

DROZDZE TRANSGENICZNE W BROWARNICTWIE

Wrowadzenie

Wśród wielu etapów produkcji piwa, proces pierwotnej i wtórnej fermentacji stwarza ogromne możliwości optymalizacji całej technologii. Za oba etapy w dużym stopniu odpowiedzialne są drożdże, które jak dotąd pozostają pod wpływem wielu formalnych ograniczeń, a których genetyczne modyfikacje mogą uczynić technologię browarniczą jako jedną z bardziej nowoczesnych w biotechnologii żywności.

Kierunki konstrukcji transgenicznych drożdży dla browarnictwa

W związku z ogromną rolą drożdży w kształtowaniu cech organoleptycznych piwa biotechnologowie próbują korzystać z pewnych technik inżynierii genetycznej w celu konstrukcji odpowiednich szczepów drożdży transgenicznych:

- Produkujących minimalne ilości kwasów α -acetohydroksylowych, tj. prekursorów syntezy waliny, isoleucyny oraz diacetylu;
- Do konstrukcji szczepów zawierających wszczepiony gen odpowiedzialny za syntezę enzymu dekarboksylazy kwasu α -acetomlekowego (α -ALDC), która bezpośrednio rozkłada kwas α -acetomlekowy do acetoiny;
- Do konstrukcji szczepów drożdży browarniczych *Saccharomyces* sp. zawierających geny amyloolityczne STA1/STA2, z *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* lub pleśni *Aspergillus niger/awamori*, kodujących zewnątrzkomórkową glukoamylazę. Geny te wchodzi w skład utworzonego wektora: 1). ekspresyjnego-replikatywnego, pozostającego pod kontrolą promotora ADH1, bądź 2). wektora integracyjnego z markerem miedziowym, CUP1. Ekspresja transformowanego rekombinacyjnego DNA (rDNA) przejawia się obniżeniem zawartości węglowodanów w piwie, co podwyższa tym samym wydajność fermentacji alkoholowej i obniża kaloryczność napoju;
- Do konstrukcji szczepów drożdży browarniczych *Saccharomyces cerevisiae* z genem β -glukanazy (pochodzenia pleśniowego, np. *Trichoderma resei*), zawartym w wektorze replikatywnym pod kontrolą promotora PGK (kinazy fosfoglicerynowej);
- Do konstrukcji szczepów drożdży browarniczych zawierających zespół genów (FLO1, FLO5, FLO8, TUP1), odpowiedzialnych za syntezę białek nielektynowych, powodujących super flokulację. Jest to szczególnie ważne dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które jako mikroorganizmy górnej fermentacji mogłyby naturalnie sedymentować i być łatwo użyte do immobilizacji podczas fermentacji oraz dojrzewania piwa;
- Do częściowej mutacji drożdży w genach MET10 i MET2, kodujących, odpowiednio, reduktazę siarczynową oraz transferazę acetylohomoseryny, co w konsekwencji powoduje, np. akumulację SO₂ (siarczynów jako antyoksydantów) w piwie (Rys. 1), stabilizując tym samym jego zapach w wyniku tworzenia trwałych połączeń z aldehydami;

Rys. 1. Przemiana siarczanów w siarczyny.

- Do amplifikacji wielu kopii genów ILV5 w oryginalnych drożdżach browarniczych, odpowiedzialnych za syntezę enzymu reduktoizomerazy, błyskawicznie rozkładającej kwas α -acetomlekowy jako prekursor diacetylu (Rys. 2).

Rys. 2. System przemian enzymatycznych w cyklu ILV.

Podczas fermentacji pierwotnej drożdże browarnicze produkują w mitochondriach cały szereg endokomórkowych kwasów α -acteo hydroksylo wych, w tym kwas α -acetomlekowy i kwas α -acteo hydroksymasłowy, które są prekursorami wewnątrzmitochondrialnej biosyntezy waliny oraz izoleucyny. Ogromna część kwasów α -acteo hydroksylo wych jest wykorzystana do syntezy wyżej wspomnianych aminokwasów, jednakże pewna ich partia, zależnie od typu drożdży, po dyfuzji z komórki do cytoplazmy, a następnie do piwa, podlega spontanicznej, nieenzymatycznej, oksydacyjnej dekarboksylacji do odpowiednich lotnych ketonów, jak diacetyl oraz 2,3-pentanedion. Diacetyl jest jednym z najczęstszych, niekorzystnych, a stąd niepożądanych związków zapachowych piwa.

