

Šľachtenie priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek

JÚLIUS ŠUBÍK – MARGITA OBERNAUEROVÁ – YVETTA GBELSKÁ – EDITA DUDÍKOVÁ – GIZELA GRECO – KATARÍNA JURÍKOVÁ – ZUZANA LEŠKOVÁ

Súhrn. Racionálne rekombinačné šľachtenie pekárskych kvasiniek sa robilo na základe výsledkov podrobného štúdia biochemických, genetických a technologických vlastností série priemyselných kmeňov a produktov ich meiózy. Vyšľachtilo sa 29 hybridných kmeňov, z ktorých väčšina skvasovala maltózu o viac ako 40 % rýchlejšie, resp. mala kvasnú aktivitu v ceste o 10 až 30 % vyššiu a menej závislú od prídavku exogénnej sacharózy ako štandardné droždiarske kmene analyzované za tých istých podmienok.

* Význačné vlastnosti najlepších hybridov sa úspešne overili aj za podmienok priemyselnej výroby droždia.

Na prípravu pekárskeho droždia sa s úspechom využívajú produkčné kmene kvasiniek rodu *Saccharomyces*. Tieto priemyselné kmene musia spĺňať požiadavky výrobcov droždia i jeho užívateľov. Mali by mať preto maximálnu výťažnosť biomasy na zdrojoch uhlíka a energie, mali by mať čo najkratší generačný čas pri kultivácii v prirodzených melasových pôdach, mali by mať maximálnu kvasnú aktivitu v ceste, mali by byť osmotolerantné, odolné proti dehydratácii a mali by mať maximálnu trvanlivosť [1-3]. Tieto vlastnosti, ktoré sú vo svojej podstate niekedy antagonistické, sú dané genetickou informáciou bunky produkčného kmeňa a významne ich ovplyvňujú aj bioinžinierske faktory spôsobu výroby droždia [2, 3].

Optimálne biotechnologické vlastnosti priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek sú determinované celým súborom génov, čo značne komplikuje ich šľachtiteľský program. Navyše viaceré vlastnosti sú kvantitatívneho charakteru a ťažko sa dajú analyzovať klasickými genetickými metódami. Iné problémy šľachtenia kvasiniek súvisia s ich aneuploidným a polyploidným charakte-

RNDr. Július Šubík, CSc., Ing. Margita Obernauerová, CSc., RNDr. Yvetta Gbelská, CSc., Ing. Edita Dudíková, RNDr. Gizela Greco, CSc., RNDr. Katarína Juríková, Zuzana Lešková, prom. chem., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

rom, ako aj s tým, že doterajšie informácie o biochemických základoch ich technologických vlastností sú nedostatočné [3–6].

Väčšina mutácii kvasiniek ma recesívny charakter. Ich fenotyp sa preto nemôže v polyploidných priemyselných kmeňoch prejavíť, kým sa tieto mutácie budú vyskytovať v bunke v heterozygotnom stave [7]. Z týchto a už uvedených dôvodov sa mutačné šľachtenie priemyselných kvasiniek [8–11] využíva v oveľa menšej miere ako hybridizačné.

Pre pekársky priemysel sa nádejné polyploidné kmene získali krížením pekárskoho a pivovarského droždia [12, 13], resp. hybridizáciou liehovarských kvasiniek [14–17]. Hybridy vzniknuté krížením *S. cerevisiae* a *S. carlsbergensis* mali vlastnosti normálnych pekárskych kvasiniek, ale fermentovali aj rafinózu [18, 19]. Žiadanou vlastnosťou priemyselných kmeňov je aj osmotolerancia odrážajúca sa v dobrej kvasnej aktivite droždia v ceste na jemné pečivo [20, 21]. Jej rozsiahlejším štúdiom sa zaoberali najmä Windisch a kol. [22–24], ktorí pripravili celú sériu osmotolerantných kvasiniek. U nás sa hybridizačným šľachtením a selekciou vhodného kmeňa pre pekársky priemysel zaoberali Sedlárová a kol. [25–27]. Izolovali hybridné kmene *S. cerevisiae*, ktoré v laboratórnych podmienkach mali vysokú aktivitu v ceste a niektoré z nich sa uplatnili aj v priemysle. Niekoľko sľubných hybridov pekárskych kvasiniek vzniklo i v Poľsku [9]. Pozornosť si zaslúži i šľachtenie pekárskych kvasiniek vo firmách Gist-Brocades a Dest. Co. Ltd., kde sa príprava sušeného droždia na báze nových kmeňov stala predmetom viacerých patentov [18, 28, 29]. Aktívne droždie sa získalo i kombináciou špeciálnych sušiarenských procesov a nových hybridov kvasiniek [30–34]. Napriek tomu, že pri získavaní hybridov kvasiniek pre priemyselné účely sa dosiahli výrazné úspechy [31, 32], existuje iba málo údajov o tom, ako sa k týmto výsledkom dospelo. Je pravdepodobné, že sa používali najmä empirické metódy [2, 3].

Predmetom tejto práce je získanie nových hybridných kmeňov pekárskych kvasiniek vyznačujúcich sa zvýšenou aktivitou skvasovania maltózy, ako aj zvýšenou kvasnou aktivitou v ceste, pričom ich iné technologické vlastnosti by nemali byť v porovnaní so štandardnými produkčnými kmeňmi trenčianskej droždiarne horšie.

Materiál a metódy

V práci sa použili tieto kmene kvasiniek, pochádzajúce zo zbierky mikroorganizmov Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave, resp. Slovniku, n.p., Trenčín:

S. cerevisiae D (kmeň DTXII) – prototrofný laboratórny diploidný kmeň, priemyselné kmene pekárskych kvasiniek *S. cerevisiae* L (kmeň V, Slovlik, n.p., Trenčín), *S. cerevisiae* S (kmeň VG FETT D/80, Slovlik, n.p., Trenčín), *S. cerevisiae* O (kmeň OOSF-RH/81, Slovlik, n.p., Trenčín), *S. cerevisiae* T (produkčný kmeň trebišovskej droždiarne), *S. cerevisiae* F, *S. cerevisiae* G, *S. cerevisiae* B a *S. cerevisiae* M (izoláty fínskeho, holandského, belgického a maďarského expedičného droždia), ako aj haploidné kmene mutantov *S. cerevisiae* DPI-1B/514 (MAT α , his 1, trp1, ρ^+ , E $_{514}^R$), X 2180A (MAT α , SUC 2, gal 2, CUP 1), X 2180B (MAT α , SUC 2, gal 2, CUP 1), IC 8 (MAT α , leu 1, kar 1 ρ^+) a IC 11 (MAT α his 4, kar 1 ρ^+).

Spôsob kultivácie a kultivačné médiá, metódy prípravy a detekcie mitochondriálnych mutantov, konjugácie buniek, prípravy a fúzie protoplastov, sporulácie a izolácie tetrád, indukcie mitotickej haploidizácie, stanovenia párovacieho typu buniek, ploidie buniek, ako aj metódy extrakcie a stanovenia DNA, β -D-fruktofuranozidázy, maltózo-permeázy, α -glukozidázy, glukózy, bielkovín, sušiny, fermentačnej aktivity v roztokoch a kvasnej aktivity droždia v ceste sú podrobne opísané v predchádzajúcich prácach [35–38]. Aktivita β -fruktofuranozidázy sa pre operatívnejšie porovnávanie s literatúrnymi hodnotami udáva v medzinárodných jednotkách enzýmovej aktivity U. Ich prepočet na jednotky enzýmovej aktivity v SI sústave je daný rovnicou $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$.

Výsledky a diskusia

Stratégia šľachtenia pekárskych kvasiniek

Optimum kvasnej schopnosti droždia v ceste podmieňujú tieto vlastnosti kvasiniek [2, 7]: 1. rýchly transport cukrov do bunky a jej schopnosť rýchlej adaptácie na meniace sa substráty, 2. vysoká aktivita hydroláz disacharidov a vyšších glukofruktózanov cesta, 3. vysoký stupeň glykolytickej aktivity, 4. vysoká schopnosť skvasovania maltózy, 5. schopnosť rásť a syntetizovať enzýmy, resp. koenzýmy za anaeróbných podmienok. Trvanlivosť droždia súvisí s obsahom zásobných sacharidov bunky a výrazne ju ovplyvňuje vedenie fermentačného procesu, resp. fyziologický stav buniek [39–41]. Z uvedeného vyplýva, že technologické a biochemické vlastnosti dobrého pekárskeho droždia sú podmienené nie jedným, ale celou škálou génov. Preto šľachtiteľský program pekárskych kvasiniek sa nemôže obmedzovať iba na mutačné šľachtenie, ale sa zakladá prevažne na princípoch hybridizačného šľachtenia.

Racionálne šľachtenie pekárskych kvasiniek na zvýšenú kvasnú aktivitu v ceste a lepšie skvasovanie maltózy, opísané v tejto práci, vychádzalo zo štúdia biochemického a genetického pozadia technologických vlastností série priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek domácej i zahraničnej proveniencie. Zakladalo sa na [42]:

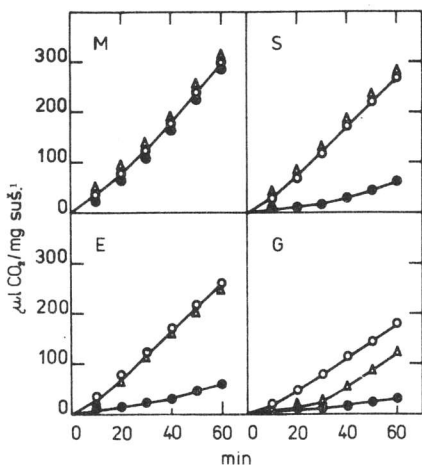
1. výbere rodičovských kmeňov vyznačujúcich sa najmä
 - a) zvýšenou aktivitou enzýmov katabolizmu maltózy a sacharózy,
 - b) zvýšenou kvasnou aktivitou v ceste bez alebo s prídavkom exogénnej sacharózy,
 - c) rezistenciou proti katabolickej repressii;
2. hybridizácii rodičovských kmeňov postupom podľa autorského osvedčenia č. 234 884/85, ktorý sa dá použiť aj v prípade prototrofných a sexuálne inkompatibilných rodičov [38, 43];
3. výbere preklonovaných hybridných kmeňov, ktoré po kultivácii v polysyntetickej pôde s glukózou mali popri dobrých rastových výťažkoch a zodpovedajúcom generačnom čase v porovnaní so štandardným priemyselným kmeňom zvýšenú kvasnú aktivitu v ceste, resp. rýchlejšie skvasovali maltózu za anaeróbných podmienok;
4. výbere hybridných kmeňov, ktoré si zachovali tieto význačné vlastnosti aj po prítokovej kultivácii v melasových pôdach v laboratórnom, resp. priemyselnom rozsahu.

