

TASOWANIE GENOMOWE JAKO ALTERNATYWNA METODA ULEPSZANIA WŁAŚCIWOŚCI TECHNOLOGICZNYCH DROŻDZY GORZELNICZYCH

Aleksandra Wawro*

Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii,
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w lipcu 2018 r.

Streszczenie: Nowoczesne technologie produkcji bioetanolu wymagają drożdży gorzelniczych charakteryzujących się termotolerancją, osmotolerancją i zwiększonej odporności na metabolity wtórne. Do tej pory nie zaobserwowano w naturze żadnych szczepów łączących wszystkie wyżej wymienione cechy. Od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad poprawą właściwości technologicznych szczepów przemysłowych. Opracowano szereg metod umożliwiających genetyczną poprawę drożdży gorzelniczych. Jedną z najbardziej obiecujących i skutecznych metod jest tasowanie genomowe, umożliwiające tworzenie hybryd, których genom jest wynikiem połączenia dużych fragmentów DNA pochodzących ze szczepów o wyraźnych różnych cechach fenotypowych. Tasowanie genomowe stwarza wielką szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne, łącznie z ich kompletnymi operonami, co zwiększa szansę na długoterminowe utrzymanie korzystnych cech technologicznych przez uzyskane hybrydy drożdży gorzelniczych.

1. Wstęp. 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Genom drożdży. 2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu. 3. Kierunki ulepszania genetycznego. 4. Metody ulepszania genetycznego. 5. Tasowanie genomowe. 5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego. 6. Podsumowanie

Genome shuffling as an alternative method of improving the properties of distillery yeast

Abstract: Modern technologies of bioethanol production require distillation yeast characterized by thermotolerance, osmotolerance and increased resistance to secondary metabolites. To date, no strains have been observed in nature which possess all of the above-mentioned characteristics. For many years, intensive research has been carried out to improve the technological properties of industrial strains. A number of methods have been developed to allow genetic improvement of distillery yeasts. One of the most promising and effective methods is genome shuffling, allowing the creation of hybrids whose genome is a combination of large DNA fragments derived from strains with distinct phenotypic traits. Genome shuffling creates a chance that the new strain will have valuable functional genes, including their full operons. This, in turn, increases the chance of a long-term maintenance of beneficial technological features by the obtained hybrids.

1. Introduction. 2. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Yeast genome. 2.2. Role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the bioethanol production. 3. Pathways of genetic improvement. 4. Methods of genetic improvement. 5. Genome shuffling. 5.1. Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains by genome shuffling method. 6. Conclusion

Słowa kluczowe: tasowanie genomowe, drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, produkcja bioetanolu

Key words: genome shuffling, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol production

1. Wstęp

Współczesne technologie produkcji bioetanolu oparte są na jednoetapowym procesie fermentacji etanolowej, połączonym z procesem hydrolizy roślinnych polisacharydów (-SSF), który jest dużo wydajniejszy, ze względu na uproszczoną linię technologiczną oraz skrócenie łącznego czasu hydrolizy i fermentacji [31]. Ze względu na to, że w procesie SSF mikroorganizmy i enzymy umieszczane są w jednym bioreaktorze, drożdże gorzelnicze mają możliwość dużo szybszego przekształcania glukozy w etanol, a ciągłe usuwanie cukrów z podłoża zmniejsza hamowanie aktywności enzymów [12, 50]. Mimo wielu zalet, technologia SSF posiada wady, związane z różnicami między optymalnymi temperaturami dla działania celulaz i wzrostu komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Optimum

temperaturowe dla enzymów wynosi 50–60°C, podczas gdy zakres temperatur, przy których wzrastają drożdże gorzelnicze mieści się w granicach od 30 do 37°C [6, 11, 42]. Prowadzenie hydrolizy w temperaturach właściwych dla drożdży spowalnia jej przebieg, zmniejszając tempo wytwarzania etanolu [56]. Dla wydajnej konwersji biomasy do etanolu ważne jest, by drożdże *S. cerevisiae* były odporne na pogarszające się warunki środowiska zewnętrznego, w których wzrastają i metabolizują [14, 22, 26]. Podczas produkcji bioetanolu poważną przeszkodą dla drożdży jest stosowanie brzączek fermentacyjnych o wysokiej gęstości, czego konsekwencją jest zwiększone ciśnienie osmotyczne. Inną operacją jednostkową, wykorzystywaną w przemyśle gorzelniczym, jest wysokotemperaturowa obróbka hydrotermiczna, ułatwiająca działanie enzymów celulo-lytycznych i hemicelulo-lytycznych, a przebiegająca czę-

* Autor korespondencyjny: Aleksandra Wawro, Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań; tel. 618455-814; e-mail: aleksandra.wawro@iwnirz.pl

sto w temperaturze powyżej 200°C. W takich warunkach tworzy się wiele różnych toksyn jak kwas octowy, furfural i hydroksyfurfural, które wpływają negatywnie na fizjologię drożdży [22].

Od lat trwają poszukiwania szczepów drożdży o zwiększonej tolerancji na czynniki stresowe. Najtrudniejszym elementem przy konstrukcji takich szczepów jest połączenie w jednym mikroorganizmie jednocześnie kilku korzystnych cech. Dotychczas stosowane metody nie gwarantowały pozyskanie szczepów długotrwale zachowujących pozytywne cechy. W ostatnich latach pojawiły się nowe techniki modyfikacji genetycznej drożdży, umożliwiające uzyskanie szczepów łączącego kilka unikalnych, przydatnych przemysłowo właściwości technologicznych.

