

MAREK PRIMIK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ,
WANDA DUSZKIEWICZ-REINHARD

OTRZYMYWANIE HAPLOIDALNYCH FORM PIWOWARSKICH SZCZEPÓW DROŻDŻY

S t r e s z c z e n i e

Celem pracy było otrzymanie haploidalnych kultur wywodzących się ze szczepów piwowarskich *S. cerevisiae*. Zbadano dwa szczepy piwowarskie: R-II i R-9. Tylko szczep R-9 sporulował na badanych podłożach. Przeżywalność spor wyniosła 14 %. Otrzymano 20 populacji monosporowych, w tym 16 haploidalnych (posiadały typ płciowy). Jedna populacja (R-9/12) zarodnikowała, worki poddano rozkładowi. Przeżywalność spor wyniosła 30 %. Otrzymano 13 populacji monosporowych, w tym 10 o cechach haploidalnych.

Wstęp

Jednym z elementów postępu w przemyśle piwowarskim jest wprowadzanie nowych ras drożdży, o ulepszonych cechach technologicznych. Zainteresowania przemysłu obejmują przede wszystkim zwiększenie tempa metabolizmu maltozy i maltotriozy, wprowadzenie cechy typu „killer” oraz uzdolnień amylolitycznych, poprawę właściwości flokulacyjnych oraz modyfikację w kierunku niskiego poziomu produkcji diacetylu [10].

W programach poprawy cech technologicznych przemysłowych ras drożdży metodami zarówno klasycznej genetyki (mutagenizacja, hybrydyzacja płciowa i somatyczna), jak i za pomocą technik rekombinacji DNA *in vitro*, często odpowiednimi szczepami rodzicielskimi są formy haploidalne [5, 9, 12]. Przemysłowe rasy piwowarskie są zwykle poliploidalne, najczęściej tetra-, tri- lub aneuploidalne. Sporują słabo, rzadko tworząc tetrady, a spory charakteryzują się niską przeżywalnością. Kolonie otrzymane z pojedynczych spor są często homotaliczne lub nie mają zdolności do koniugacji z komórkami szczepu o przeciwnym typie płciowym [4]. Z tych względów otrzymanie dużej liczby kultur haploidalnych, przydatnych w dalszych pracach gene-

tycznych, jest zwykle uciążliwe. Z drugiej strony postęp w zakresie automatyzacji i komputeryzacji urządzeń do mikromanipulacji znacznie ułatwił najbardziej żmudny etap procedury pozyskiwania haploidów, co może pozwolić pokonać problem niskiej przeżywalności spor.

Celem niniejszych badań było otrzymanie stabilnych form haploidalnych z dwóch wybranych szczepów piwowarskich.

Material i metody badań

Szczepy

W badaniach użyto dwa szczepy piwowarskie *Saccharomyces cerevisiae*, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii Żywności SGGW: R-II oraz R-9. Do oznaczania typu płciowego populacji monosporowych wykorzystano dwa haploidalne szczepy: *S. cerevisiae* PMY 274 (*MATa his 3-Δ200 leu 2 - 3, 112 ura 3 - 52 lys 2 - 801 trp 1-1*) oraz *S. cerevisiae* PMY 275 (*MATα his 3-Δ200 leu 2 - 3, 112 ura 3 - 52 lys 2 - 801 trp 1-1*), z Zakładu Genetyki IBB PAN w Warszawie.

PODŁOŻA - składniki w g/dm³

Podłoże YPD do presporulacji, kiełkowania spor i koniugacji: glukoza 20; pepton 20; ekstrakt drożdżowy 10; agar do podłoża stałych 20; pH 5,0 [11].

Podłoża sporulacyjne: McClary`ego: octan potasu 10; ekstrakt drożdżowy 2,5; glukoza 1; agar 15 [13], SPA: octan potasu 10; ekstrakt drożdżowy 1; glukoza 0,5; agar 20 [11] oraz KAc: octan potasu 10.

Zastosowano odczynniki następujących firm: agar, ekstrakt drożdżowy – BioMerieux, Nancy; pepton – BTL Łódź; glukoza, octan potasu – PPH, Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice.

Warunki sporulacji

Szczepy piwowarskie namnażano w podłożu YPD, po czym przesiewano równolegle na podłoża McClary`ego, SPA i KAc, w celu wywołania sporulacji. Obecność worków sporulacyjnych badano mikroskopowo, kilkakrotnie w ciągu 14 dni hodowli. Wydajność sporulacji wyrażono jako procentowy udział wszystkich worków w populacji 300 policzonych komórek. Wydajność tetrad wyrażono jako procentowy udział tetrad (worków zawierających 4 spory) w populacji 300 policzonych komórek.