Kvasná aktivita pekárskych kvasiniek

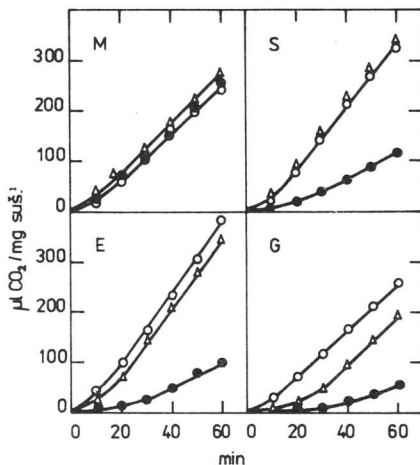
Z podrobného štúdia kvasnej aktivity v ceste za použitia ôsmich priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek vyrastených na rôznych zdrojoch uhlíka a energie (glukóza 5 g.l⁻¹, glukóza 100 g.l⁻¹, sacharóza 20 g.l⁻¹, maltóza 20 g.l⁻¹) v korelácii s glykolytickou aktivitou buniek a ich schopnosťou skvasovať sacharózu a maltózu vyplynulo, že rýchlosť skvasovania prirodzených cukrov cesta – glukózy, maltózy a sacharózy [44] popri genetickej determinovanosti výrazne závisí aj od fyziologického stavu buniek [35, 45].

Typický obraz manometricky stanovenej produkcie CO₂ bunkami štandardných kmeňov *S. cerevisiae* S a *S. cerevisiae* O znázorňujú obr. 1 a 2 a v kvalitatívnych črtách bol podobný pri všetkých priemyselných kmeňoch *S. cerevisiae* D, L, B, F, M [35].

Zistilo sa, že maximum kapacity glykolytickej dráhy ($Q_{CO_2}^{N2}$ s glukózou ako substrátom) dosiahnu iba bunky pekárskych kvasiniek vyrastené za derepresných podmienok pri nízkej koncentrácii zdroja uhlíka (glukózy, sacharózy alebo maltózy). Množstvo CO₂, vytvorené za jednotku času skvasovaním sa-



Obr. 1. Tvorba oxidu uhličitého v manometrickom experimente skvasovaním glukózy (o—o), sacharózy (Δ — Δ) a maltózy (●—●) bunkami kvasiniek vyrastenými v polosyntetickej pôde s maltózou (20 g/l) – M, sacharózou (20 g/l) – S, glukózou (5 g/l) – E a glukózou (100 g/l) – G. Kmeň *S. cerevisiae* S.



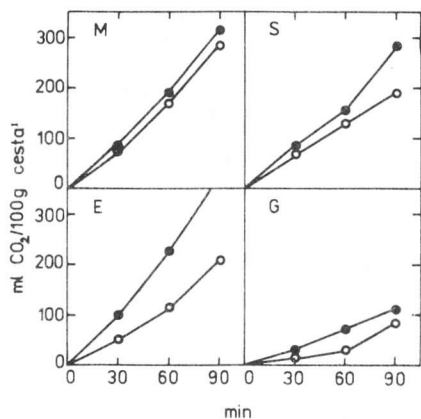
Obr. 2. Tvorba oxidu uhličitého v manometrickom experimente skvasovaním glukózy (o—o), sacharózy (Δ — Δ) a maltózy (●—●) bunkami kvasiniek vyrastenými v polosyntetickej pôde s maltózou (20 g/l) – M, sacharózou (20 g/l) – S, glukózou (5 g/l) – E a glukózou (100 g/l) – G. Kmeň *S. cerevisiae* O.

Fig. 1. Carbon dioxide formation by the fermentation of glucose (o—o), sucrose (Δ — Δ) and maltose (●—●) in manometric experiment yeast cells grown in semi-synthetic medium containing maltose (20 g/l) – M, sucrose (20 g/l) – S, glucose (5 g/l) – E, and glucose (100 g/l) – G. Strain *S. cerevisiae* S. ($\mu\text{l CO}_2/\text{mg}$ of dry weigh.)

Fig. 2. For text see Fig. 1, but the strain *S. cerevisiae* O was used.

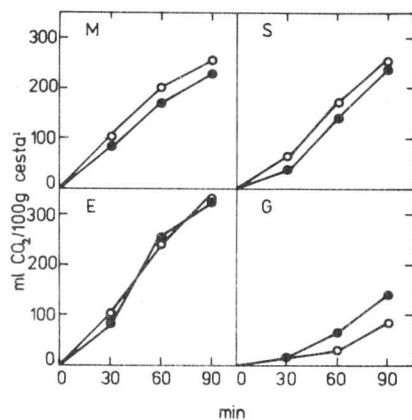
charózy, bolo rovnaké ako množstvo CO₂ vzniknuté skvasovaním glukózy opäť iba v bunkách, ktoré vyrástli za derepresných podmienok. Naproti tomu rýchlosť skvasovania maltózy bola maximálna iba v bunkách vyrastených v pôde obsahujúcej maltózu, pričom bola rovnaká ako rýchlosť skvasovania glukózy, resp. sacharózy [35].

Rýchlosť tvorby plynov v ceste – najdôležitejší kvalitatívny znak pekárskoho droždia – bola v korelácii s glykolytickou aktivitou buniek a ich schopnosťou aktívne skvasovať sacharózu a maltózu (obr. 3, 4). Na rozdiel od počiatkovej fázy, pri dlhšie trvajúcom kvasení rýchlosť tvorby CO₂ v ceste výrazne závisí od schopnosti buniek utilizovať maltózu. Ak sa sacharóza pridala do cesty, jej prítomnosť v neskorších fázach kvasenia výrazne stimulovala rýchlosť tvorby CO₂, ktorá bez exogénnej sacharózy bola limitovaná pravdepodobne nedos-



Obr. 3. Tvorba oxidu uhličitého kvasením cesta v neprítomnosti (○) a prítomnosti (●) exogénnej sacharózy (2 g/100 g cesta) bunkami kvasiniek, vyrastenými v polosyntetickej pôde s maltózou (20 g/l) – M, sacharózou (20 g/l) – S, glukózou (5 g/l) – E a glukózou (100 g/l) – G. Kmeň *S. cerevisiae* S.

Fig. 3. Carbon dioxide formation by dough fermentation with (●) or without (○) exogenous sucrose (2 g/100 g of dough) using yeast cells grown in semi-synthetic medium containing maltose (20 g/l) – M, sucrose (20 g/l) – S, glucose (5 g/l) – E and glucose (100 g/l) – G. Strain *S. cerevisiae* S. (1 ml CO₂/100 g of dough).



Obr. 4. Tvorba oxidu uhličitého kvasením cesta v neprítomnosti (○) a prítomnosti (●) exogénnej sacharózy (2 g/100 g cesta) bunkami kvasiniek vyrastenými v polosyntetickej pôde s maltózou (20 g/l) – M, sacharózou (20 g/l) – S, glukózou (5 g/l) – E a glukózou (100 g/l) – G. Kmeň *S. cerevisiae* O.

Fig. 4. For text see Fig. 3, but the strain *S. cerevisiae* O was used.

tupnosťou skvasiteľných cukrov pre bunky kvasiniek. Rozsah stimulácie kvasenia v ceste a čas, keď k nej dochádzalo, boli vo vzťahu k schopnosti kvasiniek utilizovať maltózu.

Predpokladom maxima kvasnej aktivity droždia v ceste je vysoká aktivita glykolýzy a saturácia jej enzýmového systému hexózami, čo je v príčinnej súvislosti tak s dereprimovaným stavom buniek a so stupňom ich rezistencie ku katabolickej represii, ako aj s hyperprodukciou konštitutívne tvorených α -glukozidáz [35, 37] a maltózo-permeázy [35, 46].

Genetické vlastnosti priemyselných kmeňov

Súbežne s technologickými a biochemickými vlastnosťami sa študovali i genetické vlastnosti priemyselných kmeňov kvasiniek a pripravili sa ich meiotické produkty, ktoré sa po podrobnejšej biochemickej analýze a výbere použili v rekombinačnom šľachtení pekárskych kvasiniek.

Analýzou sporulačnej schopnosti šiestich priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek sa zistilo, že ich sporulačná efektívnosť sa dá vcelku porovnať s efektívnosťou sporulácie laboratórnych kmeňov (71 % pre *S. cerevisiae* D). Sporuláciou vznikli asky, prevažne dvojspórové a trojspórové. Životaschopnosť spór bola veľmi nízka a dosahovala maximum 41 %. Časť spór bola pohlavne aktívna, párovacieho typu prevažne MATa, časť bola pohlavne neaktívna a sporulujúca (tab. 1). Sporulačná efektívnosť, životaschopnosť a genetické vlastnosti primárnych produktov meiózy priemyselných kmeňov naznačujú, že tieto kmene sú polyploidné alebo aneuploidné. Separácia jadrového genómu týchto kmeňov do individuálnych meiotických produktov význačných biochemických vlastností však umožnila zaviesť genetické zmeny do pekárskych kvasiniek mutagenézou a hybridizáciou haploidných línií, resp. línií s nižším stupňom genetickej komplexnosti.

Výber meiotických produktov pre hybridizáciu

Na základe najvýznačnejších metabolických aktivít štandardných priemyselných kmeňov pekárskych kvasiniek rodu *Saccharomyces* sa na rekombinačné šľachtenie vybral produkčný kmeň *S. cerevisiae* M a jeho meiotické produkty [35]. Ich biochemické aktivity podmieňujúce dobré technologické vlastnosti droždia patrili medzi najvyššie zo všetkých študovaných produkčných kmeňov a boli najmenej citlivé na glukózovú represiu [35, 37].

Biochemické vlastnosti vybraných primárnych meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M uvádza tabuľka 2. Väčšina z nich sa vyznačovala konštitutívnou syntézou α -glukozidázy, ktorá spolu s β -D-fruktofuranozidázou bola navyše rezistentná i proti represnému účinku hexóz. Vybrané klony boli párovacieho typu MATa, iné boli sporulujúce a pohlavne neaktívne a iba klon M8D mal párovací typ MATa.