2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże to jednokomórkowce, których kształt uzależniony jest od rodzaju drożdży, a także stanu fizjologicznego komórek. Istotne oddziaływanie na ich kształt mają również radykalne warunki środowiskowe. Natomiast wielkość komórek zależy od gatunku, stopnia rozwoju oraz warunków hodowli [8].

Ściana komórkowa drożdży stanowi średnio 10–25% s.s. całej masy komórkowej, udział ten zależy przede wszystkim od warunków wzrostu. Głównymi składnikami ściany komórkowej wszystkich grzybów są polisacharydy i glikoproteiny. W obecności środowiska hipertonicznego komórka zaczyna się bardzo gwałtownie kurczyć i dochodzi wtedy do utraty nawet 60% pierwotnej objętości [24]. Z kolei w środowisku hypoosmotycznym, gdy woda przenika do wnętrza komórki, dochodzi do jej pęcznienia, co może spowodować rozerwanie błony komórkowej i śmierć samej komórki [8, 34]. Drożdże w większości są organizmami mezofilnymi i najlepiej wzrastają w temperaturze 20–28°C, choć są też gatunki psychrofilne (4–15°C) oraz termofilne (powyżej 30°C) [8]. Komórki drożdży rosną prawidłowo w obecności wody, gdyż od wody zależne są przemiany metaboliczne i transport składników odżywczych. Istotne jest także stężenie cukrów i soli rozpuszczonych w wodzie, które w dużej ilości powodują obniżenie aktywności wody (a_w). Optymalna aktywność wody odpowiada optymalnemu ciśnieniu osmotycznemu, wtedy szybkość wzrostu i aktywność życiowa drożdży jest największa [8, 29, 43]. *Saccharomyces cerevisiae* klasyfikowane są do drożdży, których optimum temperaturowe mieści się w zakresie 30–35°C, a nieznaczne odchylenia od minimum i maksimum uzależnione są od poszczególnych szczepów [55]. Zbyt wysoka, jak również zbyt niska temperatura powoduje uszkodzenie cytoplazmatycznej błony komórkowej, co w efekcie prowadzi do zaburzenia jej przepuszczalności [44].

2.1. Genom drożdży

Genom drożdży *S. cerevisiae* był w historii genetyki pierwszym genomem eukariotycznym, który został zsekwencjonowany w całości. Dokładnie 24 kwietnia 1996 roku, dzięki współpracy 600 naukowców z Europy, Ameryki Północnej i Japonii, oficjalnie przedstawiono jego pełną sekwencję nukleotydową [15, 19, 32]. Grzyby jako najprostsze eukarionty mają genomy mniejsze, ale już kręgowce, mają genomy zdecydowanie większe. Jednakże zależność ta, nie jest do końca jasna, co opisuje tzw. paradoks wartości C (ilość DNA w haploidalnym genomie). W drugiej połowie XX w. przeprowadzono badania, które wykazały, że w genomach organizmów mniej złożonych, są dużo lepiej zagospodarowane przestrzenie, a geny znajdują się bardzo blisko siebie i stąd ich ilość jest większa [2]. Genom drożdży zawiera większą liczbę genów, a wśród nich tylko nieliczne geny są nieciągłe (poprzerywane odcinkami niekodującymi), posiada także niewiele powtarzających się sekwencji rozproszonych w genomie. Według doniesień naukowych prawie 23% genomu drożdży jest niemal identyczne jak genomu ludzkiego [9].

Plastyczność genomu drożdży jest bardzo ważnym warunkiem wpływającym na dynamiczną adaptację do zmian środowiskowych. Geny, a nawet całe operony, są przenoszone jako mobilne jednostki genetyczne przez wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe transfery. Następnie geny lub też operony ulegają rozległym procesom rekombinacji. W przypadku organizmów eukariotycznych powtarzające się sekwencje odgrywają jeszcze istotniejszą rolę. W genomie eukariotycznym aż 50% stanowią elementy ruchome, które mogą działać jako rekombinacyjne „hot-spots” (tzw. gorące miejsca, bardzo podatne na mutacje), do których sekwencje chętniej się przyłączają [38]. Dzięki temu możliwe jest zapewnienie skuteczności opisywanej w tym artykule metody tasowania genomowego.

2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu

Fermentacja glukozy do etanolu i dwutlenku węgla przez drożdże odbywa się na szlaku fruktozobisfosforanowym, w którym metabolizowana jest jedna cząsteczka glukozy, powstają dwie cząsteczki pirogronianu, przekształcane w następnym etapie do aldehydu octowego, ulegającego redukcji do etanolu. Dochodzi także do wydzielania ditlenku węgla. Powstające w wyniku glikolizy dwa mole ATP są wykorzystywane do procesów biosyntezy składników komórek drożdży, która obejmuje szereg bioreakcji wymagających energii [16, 44]. Stąd też, produkcja etanolu jest w istotny sposób połączona ze wzrostem komórek drożdży. Bez ciągłego wykorzystania cząsteczek ATP przez drożdże do

ich wzrostu, glikoliza zostaje natychmiast zatrzymana, ponieważ kumulacja wewnątrzkomórkowa cząsteczek ATP powoduje hamowanie działania fosfofruktokinazy (PFK), jednego z najważniejszych enzymów regulacyjnych procesu glikolizy [3].