W następnym, wtórnym etapie fermentacji, piwo podlega dojrzewaniu, tzn. praktycznie obniżeniu stężenia diacetylu, bądź jego eliminacji. Podczas procesu dojrzewania diacetyl dyfunduje z powrotem do cytoplazmy komórki drożdżowej, gdzie podlega redukcji do acetoiny przy udziale enzymu reduktazy diacetylowej. Technologowie regulują tę konwersję poprzez wysokość temperatury lub długość dojrzewania brzezki, tak by otrzymać piwo o prawidłowym smaku i zapachu.

Optymalizacja technologii browarnictwa a drożdże transgeniczne

W celu optymalizacji produkcji piwa proponowane są różne strategie. Jedna z nich dotyczy prac genetycznych, zmierzających do obniżenia przez drożdże produkcji lotnych niekorzystnych ketonów. Strategia ta opiera się głównie na:

- Konstrukcji nowych transgenicznych drożdży przy udziale różnego typu sztucznych wektorów ekspresyjnych, jak wektorów integracyjnych, replikatywnych, episomalnych, sztucznych chromosomów (tzw. YAC-system), które stanowią tzw. kasety ekspresyjne (expression cassettes) transformowane do wnętrza konstruowanej komórki;
- Amplifikacji wielu kopii genów ILV5 odpowiedzialnych za tworzenie reduktazy izomerycznej, rozkładającej kwasu α -acteo hydroksylo we w cyklu biosyntezy izoleucyny-waliny, co zapobiega akumulacji kwasów acteo hydroksylo wych o 50-60% i ewentualnemu ich wypływowi z komórki.

Techniki konstrukcji drożdży w procesie rekombinacji DNA *in vitro*

Proces rekombinacji DNA *in vitro* obejmuje podstawowe techniki wyodrębniania i zmiany cząsteczki DNA, tj. łączenia natywnych fragmentów DNA ze skonstruowanymi sztucznie fragmentami DNA (wektorami, lub z tzw. kasetami ekspresyjnymi), a następnie amplifikacji (powielania) pożądaných genów w transformowanej komórce. Przenoszenie wektora (z fragmentem genów) z jednego organizmu do drugiego i jego powielanie w komórce gospodarza nazwano klonowaniem.

Wektory, zarówno naturalne jak i sztuczne, są to cząsteczki DNA mogące być nośnikami pożądaných sekwencji genetycznych, które posiadają zdolność do automatycznej replikacji w danym typie komórek. Wektor zapewnia powielenie wprowadzonego fragmentu DNA, czyli klonowanie, a czasami także wydają syntezę kodowanego przez gen białka

(ekspresję), jak to ma miejsce, np. w sztucznych wektorach ekspresyjnych. Istnieją różne typy sztucznych wektorów, a dobranie odpowiedniego zależy m.in. od tego w jakich komórkach zamierzamy klonować gen.

Pierwszym etapem w rekombinacji *in vitro* jest wydzielanie odpowiedniego DNA, następnie jego oczyszczanie i fragmentowanie do poszczególnych genów przy pomocy specyficznych enzymów „tnących”, tzw. restrykcyjnych (Rys. 3).

Rys. 3. Działanie enzymów restrykcyjnych i ligacja (sklejanie DNA).

Drugim etapem w rekombinacji *in vitro* jest łączenie odpowiednich fragmentów DNA z cząsteczkami wektorowymi z udziałem enzymu ligazy DNA (rys. 3), wytwarzającej wiązania fosfodiesterowe, przy czym wektory jako niewielkie fragmenty DNA, mają zdolność do samodzielnej replikacji w komórce. Tak zrekombinowany fragment DNA z wektorem, po wprowadzeniu do komórki biorcy za pomocą techniki transformacji lub transfekcji podlega powielaniu, tj. klonowaniu.