Vzhľadom na možnosť zachovať význačné vlastnosti súvisiace s katabolizmom hexóz niektorých primárnych pohlavne neaktívnych a sporulujúcich meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M sa klony M6D, M13A a niektoré hybridy vzniknuté krížením, kde jeden z rodičov bol klon M2A, nechali opäť

Tabuľka 1. Genetické vlastnosti priemyselných kmeňov kvasiniek
Table 1. Genetic properties of industrial yeast strains

Kmeň	Efek- tívnosť sporu- lácie ² [%]	Výskyt 3 a 4 spóro- vých askov ³ [%]	Života- schop- nosti analizo- vaných spór ⁴ [%]	Celkový počet analyzovaných ⁵		Počet tetrád so ⁸				Počet spór ¹⁰			
						4	3	2	1	nesporulujúce ¹¹			sporu- lujú- ce ¹⁴
				spór ⁶	askov ⁷	vyklíčenými spórami ⁹				s párovacím typom ¹²		bise- xuál- ne ¹³	
										MAT α	MAT α		
<i>S. cerevisiae</i> O	56,0	30,2	17,1	42	11	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. cerevisiae</i> L	36,6	25,3	28,0	42	11	1	1	1	3	2	0	0	10

Tabuľka 2. Biochemické vlastnosti primárnych meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M. Bunky rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s vyznačeným zdrojom uhlíka. Glykolytická aktivita sa merala manometricky v prítomnosti maltózy (M) po raste buniek v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l)

Table 2. Biochemical properties of primary meiotic products of the strain. *S. cerevisiae* M. Cells were grown in semi-synthetic medium with the indicated carbon source for 24 hours. Glycolytic activity was measured manometrically in the presence of maltose (M) after the growth of cells in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l)

Klon ¹	MAT ²	Aktivita β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ³		Aktivita α -glukozidázy [μ mol PNPG/min/mg bielkovín] ⁴		N ₂ Q _{CO₂} (maltóza) ⁶
		glukóza ⁵ [5 g/l]	glukóza ⁵ [100 g/l]	glukóza ⁵ [5 g/l]	glukóza ⁵ [100 g/l]	
M2A	<i>a</i>	16,75	8,58	1,26	0,44	242
M2B	<i>a</i>	3,53	0,51	2,16	0,08	168
M6B	<i>a</i>	15,63	12,62	0,12	0,07	124
M8D	α	3,75	0,34	0,73	–	–
M6D	<i>a/a</i>	7,15	0,68	0,69	0,1	202
M10B	<i>a/a</i>	5,98	0,33	1,79	0,08	182
M13A	<i>a/a</i>	9,29	3,78	1,50	–	226
M15C	<i>a/a</i> 3,77	0,34	1,47	0,05	202	

¹Clone; ²MAT – mating type allele; ³Activity of β -D-fructofuranosidase [U/mg of dry weight];

⁴Activity of α -glucosidase [μ mol PNPG/min/mg of proteins]; ⁵Glucose; ⁶Maltose.

vysporulovať. Na základe analýz pohlavia vzniknutých spór a aktivity ich hydroláz za rôznych podmienok rastu sa z nich na hybridizačné šťachtenie pekárskeho kvasiniek vybrali aj sekundárne meiotické produkty kmeňa *S. cerevisiae* M párovacieho typu MAT α s vysokou aktivitou disacharidových hydroláz a zníženou citlivosťou na glukózovú represiu (tab. 3–6). Tieto vlastnosti spĺňali klony M6D-2, M6D-8, M6D-14, M13-1B, M13-6A, M13-9A, M13-10A, FM1-6A, MF1-9B, FM1-12B, FM1-13B, FM1-16A, MDP1-19 a MDP1-28, ktoré sa ďalej použili ako rodičovské kmene pri získaní hybridných kmeňov.

Tabuľka 3. Aktivita hydroláz sekundárnych meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M vzniknutých sporuláciou klonu M6D. Bunky rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s glukózou vy-
značenej začiatocnej koncentrácie

Table 3. Hydrolase activity of secondary meiotic products of the strain *S. cerevisiae* M issued after the sporulation of M6D clone. Cells were grown in semi-synthetic medium containing glucose with specified concentration for 24 hours

Klon ¹	MAT ²	Aktivita β -D-fruktofuranosidázy [U/mg sušiny] ³	Aktivita α -glukozidázy [μ mol PNPG/min/mg bielkovín]
		glukóza ⁵ [100 g/l]	glukóza ⁵ [5 g/l]
M6D-1	<i>a</i>	0,98	1,02
M6D-12	<i>a</i>	0,20	0,76
M6D-13	<i>a</i>	0,28	0,85
M6D-15	<i>a</i>	1,62	0,49
M6D-2	<i>a</i>	0,57	1,12
M6D-6	<i>a</i>	0,17	2,02
M6D-8	<i>a</i>	0,60	0,92
M6D-11	<i>a</i>	0,14	1,87
M6D-14	<i>a</i>	3,39	1,55

¹Clone; ²MAT – mating type allele; ³Activity of β -D-fructofuranosidase [U/mg of dry weight];

⁴Activity of α -glucosidase [μ mol PNPG/min/mg of proteins]; ⁵Glucose.

Získavanie a biochemická charakteristika hybridov

Pri šľachtení priemyselných kmeňov kvasiniek sú klasické metódy hybridizácie limitované najmä nepoužiteľnosťou prototrofnej selekcie hybridného potomstva, ako aj sexuálnou inkompatibilitou rodičovských dvojíc. Využitím poznatkov mitochondriálnej genetiky bolo možné tieto prekážky preklenúť experimentálnym postupom, ktorý zahrňoval mitochondriálnu mutagenézu, konjugáciu buniek alebo fúziu ich protoplastov a selekciu hybridného potomstva ako mitochondriálne rekombinanty [38, 43].

Vybrané klony rodičovských dvojíc sa podrobili indukovanej mitochondriálnej mutagenéze s MnCl_2 . Selekciou na polosyntetickej pôde s obsahom glycerolu a príslušného antibiotika sa izolovali viaceré klony mutantov rezistentné proti chloramfenikolu a erytromycínu. Po preklonovaní a analýze fenotypu sa z nich vybrali tie klony mitochondriálnych mutantov, ktoré sa vlastnosťami, najmä rastovou charakteristikou, najviac podobali rodičom.

Tabuľka 4. Aktivita hydroláz sekundárnych meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M vzniknutých sporuláciou klonu M13A. Bunky rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s glukózou vyznačenej začiatočnej koncentrácie

Table 4. Hydrolase activity of secondary meiotic products of the strain *S. cerevisiae* M issued after the sporulation of M13A clone. Cells were grown in semi-synthetic medium containing glucose with specified concentration for 24 hours

Klon ¹	MAT ²	Aktivita β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ³		Aktivita α -glukozidázy [μmol PNPG/min/mg bielkovín]
		glukóza ⁵ [5 g/l]	glukóza ⁵ [100 g/l]	glukóza ⁵ [5 g/l]
M13-1A	α	16,0	2,57	0,18
M13-1B	α	22,64	5,10	0,16
M13-2A	α	12,19	2,46	0,30
M13-3C	α	11,74	1,72	0,14
M13-4A	α	12,81	1,20	0,26
M13-6A	α	7,65	1,19	1,16
M13-7A	α	15,30	1,54	0,13
M13-8C	α	11,45	1,19	0,1
M13-9A	α	13,00	1,02	0,12
M13-10A	α	7,47	1,39	0,42
M13-10C	α	10,48	1,28	0,25

For 1-5 see Table 3.

Tabuľka 5. Aktivita hydroláz nesporulujúcich klonov izolovaných po mitotickej haploidizácii hybridu MDP (M2AxDP1-1B/514) benomylom. Bunky rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s glukózou vyznačenej koncentrácie

Table 5. Hydrolase activity of non-sporulating clones isolated after meiotic haploidization of MDP (M2AxDP1-1B/514) hybrid by benomyl. Cells were grown in semi-synthetic medium containing glucose with specified concentration for 24 hours

Klon ¹	MAT ²	Aktivita β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ³	Aktivita α -glukozidázy [μmol PNPG/min/mg bielkovín]
		glukóza ⁵ [100 g/l]	glukóza ⁵ [5 g/l]
MDP	a/α	0,34	0,15
MDP1-15	α	0,22	–
MDP1-19	α	1,94	0,09
MDP1-28	α	1,27	0,33
MDP1-6	α	0,2	0,19
MDP1-17	α	0,68	0,32

For 1–5 see Table 3.

α

1,27

0,33

Tabuľka 6. Aktivita hydroláz sekundárnych meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M vzniknutých sporuláciou hybridu MF (M2AxF1B). Bunky rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s glukózou vyznačenej začiatočnej koncentrácie

Table 6. Hydrolase activity of secondary meiotic products of the strain *S. cerevisiae* M issued after the sporulation of FM (M2AxF1B) hybrid. Cells were grown in semi-synthetic medium containing glucose with specified concentration for 24 hours

Klon ¹	MAT ²	Aktivita β -D-fruktofuranosidázy [U/mg sušiny] ³		Aktivita α -glukozidázy [μmol PNPG/min/mg bielkovín]
		glukóza ⁵ [5 g/l]	glukóza ⁵ [100 g/l]	glukóza ⁵ [5 g/l]
FM	<i>a/a</i>	2,96	0,18	0,04
FM-3B	<i>α</i>	2,38	0,19	1,01
FM-4B	<i>α</i>	6,44	0,19	0,27
FM-6A	<i>α</i>	8,37	0,36	0,01
FM-8A	<i>α</i>	2,43	0,15	0,07
FM-9B	<i>α</i>	7,71	0,16	0,59
FM-12B	<i>α</i>	3,61	0,28	1,97
FM-13A	<i>α</i>	4,93	0,18	0,05
FM-13B	<i>α</i>	11,16	2,75	0,01
FM-15B	<i>α</i>	5,47	0,25	0,07
FM-16A	<i>α</i>	2,62	1,13	0,43
FM-18a	<i>α</i>	5,24	0,49	0,30

For 1–5 see Table 3.