Maksymalne stężenie etanolu jest zależne od odporności drożdży na powstały produkt, a wraz ze wzrostem stężenia etanolu szybkość fermentacji zawsze ulega znaczącemu spowolnieniu. Toksyczne działanie etanolu wpływa na procesy metaboliczne, a jego najsilniejsze działanie przypada na etap rozmnażania komórek drożdży. Odporność drożdży na etanol zależy przede wszystkim od składu chemicznego ich błony cytoplazmatycznej, co z kolei wynika z obecności lub braku tlenu w środowisku [10, 23].

Głównymi cechami drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* jest zdolność do przeprowadzenia szybkiej i dynamicznej fermentacji etanolowej, a także odporność na 10–15% stężenia etanolu oraz wysoka zdolność fermentowania cukrów z grupy heksoz (glukoza, maltoza, sacharoza, galaktoza). Drożdże najefektywniej fermentują w temperaturze 30–33°C przy stosunkowo niskim pH. Są odporne na działanie takich kwasów organicznych, jak kwas winowy, jabłkowy czy cytrynowy i innych kwasów nietlotnych. Natomiast kwasy lotne, takie jak octowy, są dla drożdży toksyczne [13, 27, 30, 39].

3. Kierunki ulepszania genetycznego

Istnieje bardzo wiele czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych środowiska zewnętrznego, które w istotny sposób wpływają na wzrost i metabolizm komórek drożdży *S. cerevisiae* [22, 47]. Do najważniejszych zmian środowiskowych, nazywanych często stresami środowiskowymi, które determinują działanie mikroorganizmów podczas procesu fermentacji etanolowej należą: podwyższenie temperatury procesu, związane z zastosowaniem technologii SSF (stres temperaturowy), zwiększenie ciśnienia osmotycznego, ze względu na wysoki poziom cukru (stres osmotyczny), zwiększenie stężenia etanolu, co jeszcze bardziej pogłębia stres osmotyczny i powoduje hamowanie wzrostu drożdży, zwiększenie stężenia toksycznych związków chemicznych, takich jak: furfural, hydroksyfurfural oraz kwas octowy, zwiększenie toksyczności powstającej w wyniku peroksydacji lipidów oraz produkcji rodników nadtlenkowych i związków aldehydowych (stres oksydacyjny) a także stres mechaniczny, wynikający z działania urządzeń stosowanych podczas procesu fermentacji, prowadzący do uszkodzeń komórek drożdży [22]. Względna odporność *S. cerevisiae* na pojawiające się stresy środowiskowe, jest powodem najczęstszego wyboru tego gatunku mikroorganizmów do procesów

fermentacyjnych [37]. Jednakże, konieczne jest poznanie mechanizmów odpowiedzi komórek drożdży gorzelniczych na stresy środowiskowe oraz podejmowanie próby maksymalnego zredukowania negatywnych skutków, co bezpośrednio łączy się z usprawnianiem przebiegu procesu produkcji bioetanolu.

Drożdże gorzelnicze wykazują dużą zdolność do rozkładu glukozy i w konsekwencji do wytwarzania bioetanolu, zarówno w przypadku surowców skrobiowych, jak i lignocelulozowych. Istotny problem stanowi jednak brak zdolności do biosyntezy enzymów niezbędnych do przekształcania polisacharydów. W przypadku polimerów skrobiowych bardzo ważne są enzymy amylolityczne, natomiast do hydrolizy biomasy lignocelulozowej kluczowe jest działanie enzymów celulolitycznych i hemicelulolitycznych. Obecnie szeroką perspektywę stanowią rekombinanty drożdży *S. cerevisiae*, które dzięki swoim nowo nabytym właściwościom, w sposób bezpośredni przekształcają skrobię i celulozę do glukozy [25, 60].

Drożdże gorzelnicze *S. cerevisiae* stosowane w procesie fermentacji etanolowej nie są zdolne do fermentacji pentoz [52]. Nie posiadają także wystarczającej aktywności celulolitycznej, hemicelulolitycznej i amylolitycznej [55]. Pierwsze próby opracowania metod inżynierii metabolizmu cukrów prostych u drożdży zostały podjęte w latach 70. dwudziestego wieku [17]. Zasadniczym celem jest wytworzenie zdolności szczepów produkujących etanol do rozkładu pentoz. Jednym z głównych kierunków w tym zakresie, jest metoda polegająca na wprowadzeniu do komórek drożdży genów metabolizmu ksylozy i arabinozy z innych organizmów. Pomimo tego, że drożdże *S. cerevisiae* nie mają zdolności metabolizmu ksylozy, to na podłożu z ksylulozą w warunkach ograniczonego natleniania wytwarzają nieznaczne ilości etanolu. Ksyluloza jest poddawana reakcjom utleniania i redukcji, a przedtem jest fosforylowana przez ksylulokinazę (XKS1) do ksylulozo-5-fosforanu. W następstwie, podczas reakcji szlaku pentozo-fosforanowego zostaje przekształcona do intermediatów glikolizy, co w ostateczności może prowadzić do wyprodukowania etanolu [40, 51].