Otrzymywanie populacji monosporowych

Komórki pobrane z podłoża sporulacyjnych zawieszano w roztworze enzymu β -glukuronidazy z *Helix pomatia*, 90000 jedn./cm³, Sigma, w celu strawienia ścian worków sporulacyjnych. Pojedyncze spory izolowano za pomocą mikromanipulatora

(Singer MSM System series 200, Singer Instruments), na stałym podłożu YPD. Płytki inkubowano następnie w 30°C przez 7 dni. Przeżywalność spor określano jako procent wyizolowanych spor, które utworzyły widoczne gołym okiem kolonie (populacje monosporowe).

Badanie populacji monosporowych

Zdolność do sporulacji badano na podłożu McClary`ego, po uprzedniej presporulacji na płynnym podłożu YPD. Typ płciowy nie zarodnikujących populacji monosporowych oznaczano na podstawie zdolności badanych kultur do koniugacji z jednym z haploidalnych szczepów testowych o znanym typie płciowym. Mieszaninę populacji monosporowej i szczepu testowego namnażano na płynnym podłożu YPD, po czym przesiewano na podłoże McClary`ego i po 4-7 dniach badano obecność worków sporulacyjnych.

Wyniki i dyskusja

Prace nad uzyskaniem form haploidalnych rozpoczęto od zbadania zdolności sporulacyjnych szczepów piwowarskich R-II oraz R-9.

Szczep R-II nie sporulował na żadnym z badanych podłoży. Brak zdolności do sporulacji stwierdzili u niektórych szczepów piwowarskich również inni autorzy [1, 8]. Wprawdzie szczep R-II w niniejszych badaniach okazał się nieprzydatny do otrzymania form haploidalnych, nie jest wykluczone, że uda się wywołać u niego zarodnikowanie poprzez dobór odpowiednich warunków presporulacji i sporulacji [4].

Szczep R-9 najwięcej worków sporulacyjnych tworzył w podłożu KAc, jednak dobrą wydajność sporulacji osiągał również na podłożach stałych (Tab. 1). Najwięcej tetrad zaobserwowano także w podłożu KAc, ale nawet w tych warunkach większość worków sporulacyjnych zawierała tylko 2 lub 3 zarodniki. W celu otrzymania form haploidalnych nie wydaje się jednak konieczne izolowanie tetrad, gdyż nawet worki 1-, 2- i 3-zarodnikowe najczęściej zawierają wszystkie 4 produkty mejozy, a mniejsza liczba spor wynika z tego, że nie wszystkie haploidalne (gdy sporulował diploid) jądra zostały otoczone ścianą [7]. Z tego względu za bardziej przydatne w tego typu pracach uznano znacznie wygodniejsze podłoża stałe.

Sporę szczepu R-9 izolowano metodą mikromanipulacji. Przeżywalność spor była stosunkowo niska i jest to typowa cecha kultur piwowarskich [1, 14]. Na przeżywalność spor może mieć wpływ szereg czynników takich jak przedłużony czas działania enzymu litycznego, przedłużone przechowywanie kultur na podłożu sporulacyjnym czy warunki kiełkowania. Decydującą rolę wydają się jednak odgrywać czynniki genetyczne – segregacja recesywnych mutacji letalnych [3], triploidalność bądź aneuploidalność szczepów oraz brak lub ograniczenie rekombinacji między chromosomami w czasie mejozy [6].

Tabela 1

Wpływ podłoża sporulacyjnego na wydajność sporulacji i wydajność tetrad szczepu piwowarskiego R-9.
Effect of sporulation medium on the efficiency of sporulation and tetrad formation of brewing strain R-9.

Podłoże sporulacyjne Sporulation medium	Wydajność sporulacji [%] Efficiency of sporulation [%]	Wydajność tetrad [%] Tetrad fomation [%]
Podłoże McClary`ego McClary`s agar	42	3
SPA	42	0,5
KAc	67	12

Tabela 2

Przeżywalność spor i charakterystyka otrzymanych populacji monosporowych.
Spore viability and characteristics of monospore populations.

Szczep Strain	Przeżywalność spor Spore viability	Liczba zbadanych populacji monosporowych Number of examined monospore populations		
		Ogółem Total	Sporulujące Able to sporulate	O oznaczonym typie płciowym With mating type
R-9	14	20	1	16
R-9/12	30	13	1	10

W kolejnym etapie pracy zbadano 20 otrzymanych populacji monosporowych (tab. 2). Tylko jedna kultura (R-9/12) była zdolna do sporulacji, natomiast 16 posiadało stabilny typ płciowy. Tak duży udział kultur wykazujących cechy form haploidalnych o typie płciowym α lub α wskazuje na to, że szczep R-9, mimo niskiej przeżywalności spor, może być obiecującym materiałem rodzicielskim w pracach nad genetyczną poprawą cech technologicznych szczepów piwowarskich.

