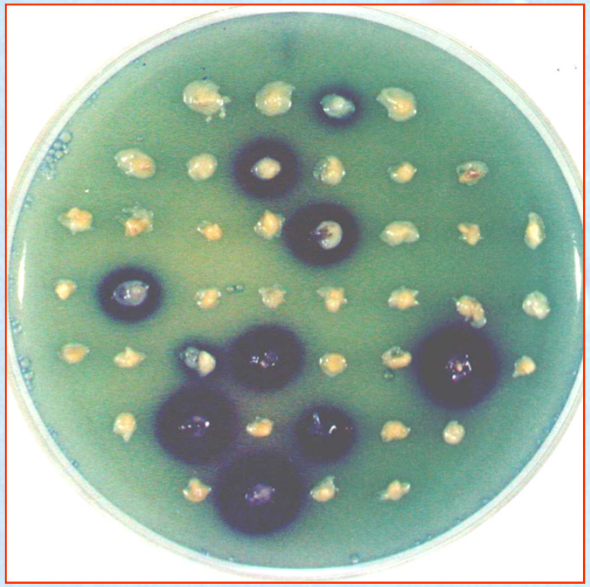
VII Szkoła Technologii Fermentacji

Łódź, 20-23.03.2002

Drożdże transgeniczne

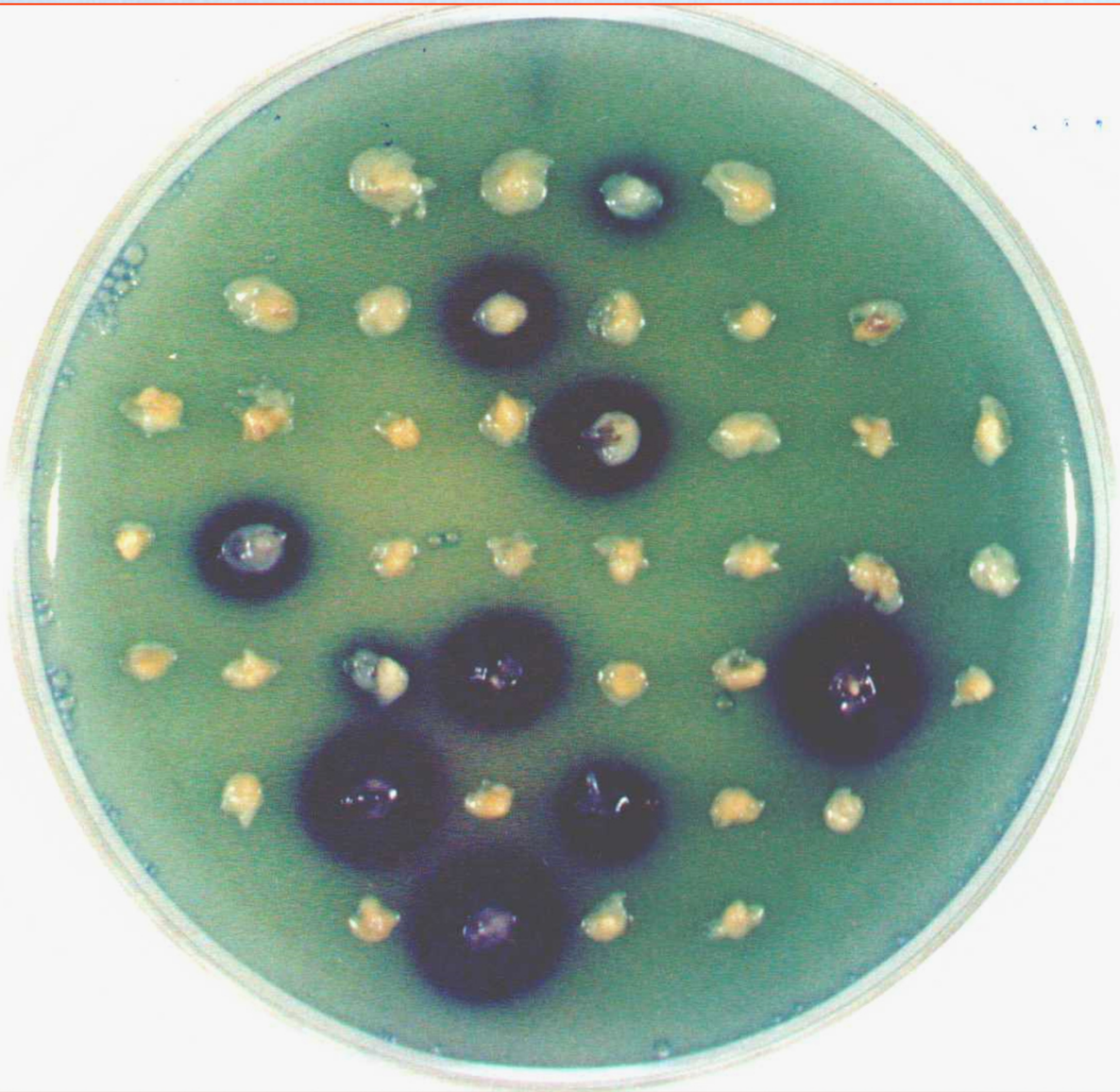
METODY rekombinacji genetycznej drożdży browarniczych

Drożdże Transgeniczne



Saccharomyces carlsbergensis

Nowe szczepy w browarnictwie

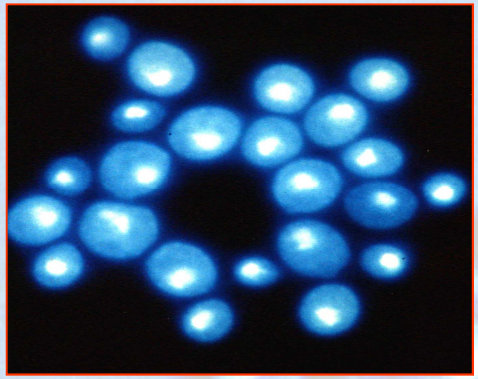


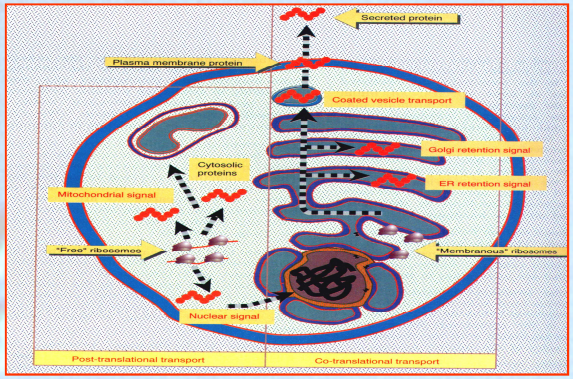
Drożdże transgeniczne *Saccharomyces carlsbergensis*

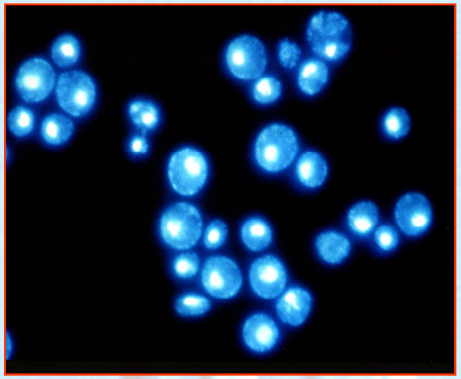
WPROWADZENIE

Wśród wielu etapów produkcji piwa, proces pierwotnej i wtórnej fermentacji stwarza ogromne możliwości optymalizacji całej technologii browarniczej.