4. Metody ulepszania genetycznego

W ostatnich kilkudziesięciu latach najczęściej stosowanymi metodami ulepszania genetycznego szczepów były metody klasyczne, jak mutagenizacja i fuzja protoplastów, a także metody inżynierii genetycznej wykorzystujące technologie rekombinacji DNA *in vitro* – klonowanie genów [18, 33, 58]. Klasyczne metody doskonalenia drobnoustrojów są znane od początku istnienia przemysłu biotechnologicznego, a jednak ich zakres możliwości modyfikacyjnych jest ograniczony.

Z kolei inżynieria genetyczna stwarza dużo większą szansę na uzyskanie szczepów o nowych właściwościach [36]. Odpowiedź komórek *S. cerevisiae* na stresy środowiskowe jest kontrolowana przez system wielogenowy, który rozmieszczony jest w genomie drożdży w wielu loci. Wiele z tych genów nie jest dostatecznie scharakteryzowana fenotypowo i mało jest danych na temat ich organizacji, stąd klasyczne metody inżynierii genetycznej są mało przydatne podczas oddziaływania na tolerancję komórkową. Dlatego też istotnym narzędziem doskonalenia przemysłowych szczepów mikroorganizmów stała się inżynieria kombinatoryczna i należąca do niej metoda tasowania genomowego. Technika ta pozwala na ukierunkowaną ewolucję całych organizmów poprzez rekurencyjne rekombinacje na poziomie genomu [7].

Wraz z rozwojem technik inżynierii biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej, coraz prostsze jest bezpośrednie wprowadzanie zmian do materiału genetycznego, a ocena efektów tych zmian nabiera znaczenia. Analizą efektów zmian genetycznych posługuje się inżynieria metaboliczna [18]. Została opisana jako „ukierunkowana poprawa tworzenia produktów lub właściwości komórkowych poprzez modyfikacje specyficznych reakcji biochemicznych lub wprowadzenie nowych, z wykorzystaniem technologii rekombinacji DNA” [49]. Inżynieria metaboliczna uwzględnia całe systemy komórkowe oraz wszelkie manipulacje genetyczne zmieniające ogólną wydajność bioprocessów, co odróżnia ją od prostych metod inżynierii genetycznej [5]. Inżynieria metaboliczna jest interdyscyplinarną dziedziną, która wykorzystuje zasady inżynierii reakcji chemicznych, informatyki, biochemii i biologii molekularnej w celu modyfikacji szlaków metabolicznych i uzyskania maksymalnego strumienia wybranego metabolitu [28]. Zastosowanie inżynierii metabolicznej dla poprawy fenotypów wynika z pojawienia się bardziej wszechstronnych narzędzi genetycznych, a także ze wzbogaconej wiedzy o komórce mikroorganizmów. Mimo niezwykłych rezultatów, jakie zostały osiągnięte poprzez zastosowanie inżynierii metabolicznej, braki dotyczące szczegółowej wiedzy na temat relacji genotyp-fenotyp ograniczają wykorzystywanie tej metody [21]. Za to coraz częściej pojawiają się doniesienia naukowe sugerujące łączenie inżynierii metabolicznej z tasowaniem genomowym. Podejście tasowania genomowego ma potencjał do ułatwienia działań inżynierii metabolicznej i stanowi jej alternatywę, prowadząc do szybkiego uzyskania pożądanego fenotypu i generowania ulepszonych szczepów przemysłowych [21, 48, 53]. Technika ta może być zintegrowana z inżynierią metaboliczną w celu promowania zdolności ewolucyjnych złożonego fenotypu. Metody, takie jak tasowanie genomowe powinny być włączone jako integralne części narzędzi nowoczesnej inżynierii metabolicznej [21].

5. Tasowanie genomowe

Tasowanie genomowe (genome shuffling) należy do narzędzi inżynierii kombinatorycznej. Po raz pierwszy metoda ta została zaprezentowana w 2002 roku przez zespół Willema P.C. Stemmera. Badacze ci, koncentrowali się przede wszystkim na poprawie szczepów poprzez tasowanie DNA oraz ewolucję ukierunkowaną. Technika tasowania DNA to metoda *in vitro* homologicznej rekombinacji puli wybranych genów zmutowanych przez losową fragmentację i ponowną łańcuchową reakcję polimerazy. Dzięki tasowaniu DNA, udało się uzyskać ukierunkowaną ewolucję kilku genów, dlatego też jako podobną strategię proponowano właśnie tasowanie genomowe [21]. Proces ten łączy w sobie zaletę krzyżowania wielu rodziców, umożliwionego przez tasowanie DNA, a także rekombinacji całych genomów, związanej z konwencjonalnymi hodowlami lub też fuzją protoplastów [1]. Dzięki tasowaniu możliwa jest jednoczesna zmiana genetyczna w różnych pozycjach całego genomu, oparta na plastyczności genomu, bez konieczności zdobywania danych na temat jego sekwencji [21, 38]. Ze względu na jednoczesne zmiany w różnych pozycjach genomu, tasowanie umożliwia zgromadzenie pozytywnych mutacji oraz eliminację tych zbędnych, a zatem daje możliwość pozyskania mikroorganizmów najlepiej dopasowanych do wybranych warunków hodowli [54].