Ze sporulującej kultury R-9/12 izolowano zarodniki i stwierdzono znaczny wzrost przeżywalności spor w porównaniu z macierzystym szczepem przemysłowym. Może on być wywołany eliminacją recesywnych mutacji letalnych oraz zaburzeń mejozy związanych z aneuploidalnością bądź triploidalnością szczepu R-9. Wśród 13 zbadanych populacji otrzymanych ze spor kultury R-9/12 typ płciowy posiadało aż 10, jednak 1 kultura była zdolna do sporulacji, co prawdopodobnie świadczy o występowaniu w rasie R-9 cechy homotalizmu. Cecha ta stwarza możliwości poprawy przeżywalności spor. Po uzyskaniu maksymalnej przeżywalności spor stabilne haploidalne formy heterotaliczne można otrzymać metodą hybrydyzacji płciowej ze szczepem heterotalicznym połączonej z serią krzyżówek wstecznych [2].

Wnioski

1. Ze szczepu R-9 otrzymano 26 kultur jednozarodnikowych o cechach haploidalnych.
2. Szczep R-II okazał się nieprzydatny do otrzymywania form haploidalnych.
3. Największą przeszkodę w pozyskiwaniu form haploidalnych ze szczepu R-9 stanowi niska przeżywalność spor.
4. Mimo niskiej przeżywalności spor szczep R-9 może być przydatny w programach genetycznej poprawy cech szczepów piwowarskich, gdyż komputeryzacja urządzeń do mikromanipulacji pozwala na szybką izolację dużej liczby spor, a większość otrzymanych z tego szczepu kultur jednozarodnikowych posiada cechy haploidalne.
5. Zdolność niektórych kultur do sporulacji może być wykorzystana do otrzymania szczepów o wyższej przeżywalności spor.

LITERATURA

- [1] Anderson E., Martin P.A.: The sporulation and mating of brewing yeasts. J. Instit. Brew., **81**, 1975, 242.
- [2] Bakalinsky A.T., Snow R.: Conversion of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* to heterothallicism. Appl. Environ. Microb., **4**, 1990, 849.
- [3] Beckerich J. M., Fournier P., Gaillardin C., Heslot H., Rochet M., Treton B.: Yeasts. s. 115-157. [w] Genetics and breeding of industrial microorganisms. ed. Ball C. CRC Press Inc. Boca Raton. Fla. 1984.
- [4] Bilinski C.A., Casey G.P.: Developments in sporulation and breeding of brewer's yeast. Yeast, **5**, 1989, 429.
- [5] Ibragimova S.I., Kozlov D.G., Kartasheva N.N., Suntsov N.I., Efremov B.D., Benevolensky S.V.: A strategy for construction of industrial strains of distiller's yeast. Biotech. Bioeng., **46**, 1995, 285.
- [6] Kielland-Brandt M.C., Nilsson-Tillgren T., Petersen J.G.L., Holmberg S., Gjermansen C.: Approaches to the genetic analysis and breeding of brewer's yeast. s. 421-437. [w] Yeast Genetics. Fundamental and applied aspects. eds. Spencer J.F.T., Spencer D.M., Smith A.R. 1983. Springer Verlag. New York. Berlin. Heidelberg. Tokyo.
- [7] Miller J.J.: Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. s.489-550. [w] The yeasts. Vol. 3. eds. Rose A. H., Harrison J., London 1989.
- [8] Oberman H., Pabiś E.: Obtaining of spore cultures and hybrids of top-fermenting brewers' yeast. Acta Aliment. Pol., **7** (31), 1981, 1-2, 81.
- [9] Pretorius I.S., van der Westhuizen T.J.: The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry - a review. South African J. Enol. and Viticul., **12** (1), 1991, 3.
- [10] Reed G., Nagodawithana T.W.: Yeast Technology. New York 1991.
- [11] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: Methods in Yeast Genetics. New York. 1990.
- [12] Sałek A., Arnold W.M.: Construction of ethanol-resistant, osmophilic industrial strains of *Saccharomyces* sp. Chem. Mikrob. Technol. Lebensm. 1994, **16** (5/6), 165

- [13] Spencer J.F.T., Spencer D.M., Schiappacasse M.C., Heluane H., Reynolds N., Figueroa L.I.: Two new methods for recovery and genetic analysis of hybrids after fusion of yeast protoplasts. *Current Microb.*, **18** (5), 1989, 285.
- [14] Stewart G.G., Panchal C.J., Russell I.: Current developments in the genetic manipulation of brewing yeast strains - a review. *J. Instit. Brew.*, **89**, 1983, 170.

OBTAINMENT OF HAPLOID FORMS OF BREWING YEAST STRAINS

S u m m a r y

The aim of the study was to obtain haploid populations from brewer's yeasts. Two brewing strains: R-II and R-9 were examined. Only strain R-9 was able to sporulate. Spore viability was 14%. 20 monospore populations were obtained, 16 of them were haploid (possessed mating type). One population (R-9/12) was able to sporulate, asci were dissected. Spore viability was 30%. 13 monospore populations were obtained, 10 of them were haploid.