Najważniejszym elementem warunkującym specyficzność wektora są sekwencje odpowiedzialne za inicjację replikacji tzw. sekwencje *ori*. Najprostsze wektory posiadają wyłącznie jedno, unikalne miejsce restrykcyjne, w które można wprowadzić obcy DNA. Obecnie najczęściej jest to tzw. polilinker, tj. syntetyczny odcinek DNA, w którym znajduje się zwykle kilkanaście miejsc rozpoznawanych przez różne restryktazy (specyficzne enzymy, przecinające DNA). Pozwala to na swobodniejszy dobór odpowiedniego do klonowania enzymu.

Sztuczne wektory posiadają zazwyczaj geny markerowe, czyli geny kodujące białka odpowiedzialne za łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe. Wektor musi być tak skonstruowany, aby istniała możliwość selekcji tych komórek, do których wniknął. Najczęstszymi markerami w ekspresyjnych wektorach są geny oporności na antybiotyk Geneticin (G418), ampicilinę (Ap), tetracyklinę (Tr) czy geny CUP1 odpowiedzialne za oporność na miedź (drożdże browarnicze są wrażliwe na miedź).

Znajomość sekwencji wielu genów umożliwia przeprowadzanie różnych manipulacji genetycznych nie tylko w naturalnych genach, wyizolowanych z mikroorganizmów, lecz również w DNA, które może być zsyntetyzowane chemicznie i enzymatycznie w automatycznie sterowanym procesie (technika PCR, tj. *Polymerase Chain Reaction*). Istnieją bowiem urządzenia do otrzymywania oligonukleotydów (krótkich odcinków DNA) o określonej sekwencji i długości (najczęściej 20-40 nukleotydów), z których za pomocą ligazy DNA konstruuje się dłuższe fragmenty DNA lub kompletne geny. Komplementarny DNA (cDNA) podczas enzymatycznej syntezy zawiera jedynie sekwencje kodujące. Matrycę stanowi najczęściej mRNA, które jest transkrybowane na DNA za pomocą polimeryzy DNA, zależnej od RNA, tzw. odwrotnej transkryptazy.

Do najważniejszych „narzędzi” procesu rekombinacji w inżynierii genetycznej należą:

- *Enzymy restrykcyjne (tnące)*, które są endonukleazami, wyizolowanymi z bakterii i sinic, stanowiącymi naturalny czynnik ochronny przed inwazją obcego DNA, np. fagowego. Znanych jest kilka tysięcy restryktaz, należących do różnych klas, jednakże największe praktyczne znaczenie mają specyficzne enzymy restrykcyjne klasy II, rozpoznające i przecinające ściśle określone sekwencje nukleotydowe (4-8 nukleotydów) w cząsteczce obcego DNA. Nazwy enzymów restrykcyjnych są przedstawiane za pomocą symboli, np. *EcoRI*, co oznacza enzym pochodzący ze szczepu R bakterii *Escherichia coli*. A oto symbole innych enzymów: *PstI*, czy, *HindIII* itp.;
- *Enzym odwrotna transkryptaza*, tj. polimeraza DNA zależna od RNA, syntetyzująca komplementarny DNA (cDNA) na matrycy mRNA (np. z retrowirusów).

Transkryptaza jest wykorzystywana przy sporządzaniu banków cDNA i przy określaniu sekwencji nukleotydów w RNA;

- *Enzymy ligazy*, łączące tzw. lepkie końce fragmentów DNA i rekonstruujące wiązania (kowalencyjne), które uległy hydrolizie w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi. Warunkiem działania ligaz DNA jest obecność grupy fosforanowej na końcu 5' łańcucha DNA;
- *Enzymy - polimerazy RNA* fagów T7 i SP6, służące do otrzymywania *in vitro* transkryptu RNA zdefiniowanego za pomocą matrycy DNA;
- *Enzymy – specyficzne metylazy*, które modyfikują sekwencje nukleotydów rozpoznawane przez nukleazy restrykcyjne *in vitro*; są one stosowane do blokowania miejsc restrykcyjnych we fragmentach DNA;
 - *Wektory* jako przenośniki genów (w tym sztucznie skonstruowane, zwane kasetami ekspresyjnymi), będące większymi cząsteczkami najczęściej kolistego DNA. Wektory są odpowiednio dobrane do gospodarza, tj. zapewniają integrację z genomem biorcy oraz możliwość powielania się w odpowiedniej liczbie kopii. W rekombinacji genetycznej *in vitro* przenoszenie genów do wybranej komórki odbywa się za pośrednictwem wektora, którym transformuje się komórki biorcy. Najczęściej stosowanymi wektorami do komórek eukariotycznych, np. do drożdży, są wektory drożdżowe integracyjne (zawierające markery selekcyjne, np. LEU2, HIS3, URA3), bądź autonomiczne replikony jako wektory, zawierające naturalny plazmid drożdżowy 2 μ oraz fragment DNA, tzw. ARS (ang. autonomously replicating sequences). Większość tych wektorów zawiera sekwencje pochodzące z plazmidów bakteryjnych (np. pBR322 z *E. coli* lub pMA3-PGK) oraz sekwencje drożdżowe, jak np. wyżej wspomniany plazmid drożdżowy 2 μ . Są to wektory „wahadłowe” (ang. *shuttle vectors*), tzn. zrekombinowane geny można wprowadzić za pośrednictwem tych wektorów, zarówno do *Eucaryota* (np. do drożdży *S. cerevisiae* lub komórek zwierzęcych (*mammalian cells*), jak i do bakterii (*E. coli*).