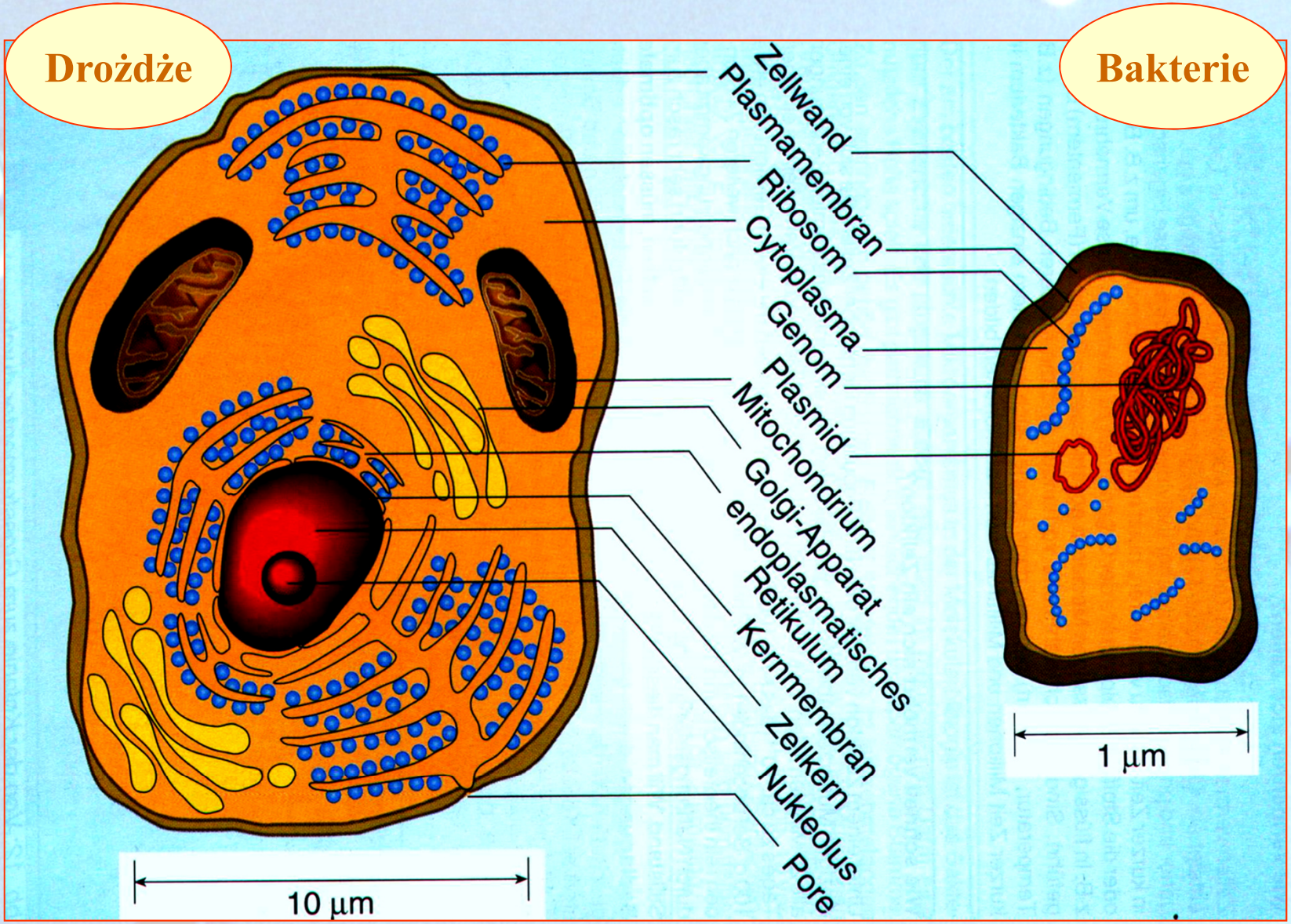
Za oba etapy w dużym stopniu odpowiedzialne są drożdże, których genetyczne modyfikacje mogą uczynić technologię browarniczą jako jedną z bardziej nowoczesnych w biotechnologii żywności







Drożdże
są najprostszymi
Eukariontami


Drożdże
Bakterie
Zellwand
Plasmamembran
Ribosom
Cytoplasma
Genom
Plasmid
Mitochondrium
Golgi-Apparat
endoplasmatisches
Retikulum
Kernmembran
Zellkern
Nukleolus
Pore
10 µm
1 µm

CEL

PRAC GENETYCZNYCH

W związku z ogromną rolą drożdży w kształtowaniu cech organoleptycznych piwa, współczesna biotechnologia próbuje korzystać z pewnych technik inżynierii genetycznej w celu konstrukcji odpowiednich szczepów, drożdży transgenicznych

1. Produkujących minimalne ilości kwasów α- acetohydroksylowych, tj. prekursorów syntezy waliny oraz izoleucyny,

2. Do konstrukcji szczepów zawierających wszczepiony gen enzymu dekarboksylazy α-acetomleczanu, który bezpośrednio rozkłada kwas α-acetomlekowy do acetoiny,

3. Do konstrukcji szczepów drożdży browarniczych *Saccharomyces carlsbergensis*, posiadających geny amylolityczne STA1/STA2 z *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* lub pleśni *Aspergillus niger/awamori*, zawartych w utworzonym wektorze ekspresyjnym lub replikatywnym, będących pod kontrolą promotora ADH1 z integracyjnym z markerem miedzi, CUP1

Transgeniczne drożdże browarnicze o cechach amylolitycznych

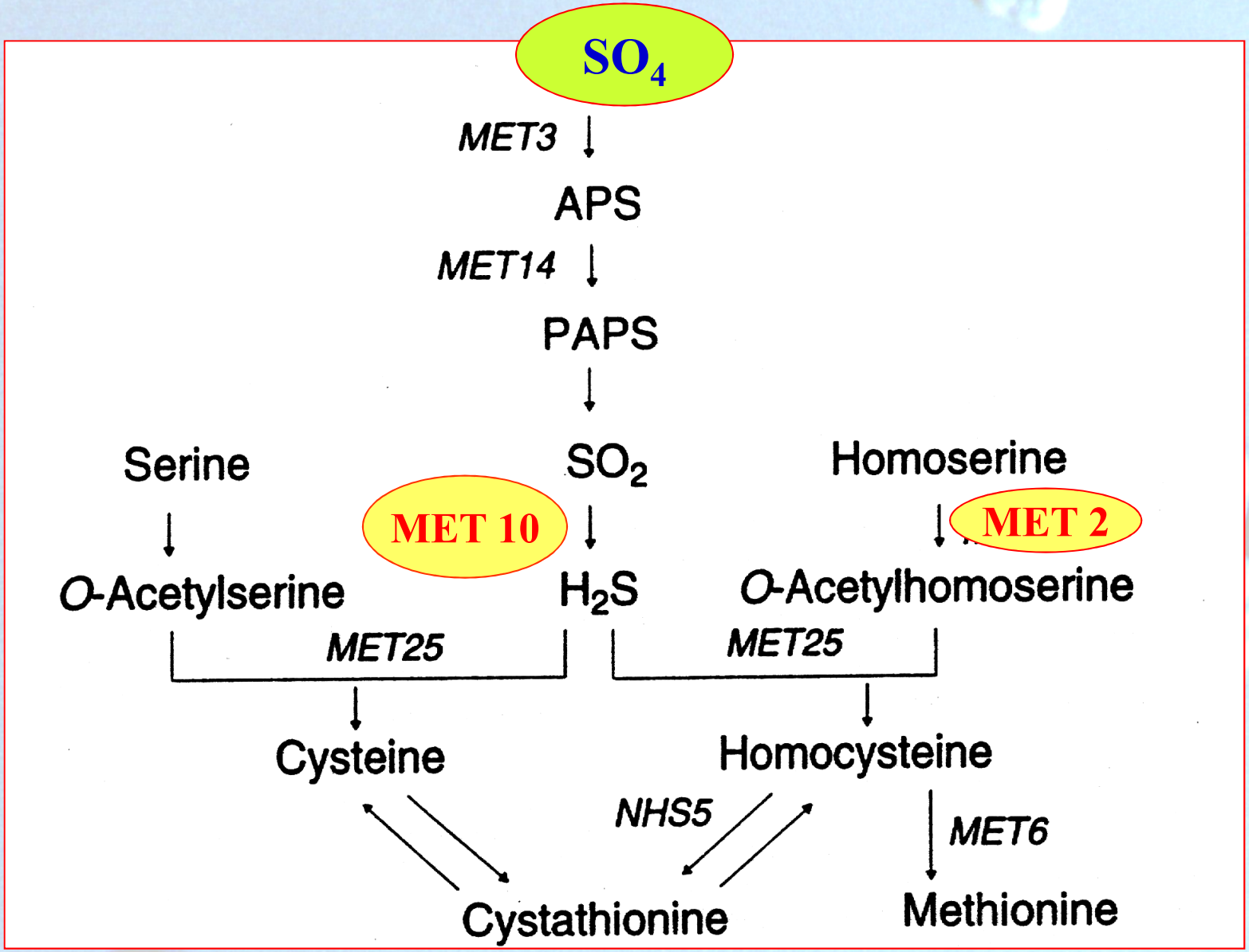
Ekspresja transformowanego rDNA,
z genami amyloglukozydazy,
przejawia się obniżeniem
zawartości węglowodanów w piwie,
co podwyższa tym samym wydajność
fermentacji alkoholowej
i obniża kaloryczność napoju