Hybridizácia sa uskutočnila buď konjugáciou buniek opačného párovacieho typu, buď, v prípade sexuálnej inkompatibility jedného z rodičov, indukovanou fúziou ich protoplastov. Hybridy sa selektovali ako mitochondriálne rekombinanty rezistentné proti obidvom antibiotikám ($E^R C^R$), schopné sporulácie. V dôsledku heterogénnej povahy, najmä hybridného potomstva získaného fúziou (hybridy + cybridy), z každej hybridizácie sa vybralo niekoľko nezávislých klonov primárnych hybridov, ktoré sa preklonovali na polosyntetických pôdach s glukózou a vybrali sa z nich klony tvoriace najväčšie a najrýchlejšie rastúce kolónie, ktoré sa ďalej podrobili ešte mikroskopickej analýze veľkosti buniek. Napokon sa v takto vyselektovanom hybridnom potomstve prišlo k analýze ich biochemických a genetických vlastností. Na základe týchto analýz sa vytvoril užší výber vyšľachtených hybridných kmeňov, ktoré sa ďalej podrobili biochemickej analýze skvasovaním maltózy a kvasnej aktivity v ceste. Získané výsledky sa porovnávali s biochemickými údajmi jednotlivých aktivít štandardných produkčných kmeňov droždiarní kultivovaných a analyzovaných za tých istých podmienok (polosyntetická

Tabuľka 7. Vlastnosti štandardných produkčných kmeňov pekárskych kvasiniek. Bunky kvasiniek rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l). Kvasná aktivita v ceste na bežné pečivo sa merala v prítomnosti sacharózy (2 g/100 g cesta). Kvasná aktivita priemyselne vyrobeného droždia na báze zodpovedajúceho produkčného kmeňa má hodnoty celoštátneho priemeru stanoveného vstupnou kontrolou podnikového laboratória Mlyny a pekárne, n.p., Bratislava

Table 7. Properties of standard industrial strains of baker's yeast. Yeast cells were grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l) for 24 hours. Fermentation activity was determined in the presence of sucrose (2 g/100 g of dough) in standard dough.

Produkčný ¹ kmeň	Aktivita ²			Kvasná aktivita v ceste [ml CO ₂ /100 g cesta za 90 min] ⁶		
	β -D-fruktofuranazidázy [U/mg sušiny] ³	α -glukozidázy [μmol PNPG/min/mg bielkovín] ⁴	$Q_{CO_2}^{N_2}$ (maltóza) ⁵			
				1980	1982	1984
<i>S. cerevisiae</i> S (VG-FETT D/80)	1,2	0,41	60	349	344,5	—
<i>S. cerevisiae</i> O (OOSF-RH/81)	2	0,31	160	—	—	354,4

¹Industrial strain; ²Activity; ³ β -D-Fructofuranosidase [U/mg of dry weight]; ⁴ α -Glucosidase [μmol PNPG/min/mg of proteins]; ⁵Maltose; ⁶Fermentation activity in dough [ml CO₂/100 g of dough in 90 min].

pôda s glukózou 5 g.l⁻¹) (tab. 7). Produkčný kmeň *S. cerevisiae* S bol licenčný kmeň fy Vogelbush VG-FETT D/80 používaný do roku 1982 a *S. cerevisiae* O bol licenčný kmeň fy Vogelbush OOSF-RH-81 používaný v n. p. Slovlik Trenčín od roku 1982.

Získané hybridy, ich genetický pôvod a vlastnosti uvádzajú tabuľky 8–15. Sú zaradené podľa spôsobu hybridizácie a pôvodu rodičov. Hlavnými kritériami výberu hybridov bola ich rýchlosť rastu, aktivita α -glukozidázy, rýchlosť skvasovania cukrov (glukózy, maltózy a sacharózy) a najmä kvasná aktivita v ceste podľa receptúry na bežné pečivo. Rýchlosť skvasovania maltózy bunkami väčšinou korelovala s aktivitou α -glukozidázy. Ak boli tieto aktivity nízke, kvasná aktivita v ceste sa už ďalej nestanovovala.

Tabuľka 8 uvádza vlastnosti hybridných kmeňov, ktoré vznikli krížením klonu M2A s primárnymi, resp. sekundárnymi meiotickými produktami opačného párovacieho typu, vzniknutých sporuláciou produkčného kmeňa *S. cerevisiae* M, *S. cerevisiae* T, jeho pohlavne neaktívnych spór M13A, M6D, resp. hybridov MDP a FM. Ukázalo sa, že z 20 rodičovských kombinácií iba päť MM12-1, MM13-1, MM14-1, MM25-2 a MF1-2 prevyšovali skvasovaním maltózy a kvasnou aktivitou v ceste zodpovedajúce aktivity štandardných kmeňov.

Tabuľka 8. Biochemické vlastnosti vybraných hybridných kmeňov vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l) pripravených kríženním klonu M2A s primárnymi a sekundárnymi meiotickými produktmi párovacieho typu MAT α

Table 8. Biochemical properties of selected hybrid strains grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l). They were prepared by hybridization of M2A clone with primary and secondary meiotic products of mating type MAT α

Hybrid ¹	Rodičia ²	Spôsob ³		Aktivita ⁶		Q _{CO₂} ^{N₂}		Kvasná aktivita v ceste (+ S) [ml CO ₂ /100 g cesta] ¹¹	
		hybridizácia ⁴	selekcie ⁵	β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ⁷	α -glukozydázy [μ mol PNPG/min/mg bielkovín] ⁸	(glukóza) ⁹	(maltóza) ¹⁰	90 min	180 min
MM 2-1	M2A-C ^R 2 x M8D-E ^R 1	a x a	E ^R C ^R	4,72	0,3435	340	280	400	800
MT 1-2	M2A-C ^R x T5B-E ^R	a x a	E ^R C ^R			425	360	280	570
MM 1-1	M2A-C ^R 2 x MDP1-28-E ^R 1	a x a	E ^R C ^R	6,4	0,09	327	52	280	640
MM 2-3	M2A-C ^R 2 x MDP3-6-E ^R 1	a x a	E ^R C ^R	6,13	0,13	349	63	180	340
MM 3-3	M2A-C ^R 2 x MDP3-17-E ^R 1	a x a	E ^R C ^R	5,54	0,07	303	13		

MM14-1	M2A-C ^{R2}	× M13A-E ^R -6A	a × a	E ^R C ^R	3,41	0,51	315	207	380	855
MM15-1	M2A-C ^{R2}	× M13A-E ^R -9A	a × a	E ^R C ^R	3,84	0,26	313	200	365	610
MM16-1	M2A-C ^{R2}	× M13A-E ^R -10A	a × a	E ^R C ^R		0,20	330	56	380	630
MM21-2	M2A-C ^{R2}	× M6D-E ^R -14	a × a	E ^R C ^R	4,08		415	321		
MM25-2	M2A-C ^R	× M6D-2-E ^R	a × a	E ^R C ^R	5,90	0,25	322	211	400	820
MM26-1	M2A-C ^{R2}	× M6D-8-E ^R	a × a	E ^R C ^R			460	9	315	550
MF 1-2	M2A-C ^R	× FM 9B-E ^R	a × a	E ^R C ^R	5,17	0,27	320	260	320	760
MF 2-2	M2A-C ^R	× FM12B-E ^R	a × a	E ^R C ^R			333	0	380	630
MF 5-2	M2A-C ^R	× FM 6A-E ^R	a × a	E ^R C ^R			337	0	320	640
MF 6-1	M2A-C ^R	× FM13B-E ^R	a × a	E ^R C ^R			400	0	310	600
MF 7-2	M2A-C ^R	× FM16A-E ^R	a × a	E ^R C ^R	0,97	0,09	455	30	330	630

¹Hybrid; ²Parents; ³Mode of; ⁴Hybridization; ⁵Selection; ⁶Activity of; ⁷ β -D-Fructofuranosidase [U/mg of dry weight]; ⁸ α -Glucosidase [μ mol PNPG/min/mg of proteins]; ⁹Glucose; ¹⁰Maltose; ¹¹Fermentation activity in dough (+S).

+S – receptúra na bežné pečivo so sacharózou (2 g/100 g cesta); Prescriptions for standard dough with sucrose (2 g/100 g of dough).

Tabuľka 9. Biochemické vlastnosti vybraných hybridných kmeňov vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l), pripravených kríženním klonu M6B s primárnymi a sekundárnymi meiotickými produktmi párovacieho typu MAT α

Table 9. Biochemical properties of selected hybrid strains grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l). They were prepared by hybridization of M6B clone with primary and secondary meiotic products of mating type MAT α

Hybrid ¹	Rodičia ²	Spôsob ³		Aktivita ⁶		Q _{CO₂} ^{N₂}		Kvasná aktivita v ceste (+S) [ml CO ₂ /100 g cesta] ¹¹	
		hybridizácia ⁴	selekcie ⁵	β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ⁷	α -glukozi-dázy [μ mol PNPG/min/mg bielkovín] ⁸	(glukóza) ⁹	(maltóza) ¹⁰	90 min	180 min
MT 2-2	M6B-C ^R × T5B-E ^R	a × a	C ^R E ^R	6,72	0,02	402	318	315	755
MM 8-1	M6B-C ^R × MDP-E ^R 1-19	a × a	C ^R E ^R	1,49	0,06	266	79	305	550
MM17-2	M6B-C ^E × M13A-E ^R 1B	a × a	C ^R E ^R	4,51	0,35	360	320	425	920
MM18-2	M6B-C ^R × M13A-E ^R 6A	a × a	C ^R E ^R	4,46	0,20	42	74	350	760
MM19-1	M6B-C ^R × M13A-E ^R 9A	a × a	C ^R E ^R	2,4		400	203	370	680

Tabuľka 10. Biochemické vlastnosti vybraných hybridných kmeňov vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l), pripravených krížením klonu M2B s primárnymi a sekundárnymi meiotickými produktmi párovacieho typu MAT α

Table 10. Biochemical properties of selected hybrid strains grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l). They were prepared by hybridization of M2B clone with primary and secondary meiotic products of mating type MAT α

Hybrid ¹	Rodičia ²	Spôsob ³		Aktivita ⁶		Q _{CO₂} ^{N₂}		Kvasná aktivita v ceste (+ S) [ml CO ₂ /100 g cesta] ¹¹	
		hybridizácia ⁴	selekcie ⁵	β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ⁷	α -glukozidázy [μ mol PNPG/min/mg bielkovín] ⁸	(glukóza) ⁹	(maltóza) ¹⁰	90 min	180 min
MM22-1	M2B-C ^R -1 \times M8D-E ^R -1	a \times a	C ^R E ^R	3,91	0,56	360	328	340	755
MM23-1	M2B-C ^R -1 \times M6D-E ^R -14	a \times a	C ^R E ^R	4,18		315	195		
MM24-1	M2B-C ^R -1 \times M13A-E ^R -1B	a \times a	C ^R E ^R	8,04	0,34	470	271	360	743
MM27-2	M2B-E ^R \times M6D-C ^R -8	a \times a	C ^R E ^R			300	11	230	520

Tabuľka 9 uvádza vlastnosti hybridných kmeňov, ktoré vznikli krížením klonu M6B s primárnymi a sekundárnymi meiotickými produktmi kmeňov *S. cerevisiae* T a *S. cerevisiae* M. Z 11 kombinácií rodičovských dvojíc iba tri hybridy MM17-2, MF3-2 a MF4-2 aktívnejšie skvasovali maltózu a ich kvasné aktivity v ceste boli vyššie ako pri štandardných kmeňoch.