Tasowanie genomowe bazuje na wytwarzaniu genetycznej oraz fenotypowej różnorodności w populacji w następstwie badań przesiewowych oraz selekcji ulepszonych fenotypów [21]. Podczas gdy klasyczne metody ulepszania mikroorganizmów pomagają jedynie wybrać mutanty do następnych rund, tasowanie genomowe wykorzystuje znacznie większą proporcję różnorodności obecnej w danej populacji [48]. Dotychczas stosowane metody ulepszania mikroorganizmów nie gwarantowały pozyskania szczepów, które długotrwale zachowywałyby pożądane cechy. Tasowanie pozwala na łączenie całych genomów, co stwarza szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne łącznie z ich kompletnymi operonami, zawierającymi obok genów funkcjonalnych także geny regulujące ich ekspresję. Daje to możliwość długotrwałego utrzymania pożądanego fenotypu przez powstałe hybrydy. Naukowcy z grupy W.C.P. Stemmera, dokonali porównania efektów ulepszania szczepów dokonywanych metodami klasycznymi i metodą tasowania genomowego. Autorzy stwierdzili, że 20 rund klasycznych metod poprawy szczepu, przy wykorzystaniu ok. miliona testów, wykonywanych przez okres 20 lat, pozwoliło na uzyskanie 6-krotnie większej produkcji naturalnych wtórnych metabolitów przez szczepy. Natomiast w przypadku tasowania, już dwie rundy były wystarczające do osiągnięcia podobnych

wyników, w ciągu jednego roku i przy użyciu tylko 24 tys. testów [61].

Technika tasowania jest szczególnie odpowiednia dla poprawy wielu cech fenotypowych, które są trudne do zmodyfikowania poprzez metody tradycyjne, ze względu na brak informacji na temat zestawu genów, które muszą zostać zmodyfikowane, by móc wywołać korzystny wpływ zmian [4]. W porównaniu z innymi technikami inżynierii genetycznej, tasowanie genomowe jest dużo wygodniejsze i łatwiejsze do realizowania. Zastosowanie tej metody nie wymaga drogich urządzeń i materiałów, stąd też jej koszt nie jest wysoki. Ponadto, z uwagi na relatywnie prostą i precyzyjną możliwość wykonania, tasowanie może być upowszechnione w wielu laboratoriach badawczych [21].

Tasowanie genomowe to technika oparta na fuzji protoplastów stosowanej do modyfikacji cech fenotypowych już od późnych lat 70. dwudziestego wieku. Protoplasty pochodzące z różnych szczepów z sukcesem są łączone, co wskazuje na bardzo szerokie zastosowanie techniki w inżynierii komórki [21, 38]. Pomimo tego, że metoda tasowania genomowego pochodzi od fuzji protoplastów, to w istotny sposób różni się od niej. Jak już wspomniano, konwencjonalna fuzja odbywa się pomiędzy dwiema komórkami o różnych cechach genetycznych i w konsekwencji można uzyskać silne rekombinanty z cechami pochodzącym od obu rodziców. Efekt rekombinacji wynika z połączenia tylko dwojga rodziców z jednego pokolenia. Tasowanie genomowe umożliwia kombinację pomiędzy wieloma rodzicami z każdego pokolenia, a także kilka powtarzających się rund fuzji genomu. Możliwe jest także łączenie genomów pochodzących od organizmów należących do odległych grup taksonomicznych i przyłączenie do genomu danej komórki fragmentów wyizolowanego DNA. Takie podejście zdecydowanie zwiększa różnorodność genetyczną potomstwa i znacząco podwyższa szansę na uzyskanie wysokiej wydajności szczepu.

Efektywność tasowania genomowego jest wyższa niż konwencjonalnych metod, takich jak mutagenizacja czy fuzja protoplastów, gdyż technika ta przyspiesza proces poprawy właściwości szczepów poprzez rekursywną fuzję protoplastów pomiędzy szczepami wielu rodziców. Jeżeli zaangażowana jest większa liczba szczepów rodzicielskich, wtedy można uzyskać proporcjonalnie więcej hybryd. Konieczne jest wskazanie, że kluczową zaletą tasowania jest wzmacnianie różnorodności genetycznej populacji potomstwa. Ważny jest też fakt, że metoda tasowania genomowego nie ogranicza się tylko do mikroorganizmów, które mają „klarowne” podłoże genetyczne. Mimo że, konwencjonalna technologia rekombinacji genu pozwala na kombinacje między wieloma rodzicami, to odnosi się tylko do fragmentów DNA, a nie do całych genomów. Wprawdzie fenotyp komórkowy jest przejawem globalnego poziomu eks-

presji genu, zapotrzebowania metabolicznego czy stresów komórki, to jednak profil komórkowy zależy od ekspresji dużej liczby genów, które są słabo poznane i bardzo szeroko rozmieszczone w genomie. Tasowanie jako strategia inżynierii całych genomów, mająca możliwości wykorzystywania mikroorganizmów bez znajomości podłoża genetycznego, jest dużo bardziej skuteczna [21, 41]. Biorąc pod uwagę, że tasowanie genomowe opiera się na naturalnej rekombinacji homologicznej, otrzymana zmutowana populacja, nie jest uważana za organizmy zmodyfikowane genetycznie. Ulepszone tą metodą szczepy mogą być stosowane m.in. do produkcji bioetanolu [21, 38, 46, 59].