4. **Do konstrukcji szczepów drożdży browarniczych *Saccharomyces cerevisiae* z genem β-glukanazy (pochodzenia pleśniowego, np. *Trichoderma resei*), zawartym w wektorze replikatywnym, będącym pod kontrolą promotora PGK (kinazy fosfoglicerynowej)**

5. **Do konstrukcji szczepów drożdży browarniczych zawierających zespół genów odpowiedzialnych za syntezę białek nie-lektynowych, powodujących super-flokulację (FLO1, FLO5, FLO8, TUP1)**

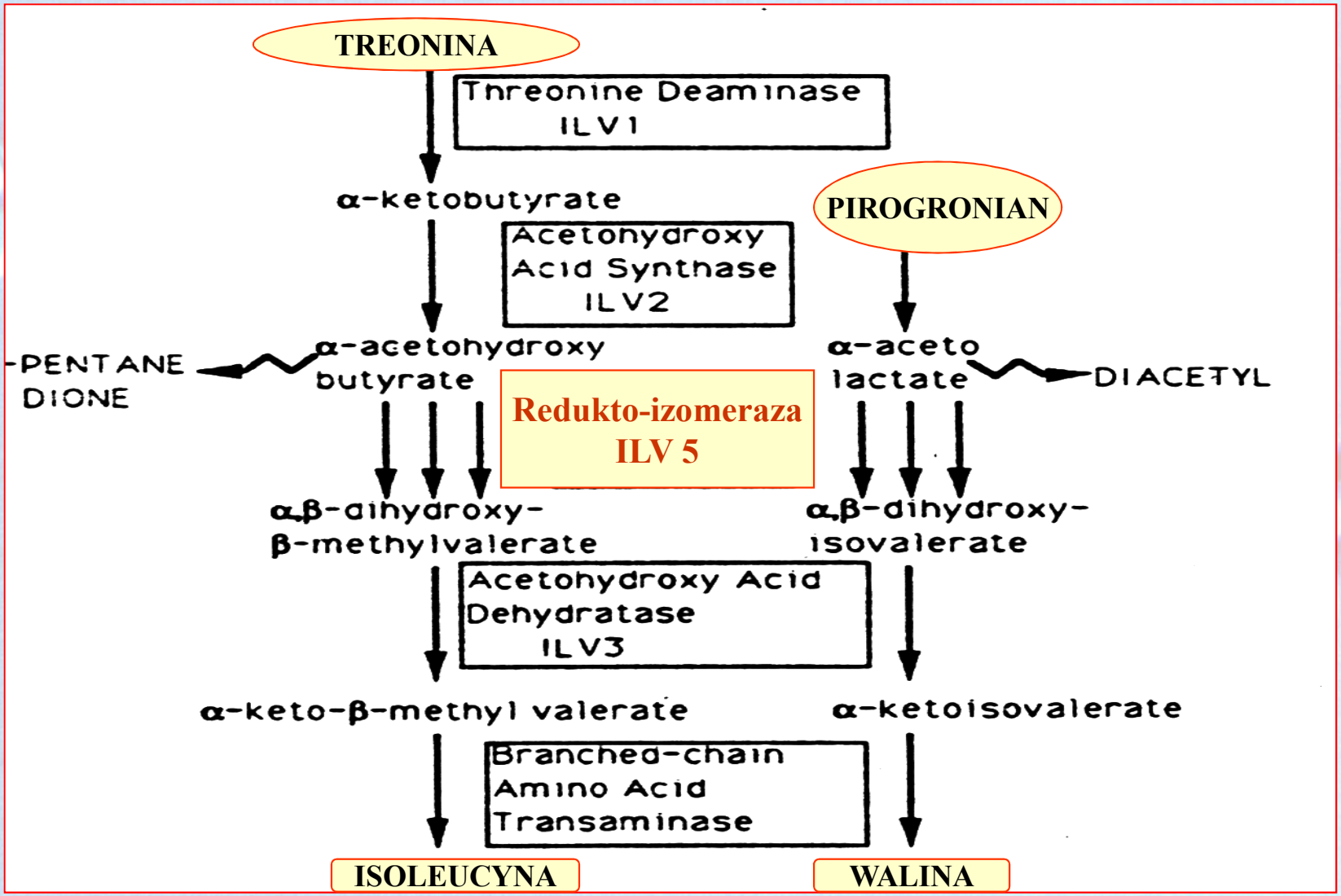
Jest to szczególnie ważne dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które jako mikroorganizmy górnej fermentacji mogłyby naturalnie sedymentować i być łatwo użyte do immobilizacji podczas fermentacji oraz dojrzewania piwa

6. **Do częściowej mutacji drożdży w genie MET10 i MET2, kodujących (odpowiednio) reduktazę siarczynową oraz transferazę acetylohomoseryny, co w rezultacie powoduje akumulację SO_2 (lub acetylohomoseryny), SO_2 jako antyoksydanta, stabilizującego zapach i tworzącego trwałe połączenia z aldehydami**



Mutacja w genie MET 10 powoduje nagromadzanie się SO_2, a w genie MET 2 - acetylohomoseryny

7. Do amplifikacji wielu kopii genów ILV5 w oryginalnych drożdżach browarniczych, odpowiedzialnych za syntezę enzymu redukto-izomerazy, błyskawicznie rozkładającej kwas α-acetomlekowego, który jak wiemy jest prekursorem diacetylu