Do praktyki browarniczej, w celu konstrukcji drożdży transgenicznych zastosowano następujące typy wektorów:

- 1) *Wektory integracyjne* (Rys. 4), które zawierają DNA genów rybosomalnych z drożdży jako homologiczne do określonego chromosomu, rekombinacyjne sekwencje (*EcoRI* fragment z częścią 5.8S i 25S rDNA genów bez sekwencji ARS), wzmacniające efekt transformacji. Do tego dołączona jest sekwencja DNA bakteryjnego (z *Enterobacter aerogenes*), kodująca syntezę enzymu dekarboksylazy kwasu α -acetomlekowego (α -ALDC) oraz pewien fragment plazmidu bakteryjnego pBR322 z selekcyjnym markerem, np. z genami oporności na antybiotyk ampicylinę (Ap^r) czy tetracyklinę (Tr^r), ewentualnie z regionem kodującym HIS lub URA3, bądź z genami części operonu laktozy *lacZ* z *E. coli*. Tego typu wektory mogą integrować się z homologicznymi do nich odcinkami odpowiednich chromosomów, zapewniając dużą stabilność rekombinacji.

Rys. 4. Stabilny wektor integracyjny.

- 2) *Wektory replikatywne* (autonomously replicating plasmids) są konstruowane z fragmentu DNA plazmidu bakteryjnego pKB105 lub pKB106 z sekwencją genetyczną kwasu α -acetomlekowego (α -ALDC z *Enterobacter aerogenes* lub *Klebsiella terrigena*), z sekwencji markerowej, np. odporności na miedź lub HIS i URA3, oraz z partii drożdżowego DNA. Do tego dochodzi chromosomalny region (*ori*) odpowiedzialny za replikację. Przykładem wektorów replikatywnych,

skonstruowanych dla drożdży browarniczych mogą być 2 niżej przedstawione wektory (Rys. 5), jako kasety ekspresyjne (expression cassettes), będące pod kontrolą mocnych drożdżowych promotorów, np. ADH (z sekwencją izoenzymu dehydrogenazy alkoholowej), PGK (z sekwencją kinazy fosfoglicerynowej) oraz PHO5 (z sekwencją represyjnej kwaśnej fosfatazy). Np. wektory replikatywne (z genami URA3), które wprowadzono do drożdży auksotroficznych (*ura⁻*) zastosowano do wielokrotnej amplifikacji genów ILV.

Rys. 5. Dwa wektory replikatywne.

- 3) Wektory episomalne (Rys. 6), niosą informację genetyczną o rozkładzie kwasu α -acetomlekowego. Są to wektory skonstruowane na bazie pewnych sekwencji bakteryjnych i drożdżowych. Zawierają one geny enzymu dekarboksylazy kwasu α -acetomlekowego izolowane z bakterii *Enterobacter aerogenes*, geny selektywne (np. LEU2, lub URA3), jak również plazmid drożdżowy 2 μ .

Rys. 6. Wektor plazmidowy episomalny.