Biblioteka szczepów rodzicielskich jest konstruowana na bazie skringingu szczepów wyjściowych (dzikich) lub mutantów w oparciu o różnice fenotypowe. Tworzenie biblioteki ma też na celu generowanie większej liczby genotypów. Pożądane szczepy w kolejnym etapie ulegają rekursywnej fuzji protoplastów. Główną ideą selekcji szczepów rodzicielskich jest właśnie wytworzenie różnorodności fenotypowej oraz genotypowej. Brak doboru odpowiedniej selekcji powoduje, że nie zostaje uzyskany pożądany fenotyp. Do pierwszego etapu tasowania powinny być stosowane zarówno szczepy dzikie z wysoką wydajnością, jak i populacje o zwiększonej różnorodności. Konstrukcja biblioteki szczepów rodzicielskich bazuje na klasycznym podejściu, takim jak mutagenizacja, która jest wiodącą metodą aktywowania zróżnicowanej populacji [21]. W tym procesie szczep dziki poddawany jest jednej lub kilku rundom mutagenizacji, przy udziale mutagenu. Tasowanie genomowe wykorzystuje różnorodność wśród populacji już istniejących i pozwala na tzw. krzyżowanie wsteczne (potomka z rodzicem), aby wyeliminować nieistotne lub szkodliwe zmiany genów, które mogą gromadzić się w trakcie przebiegu losowej mutagenizacji [41]. Selekcja szczepów rodzicielskich jest skoncentrowana na docelowym fenotypie, takim jak produktywność metabolitów czy odporność na czynniki środowiska zewnętrznego. Często zdarza się, że szczepy o zwiększonej produktywności czy większej tolerancji na warunki środowiska, charakteryzują się osłabionym wzrostem [21]. Następnym etapem tasowania genomowego jest fuzja protoplastów, która umożliwia homologiczną rekombinację genomów [41]. Konwencjonalna fuzja protoplastów jest bardzo efektywną metodą, powodującą wysoką częstotliwość transferu genu i wydajność rekombinacji. Jednak odnosi się to tylko do sytuacji, gdy mamy dwoje rodziców, bo gdy fuzja odbywa się między wieloma rodzicami, jej wydajność jest niska. Problem ten rozwiązuje tasowanie genomowe zawierające metodę rekursywnej fuzji protoplastów pomiędzy wieloma różnymi szczepami rodzicielskimi w każdym pokoleniu, która zapewnia wymianę informacji w obrębie populacji. Już po dwóch

rundach fuzji można uzyskać szczep charakteryzujący się kilkoma ulepszonymi cechami fenotypowymi [21]. Wysoka wydajność rekurencyjnej fuzji protoplastów jest istotą sukcesu tasowania genomowego [57]. Ostatnim etapem tasowania genomowego jest wybór pożądanego fenotypu z wykorzystaniem metody skринingu. Jest to jeden z ważniejszych kroków całej procedury tasowania. Klasyczne metody skринingu bazują na charakterystyce fizykochemicznej i biochemicznej, a także na markerach genetycznych [11]. Coraz bardziej ekspansywny jest także rozwój wysokowydajnej procedury skринingu dla zwiększenia sukcesu uzyskania ulepszanego fenotypu. Decydujące zmiany w procedurze badań przesiewowych, a także technologie analityczne takie jak HPLC czy spektroskopia mas, dają szansę na przetestowanie obszernych bibliotek szczepów i sukces w izolacji połączonych fenotypów [21].

5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego

Doniesienia naukowe wskazują na poprawę cech fenotypowych szczepów drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae*, uzyskanych metodą tasowania genomowego. W swoich publikacjach wielu naukowców opisuje, że już po dwóch rundach tasowania udało im się pozyskać szczepy z pożądanymi właściwościami technologicznymi. Steensels i wsp. zoobserwowali, że metoda tasowania genomowego jest bardzo szybka, z uwagi na to, że dwie rundy pozwalają na uzyskanie efektu, którego osiągnięcie jeszcze kilka lat temu, wymagało co najmniej dwóch dekad badań i ogromnego nakładu finansowego [48]. Zheng i wsp. po dwóch rundach tasowania genomowego pozyskali szczep drożdży *S. cerevisiae* odznaczający się o 21,6% większą aktywnością fermentacyjną. Wykazali, że w jednym ulepszonym szczepie znajduje się kilka połączonych technologicznie cech, w tym odporność na obecność toksycznego metabolitu jakim jest kwas octowy [62]. Gong i wsp. po przeprowadzeniu tasowania genomowego, wyizolowali ponad 200 ulepszonych szczepów *S. cerevisiae*, które po wstępnej selekcji ograniczyli do 21 szczepów, produkujących większą ilość etanolu niż szczepy rodzicielskie, a spośród nich wybrali dwa wykazały termotolerancję w temp. 43°C [20]. Podobne prace badawcze prowadził Orosco i wsp. Autorzy Ci zastosowali tasowanie genomowe, aby zwiększyć odporności drożdży *S. cerevisiae* na podwyższoną temperaturę i zawartość etanolu. Po przeprowadzeniu kilku rund tasowania, uzyskali szczep, który w temp. 42°C i przy 18% stężeniu etanolu charakteryzował się o ponad 10% wyższą aktywnością fermentacyjną niż przemysłowy szczep wyjściowy [35]. Z kolei Shi i współ. wykonali trzy rundy tasowania i otrzymali bardzo cenny szczep drożdży *S. cerevisiae*, który potrafił w temp. 45°C i przy

20% stężeniu etanolu wyprodukować 10% (w/v) etanolu [45]. Jak dowodzą przytoczone powyżej wyniki badań, możliwe jest uzyskanie nowych hybryd drożdży gorzelniczych, posiadających istotne z punktu widzenia przemysłu gorzelniczego cechy. Jednakże do osiągnięcia pełnego sukcesu tej metody, konieczna jest weryfikacja cech użytkowych nowego, ulepszanego szczepu drożdży, wymagająca podjęcia badań nad stabilnością zarówno fenotypu jak i genotypu.