Tabuľka 10 uvádza vlastnosti hybridov, ktoré vznikli krížením klonu M2B s vybranými meiotickými produktmi opačného párovacieho typu. Z piatich kombinácií rodičovských dvojíc nevznikol ani jeden hybrid s vyššou aktivitou v ceste ako pri štandardných kmeňoch.

Tabuľka 11 uvádza vlastnosti hybridov, ktoré vznikli fúziou protoplastov pohlavne neaktívnych, sporulujúcich meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M. Ako z tabuľky vidieť, fúziou tých istých rodičovských dvojíc sa primárne selektovali hybridy s nie vždy rovnakými vlastnosťami (GD1, GD2). Na základe údajov o rýchlosti skvasovania maltózy sa bližšie charakterizovali iba tie hybridy, ktorých glykolytická aktivita bola vyššia ako pri štandardných kmeňoch.

Vzhľadom na morfológickú a biochemickú heterogenitu niektorých primárne selektovaných hybridov bolo potrebné ich niekoľkonásobne preklonovať a vybrať z nich najstabilnejšie a najaktívnejšie klony. Takto z hybridu GD2-7/2 vznikli mitotické subklony GG1 až GG8. Väčšina z nich sa vlastnosťami podobala základnému klonu GD2-7/2. Našli sa však aj subklony s nižšou aktivitou v ceste, ktorých bunky boli objemovo menšie (GG2). Z uvedených kombinácií rodičovských dvojíc iba hybridné klony GD1-6, GD2-7/2, GG5, GG8, A₁, A₃, A₅, MFM7-2, MFM8-1 a D₃ mali vyššiu kvasnú aktivitu v ceste na bežné pečivo a zároveň vysokú aktivitu skvasovania maltózy.

Ďalší spôsob hybridizácie sa robil fúziou protoplastov rodičov, z ktorých jeden bol pohlavne aktívny meiotický produkt *S. cerevisiae* M a druhý bol pohlavne neaktívny dýchajúci alebo respiračne deficitný klon (tab. 12). Fúzne produkty sa selektovali ako mitochondriálne rekombinanty, resp. ako sporulujúce respiračne kompetentné potomstva dvoch nesporelujúcich rodičov (MATa ρ^+ , resp. MATa/MATa ρ^-). Zo 49 primárnych hybridných klonov sa do užšieho výberu vyšľachtených kmeňov vybrali hybridy L3, L5, P6, J1, J2 s dobrým rastovým výťažkom a reprodukčne vysokou aktivitou skvasovania maltózy a kvashou aktivitou v ceste.

V snahe odstrániť pomalší rast niektorých vyšľachtených hybridov na etanole, čo mohol spôsobiť rekombinovaný mitochondriálny genóm, z vybraných hybridov mutagenézou s etídiom bromidom sa pripravili petite mutanty, ktoré sa podrobili fúzii s dýchajúcimi kmeňmi zo zbierky defektnými v karyogamii. Hybridy sa selektovali na základe sporulácie. Takto získané cybridy po deštrukcii vlastného mitochondriálneho genómu cytodukciou získali štandardný mitochondriálny genóm od jadrového *kar 1* mutanta (tab. 13). Zistilo sa,

Tabuľka 11. Biochemické vlastnosti vybraných hybridných kmeňov vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l), pripravených fúziou protoplastov sporulujúcich meiotických produktov kmeňa *S. cerevisiae* M

Table 11. Biochemical properties of selected hybrid strains grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l). They were prepared by protoplast fusion of the sporulating meiotic products of the strain *S. cerevisiae* M

Hybrid ¹	Rodičia ²	Spôsob ³		Aktivita ⁶		$Q_{CO_2}^{N_2}$		Kvasná aktivita v ceste (+S) [ml CO ₂ /100 g cesta] ¹¹	
		hybridizácia ⁴	selekcie ⁵	β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ⁷	α -glukozydázý [μmol PNPG/min/mg bielkovín] ⁸	(glukóza) ⁹	(maltóza) ¹⁰		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GD1-5/2	M15C-C ^R 1 + M15C-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R			165			
GD1-6	M15C-C ^R 1 + M25C-E ^R 3	a/a + a/a	C ^E E ^R	2,56	0,75	340	320	481	908
GD1-7	M15C-C ^R 1 + M15C-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R			270	128	240	610

GD2-6	M6D-C ^R 1 + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R	5,39	1,21	320	152	447	996
GD2-7/2	M6D-C ^R 1 + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R			360	320		
GD2-9	M6D-C ^R 1 + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R			262	50		
GG 1	GD2-7/2	mitotické	subklony ¹²					365	780
GG 2	GD2-7/2	detto						280	660
GG 3	GD2-7/2	detto		5,46	0,95			400	900
GG 4	GD2-7/2	detto		3,80	0,47			410	840
GG 5	GD2-7/2	detto		4,92	0,58	280	280	425	930
GG 8	GD2-7/2	detto		4,00	1,23	300	300	435	895
A 1	M6D-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R	4,51	0,26	300	266	415	840
A 2	M6D-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R	5,26	0,01		90	440	900

Tabuľka 11. (pokračovanie)

Table 11. (Continuation)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A 3	M6D-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R	4,24	0,34	220	140	355	840
A 4	M6D-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R	4,69	0,43		58	430	960
A 5	M6D-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R	6,94	0,23	360	200	400	850
MFM 3-1	M13A-C ^R 1 + M13A-E ^R 1	a/a + a/a	C ^R E ^R	10,04	0,9	387	42	350	569
MFM 3-2	M13A-C ^R 1 + M13A-E ^R 1	a/a + a/a	C ^R E ^R			327	115		
MFM 4-1	M13A-C ^R 1 + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R	4,60	0,38	408	273	380	780
MFM 4-2	M13A-C ^R 1 + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R			287	186	307	650
MFM 6-1	M10B-C ^R + M13A-E ^R 1	a/a + a/a	C ^R E ^R	11,48	0,07	510	23	320	410
MFM 6-2	M10B-C ^R + M13A-E ^R 1	a/a + a/a	C ^R E ^R			218	123	415	602
MFM 7-1	M10B-C ^R + M10B-E ^R 1	a/a + a/a	C ^R E ^R	7,75	0,79	351	375	308	712
MFM 7-2	M10B-C ^R + M10B-E ^R 1	a/a + a/a	C ^R E ^R	5,50	0,39	280	280	400	910
MFM 8-1	M10B-C ^R + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R	6,07	0,36	320	320	370	810
MFM 8-2	M10B-C ^R + M6D-E ^R 3	a/a + a/a	C ^R E ^R	5,0	0,14	306	88	332	728
C 1	M15C-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^E				30		
C 2	M15C-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R				50	285	550
C 3	M15C-C ^R + M6D-E ^R	a/a + a/a	C ^R E ^R			70	290	550	

Tabuľka 12. Biochemické vlastnosti vybraných hybridných kmeňov vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l), pripravených fúziou protoplastov pohlavne inkompatibilných rodičov

Table 12. Biochemical properties of selected hybrid strains grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l). They were prepared by protoplast fusion of sexually incompatible parents

Hybrid ¹	Rodičia ²	Spôsob ³		Aktivita ⁶		$Q_{CO_2}^{N_2}$		Kvasná aktivita v ceste (+S) [ml CO ₂ /100 g cesta] ¹¹	
		hybridizácia ⁴	selekcie ⁵	β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ⁷	α -glukozydázý [μmol PNPG/min/mg bielkovín] ⁸	(glukóza) ⁹	(maltóza) ¹⁰	90 min	180 min
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GD 5-1	M2A-C ^{R2} + OOSF-E ^{R2}	a + a/a	C ^R E ^R		0,39	270	63	325	545
DG 5-1	M2A-C ^{R2} + OOSF-E ^{R2}	a + a/a	C ^R E ^R	1,896	0,07	365	340	280	620
DG 5-2	M2A-C ^{R2} + OOSF-E ^{R2}	a + a/a	C ^R E ^R		270	270	73		
DG 6-1	M2A-C ^{R2} + R.E ^R 1	a + a/a	C ^R E ^R	4,969	0,02	392	56	240	640

L 1	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,61	0,36	300	320	400	630
L 2	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,28	0,34			426	1010
L 3	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,87	0,28	300	200	320	810
L 4	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,88	0,18	280	280	450	920
L 5	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	2,91	0,32			470	850
L 6	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,16	0,25			455	875
L 7	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,43	0,34			470	860
L 8	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,17	0,39	280	280	575	1230
L 9	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,79	0,19			340	720
L 10	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,68	0,28			355	710
								420	960

Tabuľka 12. (pokračovanie)

Table 12. (Continuation)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L 11	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,69	0,32			420	930
L 12	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,68	0,28			470	850
L 13	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,31	0,33			625	1200
L 14	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,66	0,22			440	1000
L 15	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,22	0,36			490	1100
L 16	M2A-C ^R + ρ MT 3-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,48	0,20			420	910
P 1	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,71	0,38			340	775
P 2	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	3,98	0,52	340	240	340	790
P 3	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	1,17	0,25			520	1120
P 4	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	5,47	0,34			250	640
P 5	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	5,04	0,192			460	1080
P 6	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,40	0,27	300	240	390	830
P 7	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,28	0,30			380	780
P 8	M2A-C ^R + ρ MF 1-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	4,19	0,26			250	640
GD 3-1	M2A-C ^{R2} + M15C-E ^R -3	$a + a/a$	C ^R E ^R		1,95	250	54	405	640
DG 3-3	M2A-C ^{R2} + M15C-E ^R -3	$a + a/a$	C ^R E ^R	5,90	1,25	230	34	330	665

Tabuľka 12. (pokračovanie)
Table 12. (Continued)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
J 2	M2B + ρ^- MF 4-2	$a + a/a$	$\rho^+ \text{SPO}^+$	2,0	0,14	340	335	370	690
E 1	M2B- C^R + M6D- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				62		
E 2	M2B- C^R + M6D- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				338	290	730
E 3	M2B- C^R + M6D- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				340	310	740
F 1	M2B- C^R + M15C- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				24		
F 2	M2B- C^R + M15C- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				184		
G 1	M2B- C^R + M13A- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				380	320	760
G 2	M2B- C^R + M13A- E^R	$a + a/a$	$C^R E^R$				295	245	640

For explanation and for 1-11 see Table 8.