Techniki konstrukcji drożdży transgenicznych browarniczych

Techniki te prezentowane są przez następujące metody z zakresu inżynierii genetycznej oraz komórkowej i jak dotąd opierają się głównie na:

- *Transformacji* (bądź co-transformacji) chemicznej czy elektrotransformacji odpowiednich wektorów: integracyjnych, replikatywnych i episomalnych, będących tzw. kasetami ekspresyjnymi (expression cassettes) (Rys. 7).

Rys. 7. Przykłady drożdży browarniczych *Saccharomyces carlsbergensis* transformowanych dsRNA, tzw. VLPs, z cechą killerową: A – *rho⁺* oraz B – *rho⁻*.

- *Fuzji* chemicznej lub *elektrofuzji* (Rys. 8-10) kompetentnych protoplastów, bądź sferoplastów z odpowiednim zestawem cech genetycznych, których ekspresja wyrażać się będzie pożądanymi właściwościami technologicznymi, np. cechami amylopolitycznymi u drożdży browarniczych przemysłowych (Rys. 11) lub zdolnością do flokulacji.

Rys. 8. Proces dielektroforezy w elektrofuzji.

Rys. 9. Proces powstawania “mostków”.

Rys. 10. Proces “wypełniania” się “fuzanta”.

Rys. 11. Transgeniczne drożdże amylopolityczne.

- *Iniekcji (mikroiniekcji)* rekombinacyjnego materiału genetycznego (rDNA) bezpośrednio do komórki drożdżowej jako protoplastu lub sferoplastu.
- *Enukleacji* a następnie *elektrofuzji*. Technika ta może być szczególnie korzystna do drożdży przemysłowych (polyploidów, bądź aneuploidów lub *rho⁻*). Po usunięciu jądra z jednej macierzystej komórki (enukleacji, Rys. 12), zawierającej w cytoplazmie np. plazmidy replikatywne lub episomalne z genami dekarboksylazy kwasu α -acetomlekowego, a następnie elektrofuzji tzw. cytoplastu z następną, pożądaną

komórką (jako protoplast/sferoplast), posiadającą korzystne cechy jądrowe - otrzymuje się (po regeneracji) nowe transgeniczne drożdże z oczekiwanymi cechami cytoplazmatycznymi oraz jądrowymi.

Rys. 12. Drożdże browarnicze *Saccharomyces carlsbergensis* po enukleacji, tzw. cytoplasty.

Konkluzja

Zastosowanie drożdży transgenicznych z w/w zmianami w cyklu isoleucyny-waliny (ILV) powoduje szybkie obniżenie poziomu diacetylu w dojrzewającej brzeczce, pozbawiając piwo ujemnych cech smakowych, oczywiście bez innych niekorzystnych zmian w gotowym produkcie. Ponadto drożdże transgeniczne z wszczepionym zespołem genów amylolitycznych pozwalają na wydajniejszą fermentację, niższą kaloryczność piwa, a czynnik flokulacyjny powoduje efektywniejszą fermentację ze względu na możliwość immobilizacji drożdży.

Do ingerencji w genom drożdży browarniczych upoważniają nas pewne ich predyspozycje i niezaprzeczalne zalety. Drożdże bowiem jako model komórki gospodarzy posiadają struktury komórkowe typowe dla *Eucaryota*, tj. geny w nich klonowane mogą zawierać sekwencje intronowe, a proces obróbki mRNA jest zbliżony do tego, który występuje u wyższych eukariontów. Ponadto białka drożdży podlegają modyfikacjom post-translacyjnym. Wynika z tego, że klonowanie obcego, zrekombinowanego DNA (rDNA) w drożdżach browarniczych pozwala na tzw. ekspresję badanych genów w komórce pod postacią odpowiednio zmodyfikowanych białkowych produktów. Jest to proces bardzo złożony, zważywszy, że drożdże przemysłowe są z reguły polyploidami, bądź aneuploidami.

Niemniej przedstawione wyżej metody i techniki rekombinacji genetycznej dają w wielu przypadkach pozytywne rezultaty, a otrzymane drożdże transgeniczne, które przeszły atestację w skali pilotowej, można zastosować z pełnym sukcesem w technologii browarniczej. Pozostaje jedynie opracowanie legislacji tak otrzymanych krzyżówek genetycznych i aprobację technologów browarnictwa oraz konsumentów.

Adres do korespondencji: Anna.Salek@T-Online.de