — FARR, A. L. — RANDALL, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, s. 265.
23. GROSSMANN, M. K. — ZIMMERMANN, F. K., *Mol. gen. Genet.*, 175, 1979, s. 223.
24. WITTI, I. — KRONAU, R. — HOLZER, H., *Biochim. biophys. Acta*, 118, 1966, s. 522.
25. FURST, A. — MICHELS, C. A., *Mol. gen. Genet.*, 155, 1977, s. 309.
26. KUNZ, B. A. — BALL, A. J. S., *Mol. gen. Genet.*, 156, 1977, s. 169.
27. GANCEDO, J. M. — GANCEDO, C., *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 1986, s. 179.
28. HACKEL, R. A. — KHAN, N. A., *Mol. gen. Genet.*, 164, 1978, s. 295.
29. ZIMMERMANN, F. K. — SCHEEL, I., *Mol. gen. Genet.*, 154, 1977, s. 75.
30. MONTENECOURT, B. S. — KUO, S. C. — LAMPEN, J. O., *J. Bacteriol.*, 114, 1973, s. 233.
31. SCHAMHART, D. H. J. — ten BERGE, A. M. A. — van de POLL, K. W., *J. Bacteriol.*, 121, 1975, s. 747.
32. ABRAMS, B. B. — HACKEL, R. — MIZUNAGA, T. — LAMPEN, J. O., *J. Bacteriol.*, 135, 1978, s. 809.
33. OBERNAUEROVÁ, M. — ŠUBÍK, J., *Kvasný Prům.*, 32, 1986, č. 11, s. 294.
34. ŠUBÍK, J. — DUDÍKOVÁ, E. — GBELSKÁ, Y. — GRECO, G. — JURÍKOVÁ, K. — LEŠKOVÁ, Z. — OBERNAUEROVÁ, M. — HALÁSOVÁ, K. — HUNČÍKOVÁ, S. — ZAVŘELOVÁ, M. — ROESSEL, O., *Príprava a vlastnosti hybridných kmeňov pekárskych kvasiniek. (Výskumná správa)*. Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1985.

Регулирование  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -D-фруктофуранозидазы в промышленных штаммах хлебопекарных дрожжей и подготовка рекомбинантов, перепроизводящих упомянутые энзимы

#### Резюме

После роста в условиях снижения и неснижения активности ферментов мы определяли активность  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -D-фруктофуранозидазы в серии полиплоидных промышленных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, а также в продуктах их мейозиса. Из них были изолированы клоны с различной чувствительностью по отношению к катаболическому снижению активности фермента, характеристические своим выразительным

перепроизводством  $\alpha$ -глюкозидазы и  $\beta$ -D-фруктофуранозидазы. Такие штаммы применимы в промышленной подготовке вышеприведенных энзимов, а также в гибридизационной селекции хлебопекарных дрожжей.

**Regulation of  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -D-fructofuranosidase in industrial strains of baker's yeast and the preparation of recombinants over-producing these enzymes**

Summary

The activities of  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -D-fructofuranosidase were determined in the set of polyploid industrial strains of yeast *S. cerevisiae* and their meiotic products grown under repressive and non-repressive conditions. Clones with different sensitivity to catabolite repression and characteristic with significant over-production of  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -D-fructofuranosidase were isolated from them. Such strains can be used in the industrial production of these enzymes, as well as in the strain improvement of baker's yeast by hybridization.