6. Podsumowanie

Tasowanie genomowe to jedna z nowych technik, która wykorzystuje już istniejącą różnorodność w znacznie większym stopniu. Coraz szersze są zatem perspektywy uzyskania połączonych szczepów drożdży gorzelniczych o zwiększonej odporności na stresy środowiskowe. Istotne jest także to, że większość metod ulepszania właściwości szczepu nie wyklucza się wzajemnie, lecz można je łączyć, żeby stworzyć jeszcze większe zmienności, a także zminimalizować wady poszczególnych technik. Można to zaobserwować choćby przy połączeniu losowej mutagenizacji z wielokrotnymi rundami tasowania genomowego, co jest bardzo przyszłościowym rozwiązaniem, w odniesieniu do rekombinacji zarówno oczekiwanych mutacji, jak i do zlikwidowania szkodliwych mutacji. Tasowanie genomowe to technika szybka, wygodna i ma ogromny potencjał pozyskiwania połączonych cech fenotypowych. Stąd też, metoda ta znajduje coraz to szersze zastosowanie w innowacyjnych badaniach nad cechami technologicznymi drożdży *S. cerevisiae* stosowanych w produkcji bioetanolu.

Piśmiennictwo

1. Adrio J.L., Demain A.L.: Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 187–214 (2006)
2. Babik W.: Ewolucja genomów i powstawanie nowych genów. *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*, **58**, 385–393 (2009)
3. Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young A.: Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* **26**, 89–105 (2008)
4. Bajwa P.K., Pinel D., Martin V.J.J., Trevors J.T., Lee H.: Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *J. Microbiol. Methods*. **81**, 179–186 (2010)
5. Bekker V., Dodd A., Brady D., Rumbold K.: Tools for metabolic engineering in *Streptomyces*. *Bioengineered*. **5**, 293–299 (2014)
6. Białas W., Wojciechowska D., Szymanowska D., Grajek W.: Optymalizacja procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi metodą powierzchni odpowiedzi. *Biotechnologia*, **4**, 183–199 (2009)
7. Biot-Pelletier D., Martin V.J.J.: Evolutionary engineering by genome shuffling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3877–3887 (2014)