Tabuľka 13. Kvasná aktivita hybridov vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l), u ktorých došlo k náhrade zmutovaného mitochondriálneho genómu cytodukciou za štandardný genóm

Table 13. Fermentation activity of hybrids grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l). Mutated mitochondrial genome was replaced with standard genome using cytoduction

Hybrid ¹	Rodičia ²	Spôsob ³		Kvasná aktivita v ceste (+S) [ml CO ₂ /100 g cesta] ⁶	
		hybridizácie ⁴	selekcie ⁵	90 min	180 min
MM12-1/11	IC8 + ρ -MM12-1	$a + a/a$	SPO ⁺	160	340
MM12-1/15	IC8 + ρ -MM12-1	$a + a/a$	SPO ⁺	255	580
MFM1-1/35	IC8 + ρ -MFM1-1	$a + a/a$	SPO ⁺	360	730
MFM-1/6	IC8 + ρ -MFM1-1	$a + a/a$	SPO ⁺	310	580
GG 5/1	IC11 + ρ -GG 5	$a + a/a$	SPO ⁺	260	630
GG 8/1	IC11 + ρ -GG 8	$a + a/a$	SPO ⁺	270	585
MFM5-2/1	IC11 + ρ -MFM5-2	$a + a/a$	SPO ⁺	255	630
MFM7-2/1	IC11 + ρ -MFM7-2	$a + a/a$	SPO ⁺	60	140
MFM8-1/1	IC11 + ρ -MFM8-1	$a + a/a$	SPO ⁺	280	650
MM13-1/1	IC11 + ρ -MM13-1	$a + a/a$	SPO ⁺	350	680
MM14-1/1	IC11 + ρ -MM14-1	$a + a/a$	SPO ⁺	360	710
MM17-2/2	IC11 + ρ -MM17-2	$a + a/a$	SPO ⁺	377	670
MM18-2/1	IC11 + ρ -MM18-2	$a + a/a$	SPO ⁺	300	650
MM22-1/1	IC11 + ρ -MM22-1	$a + a/a$	SPO ⁺	340	670
MM24-1/1	IC11 + ρ -MM24-1	$a + a/a$	SPO ⁺	340	700

For explanation and 1–5 see Table 8. ⁶Fermentation activity in dough (+S) [ml CO₂/100 g of dough].

že vybrané hybridné kmene so štandardným mitochondriálnym genómom väčšinou na etanole rástli o niečo rýchlejšie, ale ich kvasná aktivita v ceste na bežné pečivo poklesla. Z takto pripravených hybridov sa na ďalšiu analýzu vybrali klony MFM1-1/3, MM13-1/1 a MM14-1/1.

Výber hybridných kmeňov, ich biochemické a technologické vlastnosti

Zo 180 pripravených hybridných klonov, ktoré vznikli z 36 rodičovských kombinácií konjugáciou buniek, resp. 40 rodičovských kombinácií fúziou protoplastov, na základe biochemickej a genetickej analýzy sa vybralo 29 produkčných kmeňov (ďalej PK), ktoré mali kvasnú aktivitu v ceste po 180 minútach kvasenia výrazne vyššiu ako štandardné droždiarske kmene. Tabuľka

Tabuľka 14. Označenie a pôvod vzniku vyšľachtených hybridných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae*

Table 14. Identification and origin of improved hybrid yeast strains of *S. cerevisiae*

Pro- dukčný kmeň ¹	Hybrid ²	Rodičia ³	Spôsob ⁴	
			hybridizácie ⁵	selekcie ⁶
PK 1	S	<i>S. cerevisiae</i> S		E ^R
PK 2	O	<i>S. cerevisiae</i> O		E ^R
PK 3	M	<i>S. cerevisiae</i> M		E ^R
PK 4	B	<i>S. cerevisiae</i> B		E ^R
PK 5	G	<i>S. cerevisiae</i> G		E ^R
PK 6	GD-1-6	M15C-E ^R 3 + M15C-C ^R 1	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 7	GD2-7/2	M6D-E ^R 3 + M6D-C ^R 1	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 8	MFM1-1	M6B-C ^R 1 + M13A-E ^R 1	$a + a/a$	E ^R C ^R
PK 9	GG 5	M6D-E ^R 3 + M6D-C ^R 2	$a/a + a/a$	E ^R CX ^R
PK 10	GG 8	M6D-E ^R 3 + M6D-C ^R 1	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 11	MFM1-1/3	IC8 + $\rho^-(M6B-C^R1 + M13A-E^R1)$	$a + \rho^-[a + a/a]$	ρ^+SPO^+
PK 12	MFM8-1	M6D-E ^R 3 + M10B-C ^R	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 13	MM12-1	M2A-C ^R 2 x M8D-E ^R 1	$a \times a$	E ^R C ^R
PK 14	MM13-1	M2A-C ^R 2 x M13A-E ^R 1B	$a \times a$	E ^R C ^R
PK 15	MM13-1/1	$\rho^-(M2A-C^R2 \times M13A-E^R1B) +$ + IC11	$\rho^-(axa) + a$	ρ^+SPO^+
PK 16	MM14-1/1	$\rho^-(M2A-C^R2 \times M13A-E^R6A) +$ + IC11	$\rho^-(axa) + a$	ρ^+SPO^+
PK 17	J 2	M2B + $\rho^-(M6B-C^R \times MF12B-E^R)$	$a + \rho^-(a \times a)$	ρ^+SPO^+
PK 18	A 3	M6D-E ^R + M6D-C ^R	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 19	J 1	M2B + $\rho^-(M6B-C^R \times MF12B-E^R)$	$a + \rho^-(axa)$	ρ^+SPO^+
PK 20	MF 1-2	FM9B-E ^R x M2A-C ^R	$a \times a$	E ^R C ^R
PK 21	MF 3-2	FM9B-E ^R x M6B-C ^R	$a \times a$	E ^R C ^R
PK 22	MM17-2	M6B-C ^R x M13A-E ^R 1B	$a \times a$	E ^R C ^R
PK 23	MFM7-2	M10B-E ^R 1 + M10B-C ^R	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
FK 24	A 5	M6D-E ^R + M6D-C ^R	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 25	L 3	M2A + ρ^-MT 3-2	$a + \rho^-a/a$	ρ^+SPO^+
PK 26	A 1	M6D-E ^R + M6D-C ^R	$a/a + a/a$	E ^R C ^R
PK 27	L 4	M2A + ρ^-MT 3-2	$a + \rho^-a/a$	ρ^+SPO^+
PK 28	P 6	M2A + ρ^-MF 1-2	$a + \rho^-a/a$	ρ^+SPO^+
PK 29	D 3	M6D-C ^R + M15C-E ^R	$a/a + a/a$	E ^R C ^R

¹Industrial strain; ²Hybrid; ³Parents; ⁴Mode of; ⁵Hybridization; ⁶Selection.

14 uvádza ich pôvod, spôsob vyšľachtienia a selekcie a tabuľka 15 ich dôležité biochemické vlastnosti. Rastový aeróbný výťažok bol stanovený v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g.l⁻¹), aktivita β -D-fruktofuranozidázy a α -glukozidázy za derepresných a represných podmienok rastu a kvasná aktivita v ceste na bežné pečivo meraná v neprítomnosti (–S), resp. v prítomnosti (+S) sacharó-

zy (2 g/100 g cesta). Vyšľachtené kmene v porovnaní so štandardnými kmeňmi pekárskych kvasiniek trenčianskej droždiarne *S. cerevisiae* S a *S. cerevisiae* O mali porovnateľné rastové výťažky po 24-hodinovom raste v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g.l⁻¹). Aktivita β -D-fruktofuranozidázy bola väčšinou trojnásobne až päťnásobne vyššia po raste v prítomnosti vysokej koncentrácie glukózy. Táto znížená citlivosť na glukózovú represiu sa prejavila vo väčšine kmeňov i v syntéze α -glukozidázy. Aktivita tohto enzýmu bola v niektorých hybridoch vyššia a v iných nižšia ako pri štandardných kmeňoch. Napriek tomu rýchlosť skvasovania maltózy hybridnými kmeňmi niekoľkonásobne (3–4-krát) prevyšovala zodpovedajúcu aktivitu štandardného kmeňa *S. cerevisiae* S (tab. 15). Faktorom, ktorý limituje rýchlosť skvasovania maltózy, je zrejme jej vstup do bunky a nie jej intracelulárna hydrolýza [35].

Zvýšená schopnosť skvasovať maltózu bunkami vyšľachtených hybridných kmeňov sa pozitívne odrazila i v kvasnej aktivite v ceste na bežné pečivo, ktorá bola hlavným kritériom konečného výberu vyšľachtených kmeňov. Táto aktivita bola najmä v dlhšie trvajúcich kvasných pokusoch (180 min) výrazne vyššia (o 15–30 %) ako aktivita štandardných kmeňov *S. cerevisiae* S a *S. cerevisiae* O (tab. 15).

Predpokladom využitia vyšľachtených hybridných kmeňov pekárskych kvasiniek v praxi bolo overenie a zachovanie ich význačných vlastností po prítokovej kultivácii na melase za laboratórnych i priemyselných podmienok ich výroby a použitia. Vyšľachtené kmene sa preto v spolupráci s VÚ LIKO, resp. VVJ MaPP postupne podrobili štúdiu technologických vlastností za podmienok, ktoré sa najviac približovali prevádzkovým podmienkam ich výroby a použitia v potravinárskom priemysle. Na hodnotenie technologických vlastností sa vybrali tieto znaky: výťažnosť biomasy a rastová rýchlosť za podmienok expedičného droždiarskeho kvasenia, aktivita biomasy v ceste podľa receptúry pre bežné a jemné pečivo, kvasná aktivita v roztokoch sacharózy a maltózy a trvanlivosť droždia. V nadväznosti na tieto analýzy sa vo VVJ MaPP študovali aj pekárske vlastnosti vyšľachtených hybridov pekárskych kvasiniek, t.j. kvasná mohutnosť, fermentografické a maturografické merania, ako aj pekársky pokus. Podrobné záznamy z jednotlivých analýz uvádzajú výročné správy kooperujúcich pracovísk, resp. záverečná správa výskumnej úlohy štátneho plánu RVT S 11-529-110-04 [47–49].