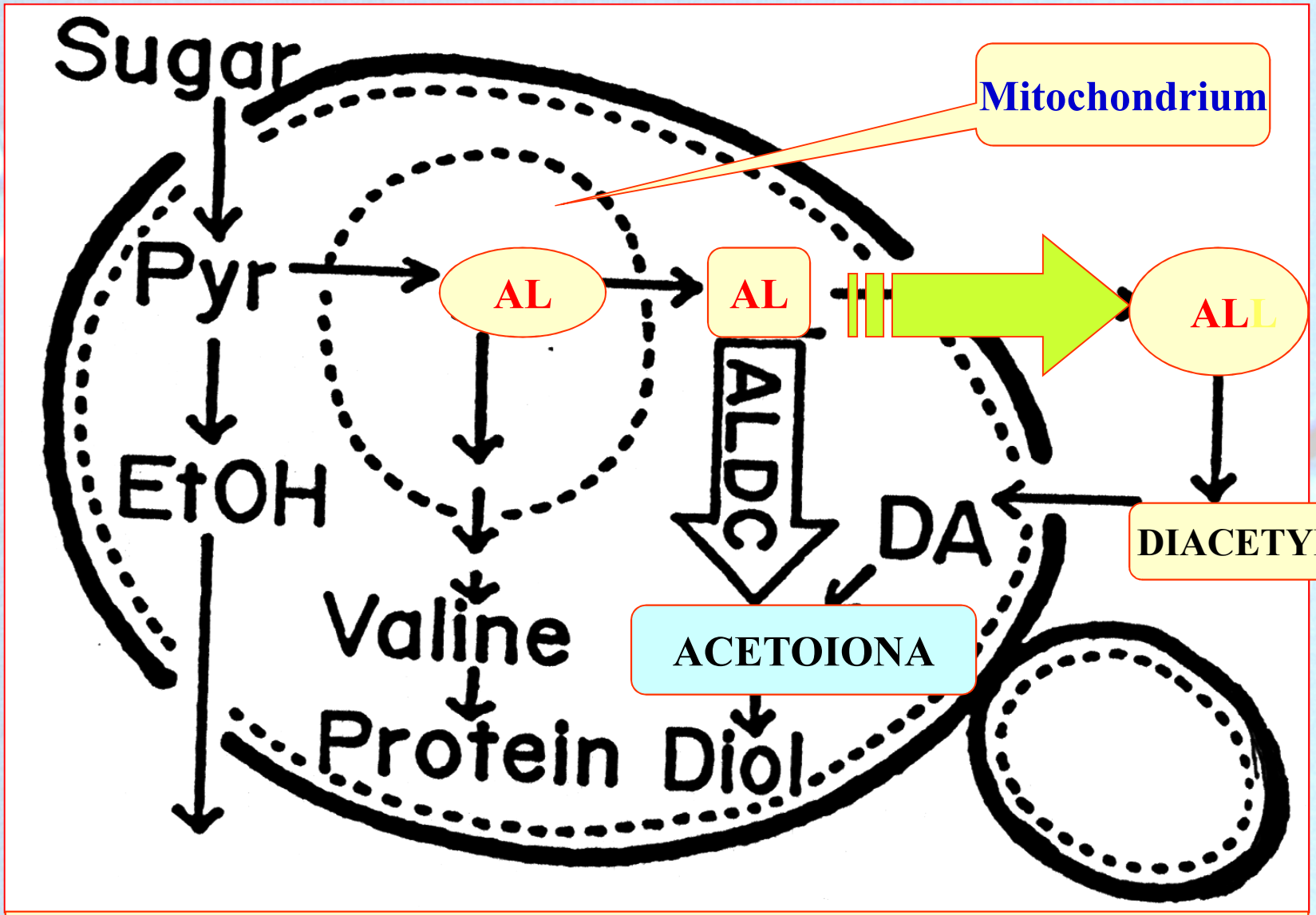


Schemat syntezy izoleucyny-waliny

Drożdże transgeniczne

OPTYMALIZACJA TECHNOLOGII

Podczas fermentacji pierwotnej drożdże browarnicze produkują w mitochondriach cały szereg endokomórkowych kwasów α-aceto-hydroksylowych które są prekursorami biosyntezy aminokwasu waliny oraz izoleucyny



Dyfuzja kwasu α-acetohymlekowego z komórki i do komórki drożdżowej

Ogromna część tych prekursorów jest wykorzystana do wyżej wspomnianej syntezy, jednakże pewna ich partia, zależnie od typu drożdży, po dyfuzji z komórki do cytoplazmy, a następnie do piwa, podlega spontanicznym przemianom

Do przemian tych zalicza sią nieenzymatyczną, oksydacyjną dekarboksylację kwasów α-acetohydroksylowych do odpowiednich lotnych ketonów, jak diacetyl oraz 2,3-pentanedion

Diacetyl jest jednym z najczęstszych, niekorzystnych, a stąd niepożadanych związków zapachowych piwa

W następnym, wtórnym etapie fermentacji, piwo podlega dojrzewaniu, tzn. praktycznie obniżeniu stężenia diacetylu, bądź jego całkowitej eliminacji. Podczas procesu dojrzewania diacetyl dyfunduje z powrotem do cytoplazmy komórki drożdżowej, gdzie podlega redukcji do acetoiny przy udziale enzymu reduktazy diacetylowej

W celu optymalizacji produkcji piwa proponowane są różne strategie, w tym jedna z nich dotyczy prac genetycznych, zmierzających do obniżenia przez drożdże transgeniczne obecności lotnych ketonów;

prace te opierając się głównie na:

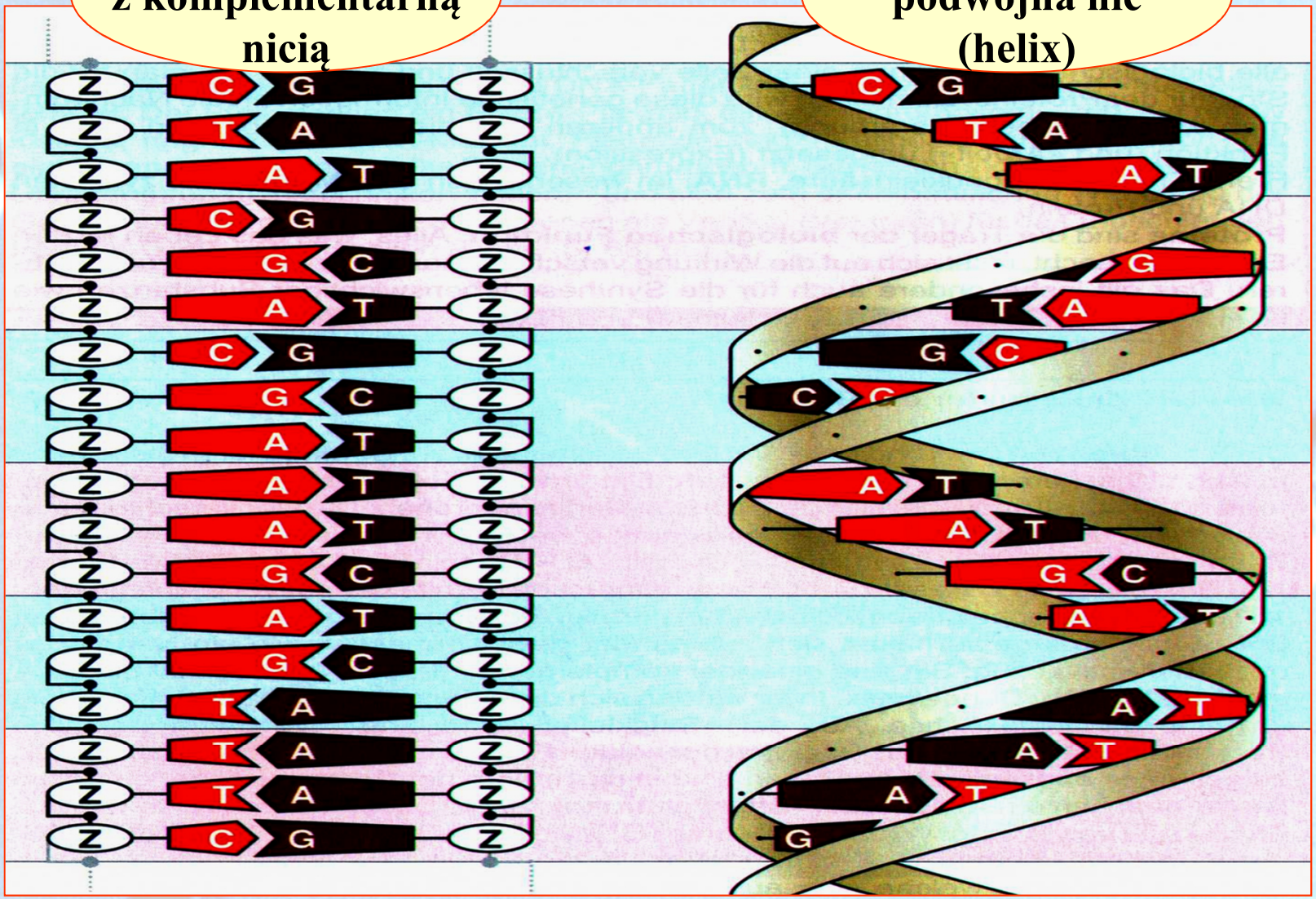
- **Konstrukcji transgenicznych drożdży przy udziale różnego typu wektorów ekspresyjnych: wektorów integracyjnych, replikatywnych, episomalnych, sztucznych chromosomów (YAC) stanowiących tzw. kasety ekspresyjne (expression cassettes), transformowalne do wnętrza konstruowanej komórki**

- **Amplifikacji genów ILV5 odpowiedzialnych za tworzenie reduktazy isomerycznej rozkładającej kwasy α-acetohydroksylowe w cyklu biosyntezy izoleucyny-waliny, co zapobiega akumulacji kwasów acetohydroksylowych o 50-60% i ew. ich wypływowi z komórki**