8. Bonin S.: Tradycyjne metody modyfikacji drożdży (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 282–301
9. Brown T.A.: Genomy. PWN Wyd. Naukowe, Warszawa, 2001, s. 472
10. Chmiel A.: Biotechnologia podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. Naukowe PWN (wyd. 2), Warszawa, 1994, s. 364
11. Choudhary J., Singh S., Nain L.: Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Biotechnol.* **21**, 82–92 (2016)
12. Costa D.A., de Souza C.J.A., Costa P.S., Rodrigues M.Q.R.B., dos Santos A.F., Lopes M.R., Genier H.L.A., Silveira W.B., Fietto L.G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3829–3840 (2014)
13. Demain i Báez-Vásquez Demain A.L., Báez-Vásquez M.A.: Biofuels of the Present and the Future (w) New and Future Developments in Catalysis: Catalytic Biomass Conversion, red. S.L. Suib, Elsevier, 2013, s. 325–370
14. Edgardo A., Parra C., Rodriguez M., Jaime B.: Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **43**, 120–123 (2008)
15. Engel S.R., Cherry J.M. wsp.: The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3-Genes Genom. Genet.* **4**, 389–398 (2014)
16. Evans G.G., Furlong J.: Environmental Biotechnology: Theory and Application. John Wiley & Sons (wyd. 2), 2011, s. 11–48
17. Fernandes i Murray Fernandes S., Murray P.: Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation. *Bioeng Bugs.* **1**, 424–428 (2010)
18. Fiedurek J.: Biologiczne podstawy procesów mikrobiologicznych (w) Podstawy biotechnologii przemysłowej, red. W. Bednarski, J. Fiedurek, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 23007, s. 57–85
19. Goffeau A., Oliver S.G. i wsp.: Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563–567 (1996)
20. Gong G., Ma L., Chen X.: Isolation and improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for producing the distilled liquor. *J. Chem. Pharm. Res.* **6**, 283–288 (2014)
21. Gong J., Zheng H., Wu Z., Chen T., Zhao X.: Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnol. Adv.* **27**, 996–1005 (2009)
22. Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, **3**, 46–63 (2008)
23. Henderson C.M., Block D.E.: Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2966–2972 (2014)
24. Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J.: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 185–202 (2006)
25. Kroumov A.D., Modenes A.N., de Araujo Tait M.C.: Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochem. Eng. Journal*. **28**, 243–255 (2006)
26. Kumari R., Pramanik K.: Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *Biosci. Bioeng.* **114**, 622–629 (2012)
27. Kunicka A., Rajkowska K.: Charakterystyka mikroorganizmów. Drożdże (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania (tom I), red. Z. Libudisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
28. Ledakowicz S.: Od inżynierii metabolicznej przez biologię systemów do inżynierii biologicznej. *Inż. Ap. Chem.* **48**, 17–20 (2009)
29. Levin D.E.: Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. **189**, 1145–1175 (2011)
30. Lipińska E. Drożdże gorzelnicze i biosynteza etanolu (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 155–166
31. Liu Z.-H., Qin L., Zhu J.-Q., Li B.-Z. and Yuan Y.-J.: Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnol. Biofuels.* **7**, 167 (2014)
32. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebrat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **3**, 7–21 (2005)
33. Nicholl Nicholl D.S.T.: An introduction to genetic engineering, Cambridge University Press (wyd. 3), s. 327 (2008)
34. Orlean P.: Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Wall Genetics*. **192**, 775–818 (2012)
35. Oroscio F.L., Estrada S.M., Simbahan J.F., Alcantara V.A., Pajares I.G.: Genome shuffling for improved thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* 2013. *Philippine Science Letters*, **10**, 22–28 (2017)
36. Parekh i in. Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J.: Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287–301 (2000)
37. Pereira F.B., Romania A., Ruiz H.A., Teixeira J.A., Domingues L.: Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* **161**, 192–199 (2014)
38. Petri R., Schmidt-Dannert C.: Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. *Curr. Opinion Biotechnol.* **15**, 298–304 (2004)
39. Podgórska I., Solarz E.: Wykorzystanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zabezpieczaniu procesów fermentacyjnych. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, **3**, doi:10.15199/64.2016.3.6 (2016)
40. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttilä M.: Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS Yeast Res.* **3**, 185–189 (2003)
41. Rubin-Pitel S.B., Chao C.M.-H., Chen W., Zhao H.: Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development (w) Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, red. Yang S.-T., Elsevier, 2007, s. 49–72
42. Ruiz H.A., Silva D.P., Ruzene D.S., Lima L.F., Vicente A.A., Teixeira J.A.: Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. *Fuel*, **95**, 528–536 (2012)
43. Satyanarayana T., Kunze G.: Yeast biotechnology: diversity and applications, Springer Netherlands, 2009
44. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2003
45. Shi D.J., Wang C.L., Wang K.M.: Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 139–47 (2009)
46. Snoek T., Picca Nicolino M., Van den Bremt S., Mertens S., Saels V., Verplaetse A., Steensels J., Verstrepen K.J.: Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels.* **26**, 8–32 (2015)
47. Spencer J., Phister T.G., Smart K.A., Greetham D.: Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC Research Notes*, **7**, 151 (2014)

48. Steenles J., Snoek T., Meersman E., Picca Nicolino M., Voordeckers K., Verstrepen K.J.: Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 47–995 (2014)
49. Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J.: *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, San Diego, Academic Press, 1998, s. 725
50. Strąk E., Balcerek M.: Wybrane technologie wykorzystywane w przemyśle gorzelniczym, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **14**, 33–44 (2015)
51. Sybirny i in. Sybirny W., Puchalski Cz., Sybirny A.: Metaboliczna inżynieria drobnoustrojów do konstruowania wydajnych producentów bioetanolu z lignocelulozy. *Biotechnologia*, **4**, 38–54 (2007)
52. Świątek M., Lewandowska M., Bednarski W.: Doskonalenie procesów biotechnologicznych stosowanych w produkcji etanolu II generacji z surowców lignocelulozowych. *Postępy Nauk Rolniczych*, **1**, 121–131 (2011)
53. Tao i in. Tao X., Zheng D., Liu T., Wang P., Zhao W., Zhu M., Jiang X., Zhao Y., Wu X.: A Novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. *Plos One*, **7**, 1–10 (2012)
54. Walczak P., Kunicka A., Kręgiel D., Drewicz E.: Ulepszanie i przechowywanie mikroorganizmów (w) *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*, red. Z. Libudysz, K. Kowal, Z. Żakowska (tom I), Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
55. Wallace V.: Improving stress tolerance in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic biomass department of chemistry, Lund University, praca doktorska, 2014
56. Wallace-Salinas V., Gorwa-Grauslund M.F.: Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 151 (2013)
57. Wang M., Zhang W., Xu W., Shen Y., Du L.: Optimization of genome shuffling for high-yield production of the antitumor deacetylmycoepoxydiene in an endophytic fungus of mangrove plants. *Microbiol. Biotechnol. Appl.* 1–8 (2016)
58. Węgleński P., Golik P.: Inżyniera genetyczna (w) *Genetyka molekularna*, red. P. Węgleński. Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2008, s. 109–134
59. Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A.: Novel strategy for yeast construction using delta-integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1491–1498 (2010)
60. Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino Ch. Fukuda H., Kondo A.: Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol. Biofuels*, **4**, doi: 10.1186/1754-6834-4-8 (2011)
61. Zhang Y.X., Perry K. Vinci V.A., Powell K., Stemmer W.P.C., del Cardayre S.B.: Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, **415**, 644–646 (2002)
62. Zheng D.Q., Wu X.Ch., Wang P-M., Chi X-Q., Tao X-L., Li P. Jiang X-H., Zhao Y-H.: Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 415–422 (2011)