Na základe výsledkov analýz technologických vlastností vyšľachtených hybridných kmeňov kvasiniek vyrastených za podmienok prítokovej kultivácie v laboratórnych fermentoroch sa z 18 doteraz analyzovaných hybridov štyri najlepšie odporučili do priemyselných overovacích experimentov. Sú to produkčné kmene *S. cerevisiae* PK11, PK14, PK17 a PK19 [42, 47] biochemicky podrobnejšie charakterizované, ktorých základné technologické vlastnosti

Tabuľka 15. Biochemické vlastnosti vyšľachtených produkčných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae*. Skvasovanie cukrov a kvasná aktivita v ceste na bežné pečivo sa stanovili u buniek vyrastených v polosyntetickej pôde s glukózou (5 g/l)

Table 15. Biochemical properties of improved industrial yeast strains of *S. cerevisiae*. Both sugar fermentation and fermentation activity in standard dough were determined by cells grown in semi-synthetic medium containing glucose (5 g/l)

Vyšľachtený kmeň ¹	Rastový výťažok ² [mg/ml]	Aktivita β -D-fruktofuranozidázy [U/mg sušiny] ³		Aktivita α -glukozidázy [μ mol PNPG/min/mg bielkovín] ⁴		$Q_{CO_2}^{N_2}$			Kvasná aktivita v ceste [ml CO ₂ /100 g cesta] ⁶			
		glukóza ⁵		glukóza ⁵		G	M	S	90 min		180 min	
		[5 g/l]	[100 g/l]	[5 g/l]	[100 g/l]				-S	+S	-S	+S
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PK 1	3,2	1,2	0,37	0,41	0,02	280	60	278	220	340	460	630

PK 6	3,1	2,56	0,18	0,75	0,03	340	320	404	320	320	450	530
PK 7	3,06	5,39	0,61	1,21	0,06	360	320		440	480	670	910
PK 8	3,25	5,8	0,64	0,65	0,02	420	260		440	447	775	996
PK 9	2,72	4,69	1,26	0,47	0,16	280	280		380	345	540	1000
PK 10	2,5	4,0	1,17	1,2	0,08	300	300		400	340	660	830
PK 11	3,9	7,5	0,49	0,22	0,02	380	300	280	420	375	890	950
PK 12	3,14	6,8	1,3	0,4	0,1	320	320	328	300	360	470	730
PK 13	2,4	4,8	0,7	0,34	0,06	340	280		340	370	585	810
PK 14	3,49	5,13	0,79	0,26	0,06	320	160		410	400	890	800
PK 15	3,75	5,56	0,77	0,35	0,02	300	240		390	365	710	780
PK 16	3,64	3,87	0,48	0,15	0,05	300	200		350	350	620	680
									380	360	740	710

21*

Tabuľka 15 (pokračovanie)
Table 15 (Continuation)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PK 17	3,2	2,0	0,19	0,15	0,04	340	335	340	340	370	610	690
PK 18	2,66	3,9	0,85	0,38	0,02	220	140	326	425	355	740	840
PK 19	3,26	2,0	0,43	0,14	0,09	326	196	326	340	360	620	815
PK 20	3,2	5,26	1,16	0,31	0,17	320	260	359	440	320	780	760
PK 21	3,14	4,1	1,04	0,30	0,09	280	200	320	400	325	740	685
PK 22	3,02	4,6	0,7	0,34	0,07	360	320	355	485	425	855	920
PK 23	2,81	5,9	1,0	0,46	0,13	280	280	324	410	400	720	910
PK 24	3,1	6,1	1,13	0,25	0,12	360	200	285	340	400	770	850
PK 25	2,65	4,8	0,84	0,29	0,07	300	200	300	340	450	740	920
PK 26	2,9	4,4	0,53	0,26	0,04	300	266	326	400	415	850	840
PK 27	2,76	3,88	1,08	0,40	0,06	280	280	335	515	470	760	850
PK 28	3,1	4,3	1,15	0,28	0,09	300	240	330	445	390	780	830
PK 29	2,6	4,26	0,49	0,27	0,03	320	200		445	390	880	845

G – glukóza; Glucose. M – maltóza; Maltose. – S – sacharóza; Sucrose.

¹Improved strain; ²Growth yield; ³Activity of β -D-fructofuranosidase [U/mg of dry weight]; ⁴Activity of α -glucosidase [μ mol PNPG/min/mg of

Tabuľka 16. Priemerné hodnoty kvalitatívnych ukazovateľov kultivácie 16-hodinového expedičného kvasenia vyšľachtených hybridných kmeňov navrhnutých na priemyselnú realizáciu
Table 16. Mean values of qualitative parameters of cultivation of 16-hour fermentation of improved hybrid strains which were proposed for industry

Droždie (kmeň) ¹	Začiatočná koncentrácia sušiny ² [g/l]	Konečná koncentrácia sušiny ³ [g/l]	Konečná koncentrácia etanolu ⁴ [ml/100 ml]	Výťažnosť sušiny na cukor [g/100 g]	Výťažok ⁶ D ₂₇ /M ₅₀ [g/100 g]	Špecifický objemový prírastok [g sušiny/l/h] ⁷	Generačná doba ⁸ [h ⁻¹]
OOSF-RH	13,6	48,7	0,121	44,98	83,31	2,05	7,7
PK 11	13,71	39,24	1,265	32,55	60,69	1,48	9,3
PK 14	13,145	48,45	0,051	46,95	86,95	2,14	7,4
PK 17	13,15	50,55	0,134	50,15	92,89	2,29	7,2
PK 19	13,135	50,39	0,005	49,39	91,4	2,26	7,2

¹Yeast (strain); ²Starting concentration of dry weight; ³Final concentration of dry weight; ⁴Final concentration of ethanol; ⁵Yield of dry weight per sugar; ⁶Yield; ⁷Specific increase in volume [g of dry weight/l/h]; ⁸Generation time.

v porovnaní so štandardným produkčným kmeňom *S. cerevisiae* OOSF-RH uvádzajú tabuľky 16 a 17.

Stanovením bunkového obsahu DNA a objemu buniek hybridných kmeňov sa zistilo, že vyšľachtené kmene sú polyploidné alebo aneuploidné (tab. 18). Všetky kmene skvasovali glukózu, sacharózu, maltózu, maltotriózu, trehalózu, rafinózu do 1/3, ale neskvasovali laktózu, melibiózu, xylózu, arabinózu, inulín ani celobiózu. V zhode s aktivitou v ceste na jemné pčieivo vyšľachtené kmene boli osmotolerantné, schopné rásť na pevných polosyntetických pôdach s obsahom glukózy, resp. sacharózy do 45 g/100 ml. Sporulačná schopnosť vyšľachtených kmeňov bola v rozmedzí 30 až 60 %. Vytvorené guľaté až mierne elipsovité asky obsahovali 3, resp. 4 spóry. Spontánna tvorba cytoplazmatických respiračne deficitných mutantov v populácii klonu všetkých štyroch vyšľachtených hybridných kmeňov bola nízka a ich výskyt menší ako 1 %.

Porovnaním priemerných hodnôt kvalitatívnych ukazovateľov 16-hodinového expedičného kvasenia za laboratórnych podmienok prítokovej kultivácie vidieť, že pri bezetanolovej fermentácii rastové výťažky, generačný čas i špecifický objemový prírastok vyšľachtených hybridov sa dali vcelku porovnať so štandardným kmeňom *S. cerevisiae* OOSF-RH (tab. 16). Na druhej strane však pri hybridných kmeňoch podstatne vzrástla kvasivosť v roztoku maltózy i sacharózy, čo sa výrazne odrazilo i v kvasnej aktivite droždia v ces-

na kultiváciu 16-hodinového expectu na priemyselnú realizáciu om of 16-hour fermentation of im- d for industry

Výťažok ⁶ D ₇₂₀ M ₉₀ [g/100 g]	Špecifický objemový prírastok [g suši- ny/l/h] ⁷	Generačná doba ⁸ [h]
83,31	2,05	7,7
60,69 86,95 92,89 91,4	1,48 2,14 2,29 2,26	9,3 7,4 7,2 7,2

concentration of dry weight; ⁷Final
eld; ⁸Specific increase in volume

m *S. cerevisiae* OOSF-RH

i buniek hybridných kme-
é alebo aneuploidné (tab.
maltózu, maltotriózu, tre-
melibiózu, xylózu, ara-
v ceste na jemné pčivo
ášť na pevných polysynté-
do 45 g/100 ml. Sporulač-
zi 30 až 60 %. Vytvorené
4 spóry. Spontánna tvor-
ov v populácii klonu všet-
a nízka a ich výskyt menší

ukazovateľov 16-hodino-
enok prítočkovej kultivá-
výťažky, generačný čas i
ov sa dali vcelku porov-
RH (tab. 16). Na druhej
ástia kvasivosť v roztoke
ej aktivite droždía v ces-

Tabuľka 17. Priemerné hodnoty kvalitatívnych znakov droždía vyrobeného na báze vyšľachtených hybridných kmeňov navrhnutých na priemyselnú realizáciu

Table 17. Mean values of qualitative parameters of baker's yeast produced from improved hybrid strains which were proposed for industry

Produkčný kmeň ¹	Obsah bielkovín ² [g/100 g]	Obsah ³ P ₂ O ₅ [g/100 g]	Kvasivosť ⁴ [ml/2 h]		Aktivita v ceste na bežné pečivo (+S) [ml/100 g cesta/90 min] ⁷		Aktivita v ceste na jemné pečivo [ml/ /100 g cesta/90 min] ⁹		Trvanli- vosť pri 35 °C [h]	Mohut- nosť kysu- tia, I. do- ba ¹¹ [min]
			sacha- róza ⁵	mal- tóza ⁶	CO ₂	objem cesta ⁸	CO ₂	objem cesta ⁸		
OOSF-RH	48,9	4,106	690	450	345	252	90	85	115	67
PK 11	52,5	4,46	710	680	415	220	35	45	90	57
PK 14	52,4	3,57	540	540	390	215	55	60	144	52
PK 17	47,4	–	838	702	440	370	140	140	72	49
PK 19	46,8	–	830	777	455	362	132	132	122	51

¹Industrial strain; ²Protein content; ³Content; ⁴Fermentation; ⁵Saccharose; ⁶Maltose; ⁷Activity in standard dough [ml/100 g of dough/90 min];

⁸Dough volume; ⁹Activity in sweet dough [ml/100 g of dough/90 min]; ¹⁰Keeping quality of yeast at 35°C; ¹¹Fermentation power, 1st period.

te. Hoci aktivita v ceste na bežné pečivo vzrástla o 10 až 30 % pri všetkých vybraných hybridných kmeňoch, signifikantné zvýšenie kvasnej aktivity v ceste na jemné pečivo sa pozorovalo iba pri hybridoch PK17 a PK19. Zo všetkých hybridných kmeňov bolo možné vyrobiť droždie s dobrou trvanlivosťou a obsahom bielkovín i P_2O_5 podobným štandardnému produkčnému kmeňu (tab. 17).

Tabuľka 18. Obsah DNA a veľkosť buniek vyšľachtených hybridných kmeňov pekárskych kvasiniek

Table 18. DNA content and cell size of improved hybrid strains of baker's yeast

Kmeň ¹	pg DNA/10 ⁶ buniek ²	V [μm ³]
DTXII (diploid)	42,5	112,9
55R5-RC (haploid)	24,1	50,6
PK 11	33,48	488,65
PK 14	48,11	266,45
PK 17	54,16	274,43
PK 19	50,74	288,8

¹Strains; ²pg DNA/10⁶ cells.