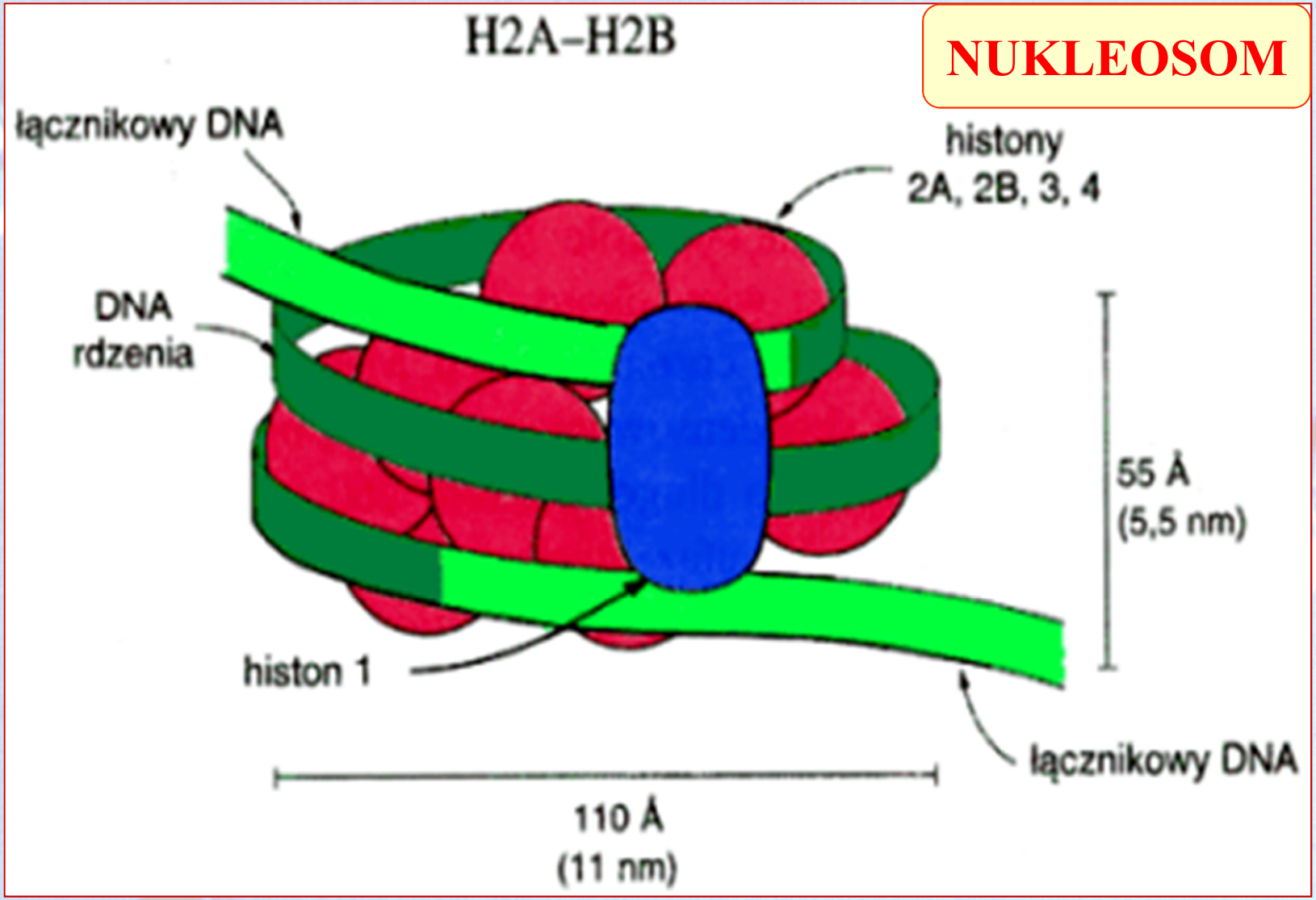
Techniki konstrukcji drożdży transgenicznych

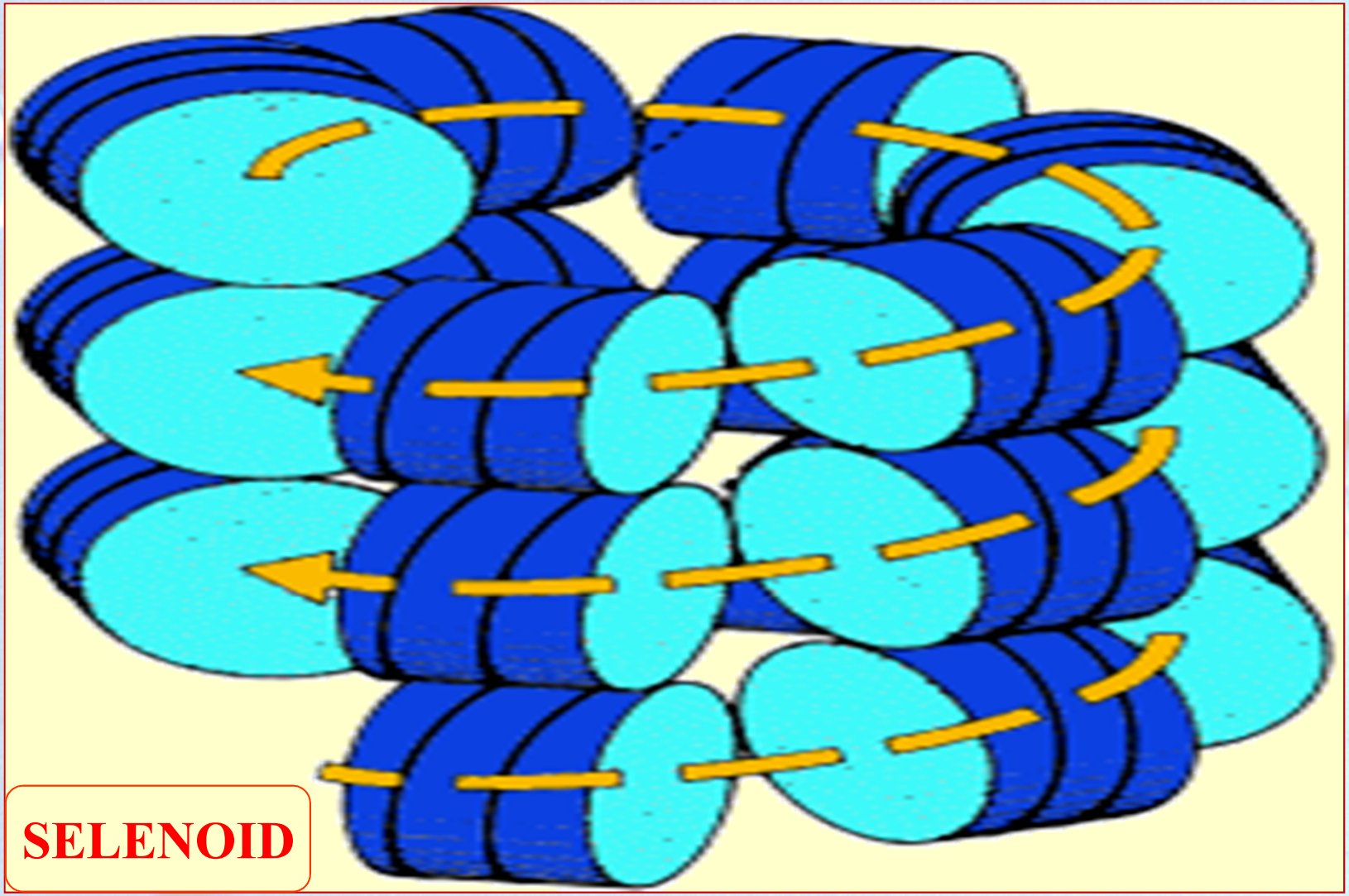
DNA
z komplementarną
nicią

DNA
podwójna nić
(helix)



NUKLEOSOM


H2A–H2B
łącznikowy DNA
histony
2A, 2B, 3, 4
DNA
rdzenia
55 Å
(5,5 nm)
histon 1
łącznikowy DNA
110 Å
(11 nm)

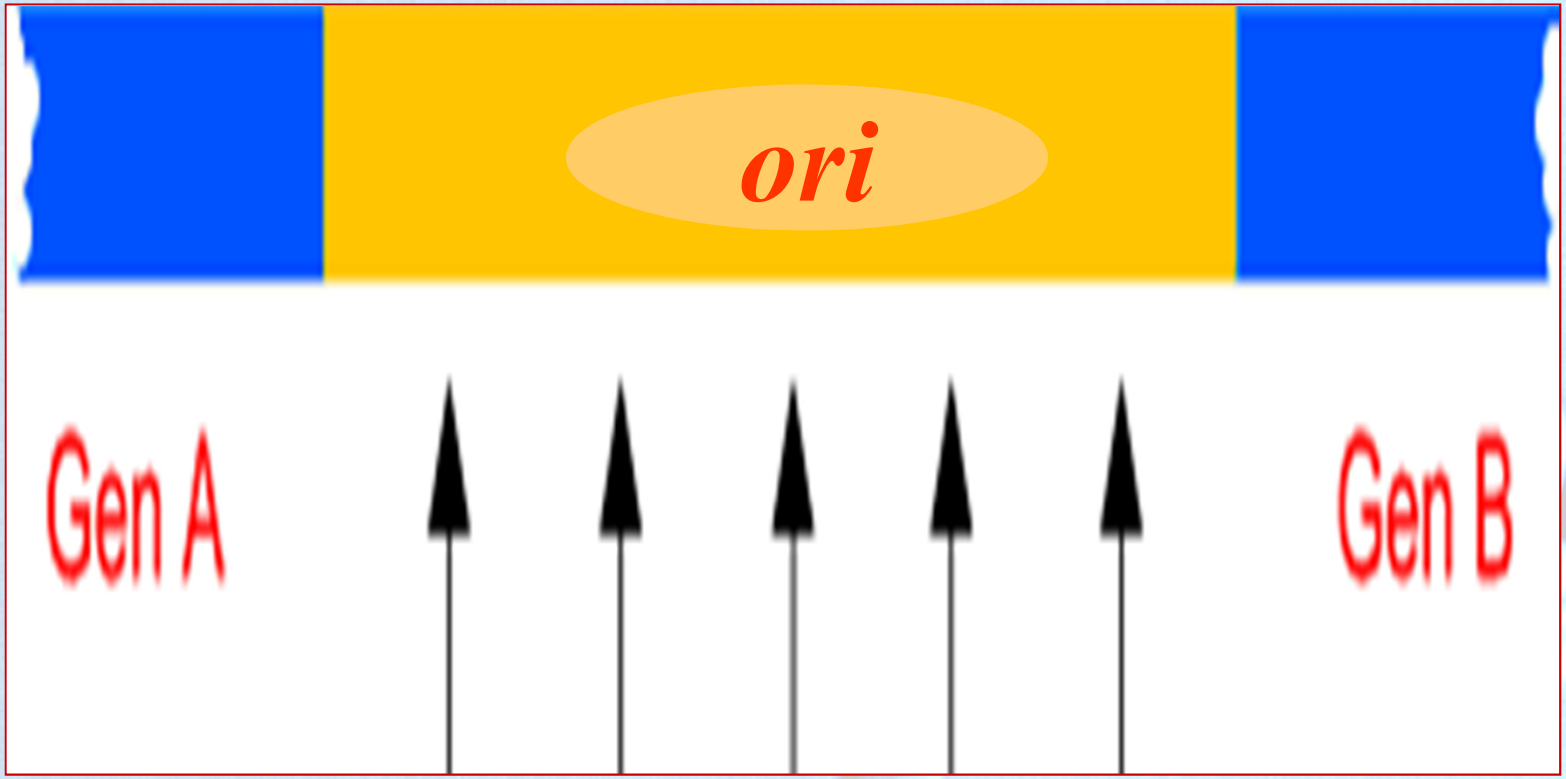

SELENOID

WEKTORY

Wektor jest to sztucznie zrekombinowane DNA, tzw. rDNA, z genem lub zespołem genów, kodujących pożądane cechy technologiczne

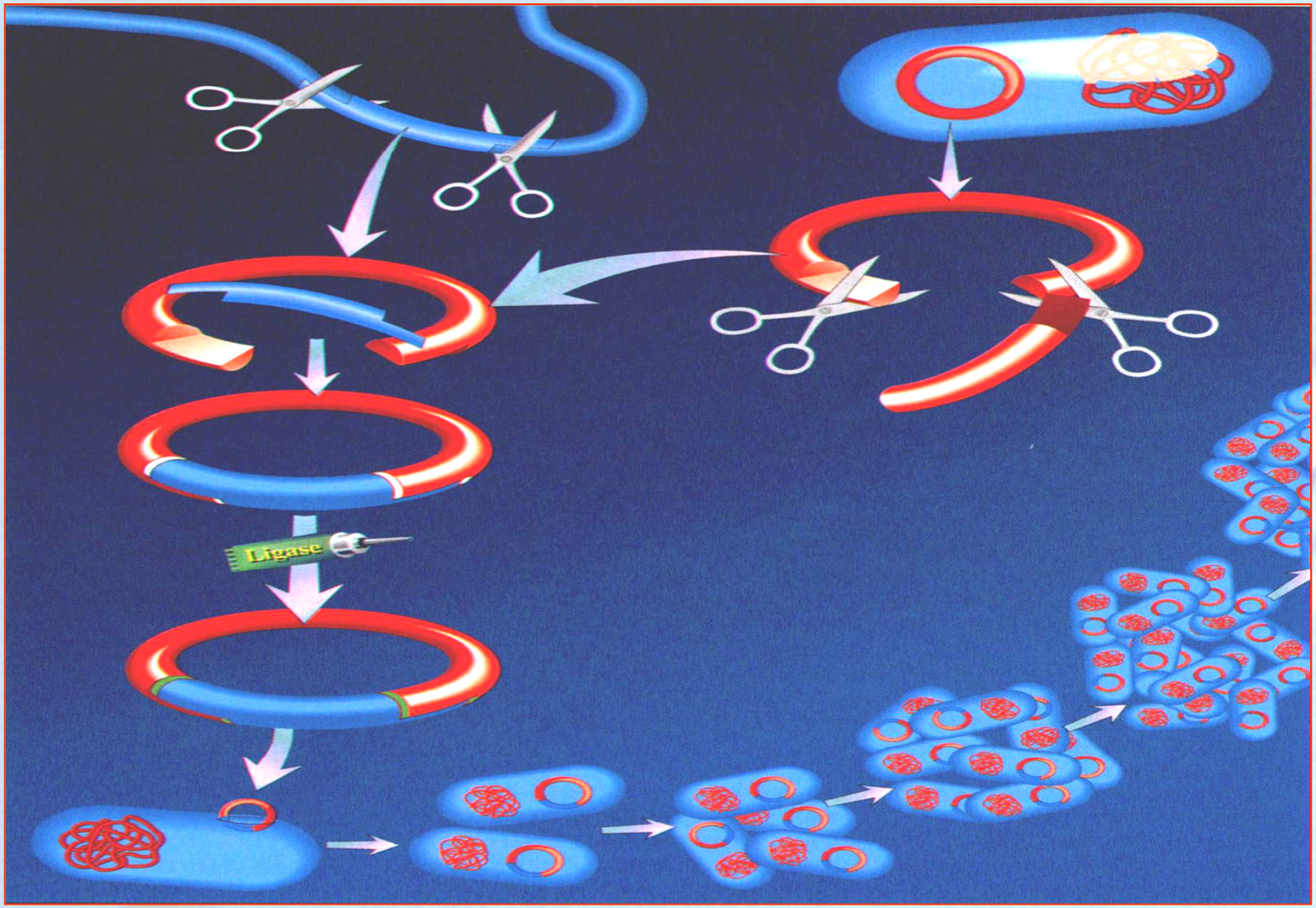
Są różne typy wektorów, a dobranie odpowiedniego wektora zależy, m.in. od kompetencji klonowanych komórek drożdżowych

Najważniejszym elementem warunkującym specyficzność wektora są sekwencje *ori* odpowiedzialne za inicjację replikacji DNA



Strzałkami oznaczono potencjalne miejsce replikacji *ori*

Najprostsze wektory posiadają wyłącznie jedno, unikalne miejsce restrykcyjne, w które można wprowadzić obcy DNA, stosując technikę „cięcia-łatania”