Výsledky analýz takto ukázali, že za podmienok expedičného kvasenia sa význačné vlastnosti hybridov väčšinou nezmenili a korelovali s výsledkami analýz biochemických vlastností zodpovedajúcich kmeňov kvasiniek kultivovaných aeróbne v polosyntetickej pôde.

Záverom možno zhrnúť, že na základe poznatkov o vzájomnej súvislosti medzi technologickými vlastnosťami droždia a biochemickými vlastnosťami kvasiniek, resp. ich genetickým pozadím sa za použitia originálnej metódy umožňujúcej hybridizačné šľachtenie priemyselných kmeňov kvasiniek podarilo vyšľachtiť nové hybridné kmene pekárskych kvasiniek, ktorých úžitková hodnota bola vyššia ako produkčných kmeňov trenčianskej droždiarne. Z vyšľachtených kmeňov navrhnutých na realizáciu sa za priemyselných podmienok výroby droždia overili vlastnosti kmeňov PK19 a PK17 v trenčianskej droždiarni. Na báze týchto kmeňov sa do konca roka 1987 vyrobilo celkom 246 ton expedičného i sušeného droždia vyšších kvalitatívnych znakov ako droždia vyrobeného z produkčného kmeňa OOSF-RH. Vzhľadom na optimálnejšie vlastnosti kmeňa PK17 je reálny predpoklad na zavedenie tohto kmeňa do priemyselnej výroby droždia namiesto doteraz používaných produkčných kmeňov pekárskych kvasiniek v n.p. Slovlik, Trenčín.

Ďakujeme kolektívu pracovníkov VÚ LIKO pod vedením Ing. S. Hunčíkovej, Ing. P. Halákovia a vedeniu n. p. Slovlik, závod 01, Trenčín za spoluprácu pri overovaní a realizácii výsledkov riešenia čiastkovej úlohy štátneho plánu RVT S 11-529-110/04, ktoré v skrátenej forme sú predmetom tejto práce.

Literatúra

- [2] BURROWS, S., In: The Yeast. Vol. 3. Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison. London, Academic Press 1970 s. 349.
- [3] BURROWS, S., In: Economic Microbiology. Vol. 4. Ed. A.H. Rose. London, Academic Press 1979, s. 31.
- [4] OURA, E. – SUOMALAINEN, H. – VISKARI, R., In: Economic Microbiology. Vol. 7. Ed. A.H. Rose. London, Academic Press, 1882, s. 87.
- [5] JOHNSON, J.R. – OBERMAN, H., In: Progress in Industrial Microbiology. Vol. 15. Ed. M.J. Bull. Amsterdam–Oxford–New York, Elsevier 1979, s. 151.
- [6] ŠUBÍK, J., Inform. LIKO 4, 1985, s. 5.
- [7] ŠUBÍK, J., Bull. PV, XXIII (III), 1984, č. 1, s. 11.
- [8] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Bratislava, Alfa – Praha, SNTL 1982.
- [9] MOLZAN, S.W., J. Am. Soc. Brew. Chem., 35, 1977, s. 54.
- [10] SPOZA, J.S. – BORODZIEJ, A., Nauk. Politech. Lodz. Chem. Spozyw., 1975, č. 1969, s. 215.
- [11] KOSIKOV, K.V. – MEDVEDEVA, A.A., Mikrobiologija, 45, 1976, s. 374.
- [12] SCHULTZ, A.S. – SWIFT, F.R., U.S. 2717839 (1955).
- [13] KOSIKOV, K.V. – RAEVSKAYA, O.G. KHOROSHUTINA, E.B. – PEREVERTAILO, G.A., Microbiology, 44, 1975, s. 615.
- [14] KOSIKOV, K.V., Microbiology, 46, 1977, s. 311.
- [15] RAEVSKAJA, O.G. – KOSIKOV, K.V., Mikrobiologija, 41, 1972, s. 500.
- [16] CHRISTENSEN, B. E., Carlsberg Res. Commun, 52, 1987, s. 253
- [17] KIROVA, K.A. – SHEVCHENKO, A.M., Ferm. Spirit. Prom., 1972, č. 5, s. 38.
- [18] KOSIKOV, K.V. – RAEVSKAJA, O.G., U.S.S.R. 384866 (1973).
- [19] Brit. 1152286 (1969).
- [20] LODDER, J. – KHOUDOKORMOFF, B. – LANGEJAN, A., A van Leeuwenhoek, 35, Suppl. F9, 1969.
- [21] HOOGERHEIDE, J.C., A van Leeuwenhoek, 35, 1969, s. 71.
- [22] FLÜCKIGER, R., Getreide, Mehl u. Brot, 28, 1974, s. 230.
- [23] KOPPENSTEINER, G. – WINDISCH, S.S., Arch. Microbiol., 83, 1972, s. 193.
- [24] WINDISCH, S.S. – STECKOWSKI, U., GORDIAN, 70, 1970, s. 336.
- [25] WINDISCH, S.S. – KOWALSKI, S. – ZANDER, I., Eur. J. Appl. Microbiol., 3, 1976, s. 213.
- [26] SEDLÁROVÁ, L., Šľachtenie kvasnicových mikroorganizmov pre účely potravinárskeho priemyslu, Čiastková záverečná správa VÚLK, 1964.
- [27] SEDLÁROVÁ, L., Šľachtenie mikroorganizmov pre ciele potravinárskeho priemyslu, č. ú. Šľachtenie pekárskeho kvasiniek so zreteľom na trvanlivosť. Čiastková záverečná správa VÚLK, 1966.
- [28] SEDLÁROVÁ, L., – MITTERHAUZEROVÁ, L., Šľachtenie mikroorganizmov pre potreby kvasného priemyslu, Čiastková záverečná správa VÚLK, 1966.
- [29] BURROWS, S. – FOWELL, R.R., Brit. 868621 (1961).
- [30] BURROWS, S. – FOWELL, R.R., Brit. 686633 (1961).
- [31] LANGEJAN, A. – KHOUDOKORMOFF, B., Brit. 1321714 (1973).
- [32] Belg. 843792 (1976).
- [33] Belg. 842191 (1978).
- [34] Brit. 989247 (1965).
- [35] BURROWS, S. – FOWELL, R.R. – WARREN, G.O., Brit. 1138640 (1969).
- [36] ŠUBÍK, J. – DUDÍKOVÁ, E. – GBELSKÁ, Y. – JURÍKOVÁ, K. – LEŠKOVÁ, Z. – OBERNAUEROVÁ, M. – TAKÁČSOVÁ, G. – HALÁSOVÁ, K., Výskum regulácií meta-

bolizmu priemyselných produkčných mikroorganizmov. Správa pre priebežnú oponentúru, S-11-529-110-04, Výskumná správa, VÚP Bratislava, 1983.

- [36] OBERNAUEROVÁ, M., Vplyv biochemického genetického pozadia priemyselných kmeňov na kvalitu pekárskoho droždia a aditív z neho pripravených. Kandidátska dizertačná práca. VÚP Bratislava, 1987.
- [37] OBERNAUEROVÁ, M. – ŠUBÍK, J., Bull. PV 26 (6), č. 3-4, 1987, s. 235.
- [38] OBERNAUEROVÁ, M. – ŠUBÍK, J., Bull. PV 26 (6), č. 3-4, 1987, s. 223.
- [39] DUDÍKOVÁ, E. – ŠUBÍK, J., Bull. Fodd Res. (Bratislava), Special Issue, 1986, s. 23.
- [40] PÁCA, J., J. Inst. Brew., 87, 1981, s. 147.
- [41] LILLIE, S.H. – PRIBGLE, J.R., J. Bacteriol., 143, 1980, s. 1384.
- [42] ŠUBÍK, J. – OBERNAUEROVÁ, M. – GBELSKÁ, Y. – DUDÍKOVÁ, E. – JURÍKOVÁ, K. – LEŠKOVÁ, Z. – HUNČÍKOVÁ, S. – HALÁK, P. – BLAŽEJ, A. – KELLERMAN, E., PV 5226-86.
- [43] ŠUBÍK, J. – OBERNAUEROVÁ, M., Aut. osv. 234884/85.
- [44] REED, G. – PEPLER, H.J., Yeast Technology. Westport, The AVI Publ. Co. Inc. 1973.
- [45] JURÍKOVÁ, K. – ŠUBÍK, J. – LEŠKOVÁ, Z., Inform. LIKO, 4, 1985, s. 12
- [46] ŠUBÍK, J. – OBERNAUEROVÁ, M. – GBELSKÁ, Y., Sborník ÚVTIZ, Potravn. Vědy, 1, 1983, č. 2, s. 87.
- [47] ŠUBÍK, J. – DUDÍKOVÁ, E. – GBELSKÁ, Y. – GRECO, G. – JURÍKOVÁ, K. – LEŠKOVÁ, Z. – OBERNAUEROVÁ, M. – HALÁSOVÁ, K. – HUNČÍKOVÁ, S. – ZAVŘELOVÁ, M. – ROESSEL, O., Závěrečná správa a realizačný výstup úlohy S 11-529-110-04. Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1985.
- [48] HUNČÍKOVÁ, S., Spolupráca pri riešení čiastkovej úlohy S 11-529-110-04. Správa za rok 1983. Trenčín, VÚ LIKO 1984.
- [49] ROESSEL, O., Spolupráca pri riešení čiastkovej úlohy S 11-529-110-04. Správa za rok 1984. Bratislava, VVJ MaPP 1985.

Облагораживание промышленных штаммов хлебопекарных дрожжей

Резюме

Рекомбинационное облагораживание хлебопекарных дрожжей осуществилось на базе результатов подробного изучения биохимических, генетических и технологических свойств серии промышленных штаммов и продуктов их мейозиса.

Вывестились 29 гибридных штаммов, из которых большинство сквашивало мальтозу более чем 40 процентов быстрее а также у них была броидильная активность в тесте на 10–30 процентов выше и меньше зависела от добавки экзогенной сахарозы чем стандартные штаммы дрожжей анализируемые в этих самых условиях.

Знаменательные свойства самых лучших гибридов были успешно проверены и в условиях промышленного производства дрожжей.

Improvement of industrial strains of baker's yeast

Summary

Cross-breeding of baker's yeast was made on the basis of detailed study of biochemical properties of various industrial strains and products of their meiosis.

29 new hybrid strains were selected. In most of them the rate of maltose fermentation activity was higher more than 1.4 times and in dough the fermentation activity of new strains was higher more than 1.1 to 1.3 times in comparison with standard baker's yeast strains analysed under the same conditions. In addition, this activity was less dependent on the addition of exogenous sucrose. Important properties of best hybrids were successfully verified under industrial conditions of yeast production.