Ligase

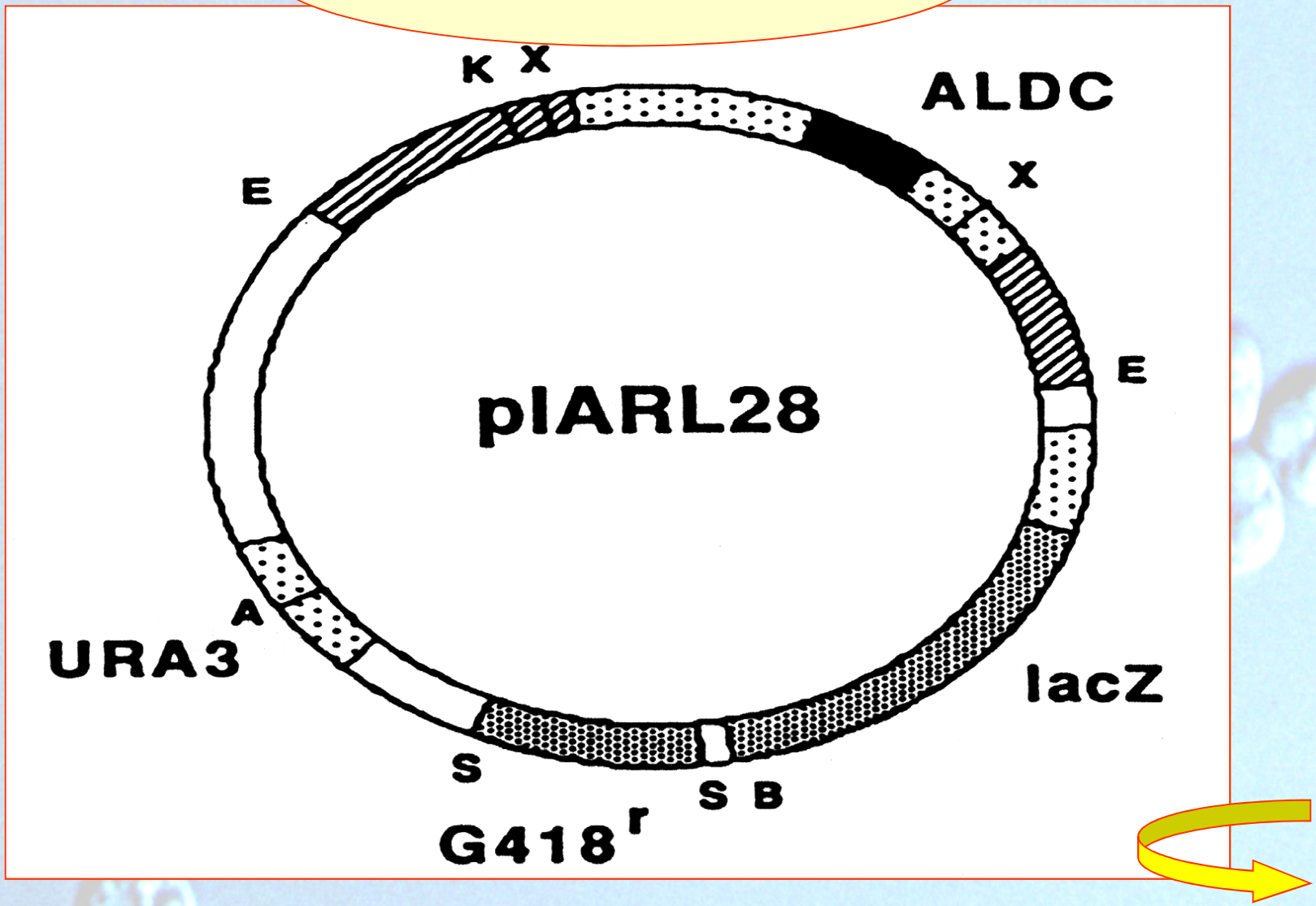
Wektor musi być tak skonstruowany, aby istniała możliwość selekcji tych komórek, do których wniknął, stąd wektory zazwyczaj posiadają geny markerowe (CUP1, G418) czyli geny kodujące białka odpowiedzialne za łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe

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

1. *Wektory integracyjne*

(np. do 140 kopii) zawierają DNA genów rybosomalnych z drożdży jako homologiczne do chromosomu, rekombinacyjne sekwencje (*Eco*RI fragment z częścią 5.8S i 25S rDNA genów bez sekwencji ARS), wzmacniające efekt transformacji

Wektor integracyjny



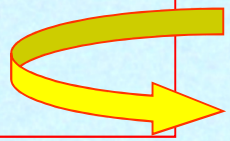
Do tego dołączona jest sekwencja DNA bakteryjnego (*Enterobacter aerogenes*), kodująca ALDC oraz pewien fragment plazmidu bakteryjnego pBR322 z selekcyjnym markerem, np. z genami oporności na antybiotyk ampicylinę czy tetracyklinę, z regionem kodującym HIS lub URA, bądź z genami *lacZ* z *E. coli*

Wektory integracyjne mogą łączyć się z homologicznymi do nich odcinkami odpowiednich chromosomów, zapewniając dużą stabilność rekombinacji

2. *Wektory replikatywne*

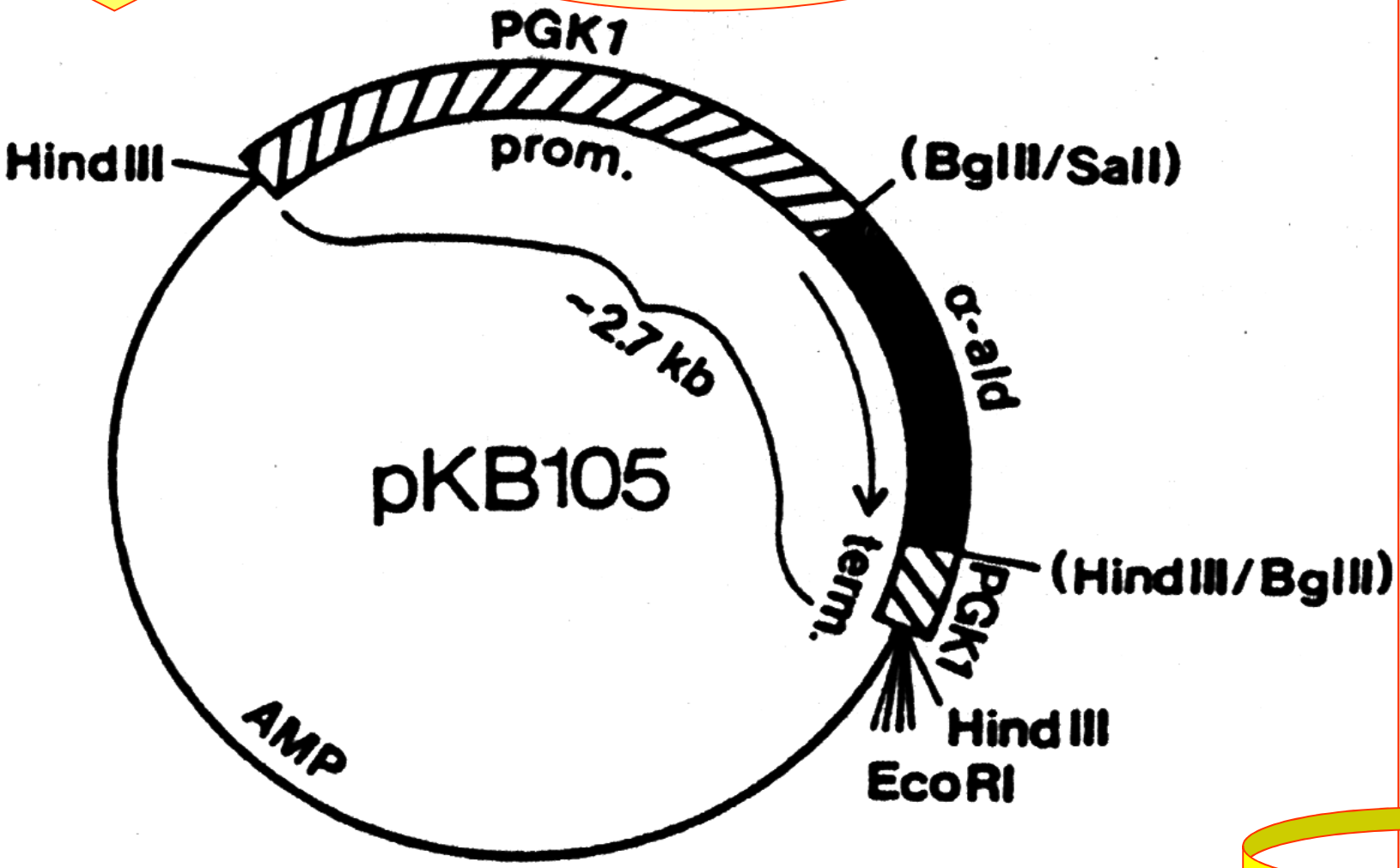
(autonomously replicating plasmids)

są konstruowane z fragmentu DNA plazmidu bakteryjnego pKB105 lub pKB106 z sekwencją α-ALDC (z *Enterobacter aerogenes* lub *Klebsiella terrigena*), z sekwencji markerowej odporności na Amp, z partii drożdżowego DNA w wektorze integracyjnego oraz z chromosomalnego regionu replikacji (*ori*)

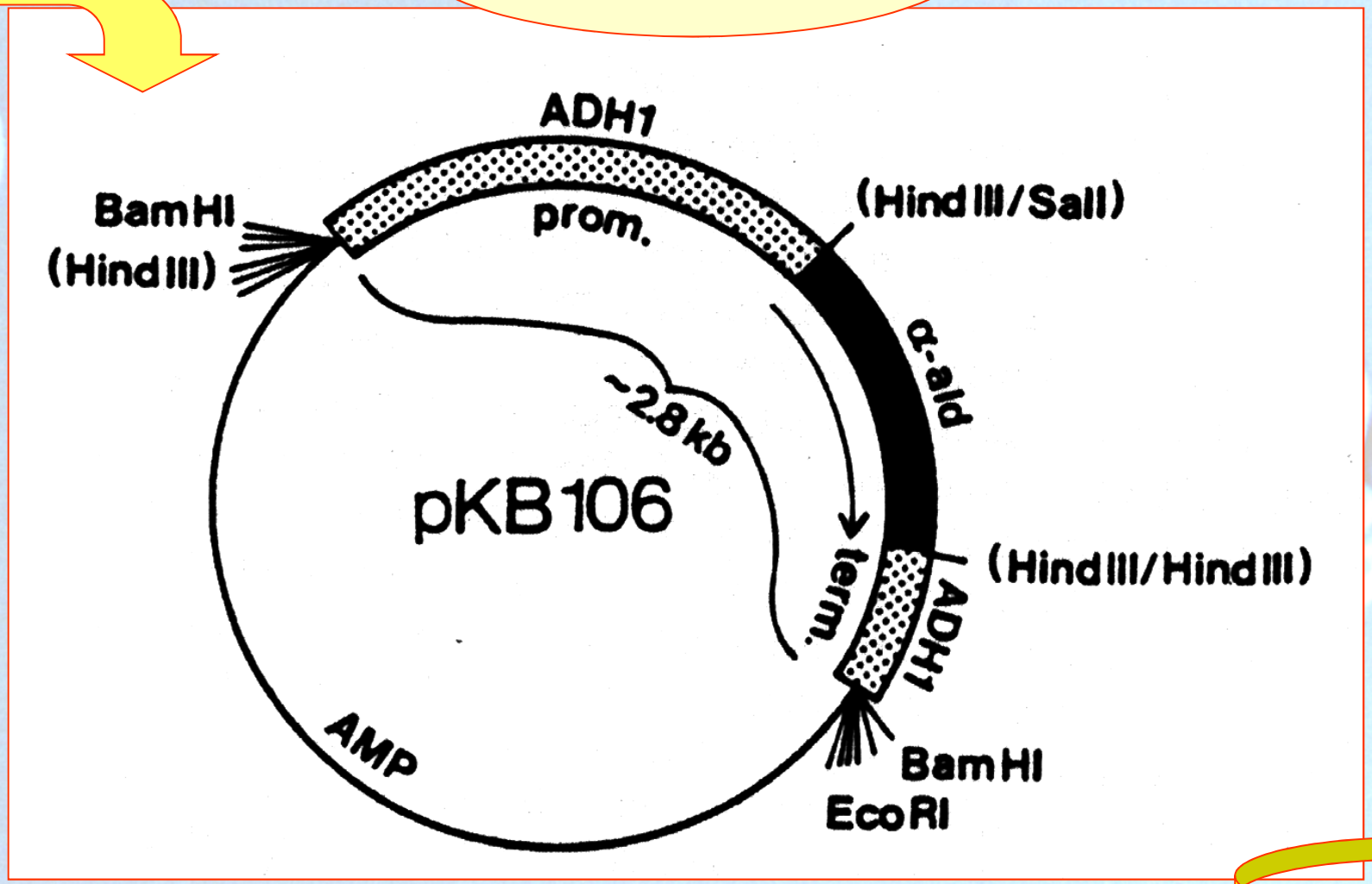


Przykładem wektorów replikatywnych, skonstruowanych dla drożdży browarniczych mogą być 2 niżej przedstawione wektory, jako kasety ekspresyjne (expression cassettes), będące pod kontrolą mocnych drożdżowych promotorów np. ADH (z sekwencją izoenzymu dehydrogenazy alkoholowej) i PGK (z sekwencją kinazy fosfoglicerynowej)

Wektor replikatywny



Wektor replikatywny



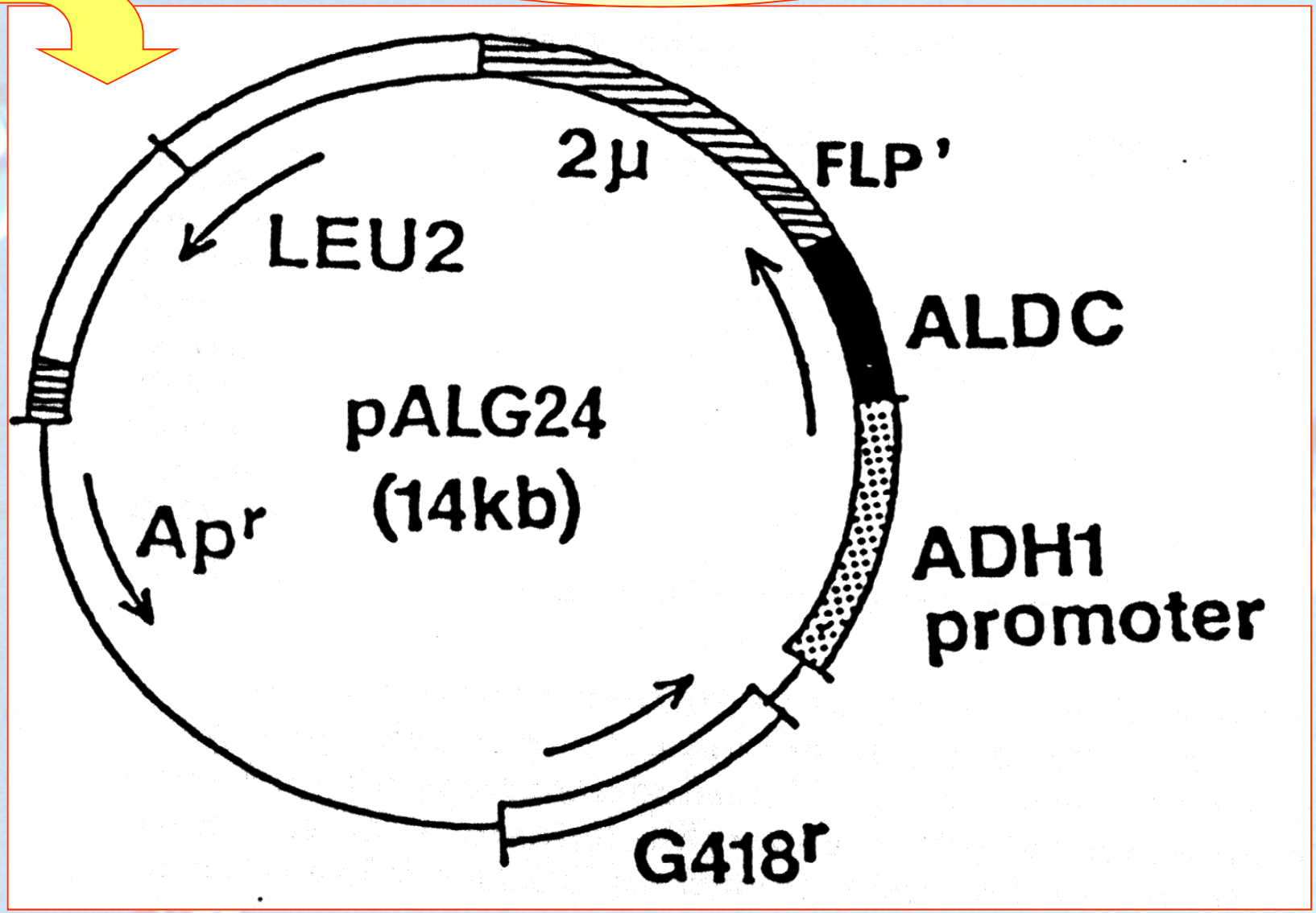
Do wielokrotnej amplifikacji genów ILV5 zastosowano również wektory replikatywne (z genami URA 3), które wprowadzano do drożdży auksotroficznych (mutant w *ura*$^{-}$)

3. *Wektory episomalne*

Niosą informację genetyczną o dekarboksylacji kwasu α-acetomlekowego i są wektorami skonstruowanymi na bazie pewnych sekwencji bakteryjnych i drożdżowych.

Zawierają one geny ALDC izolowane z bakterii *Enterobacter aerogenes*, geny selektywne, np. Ap^r/$G418^r$, LEU2, jak również plazmid drożdżowy 2 μ

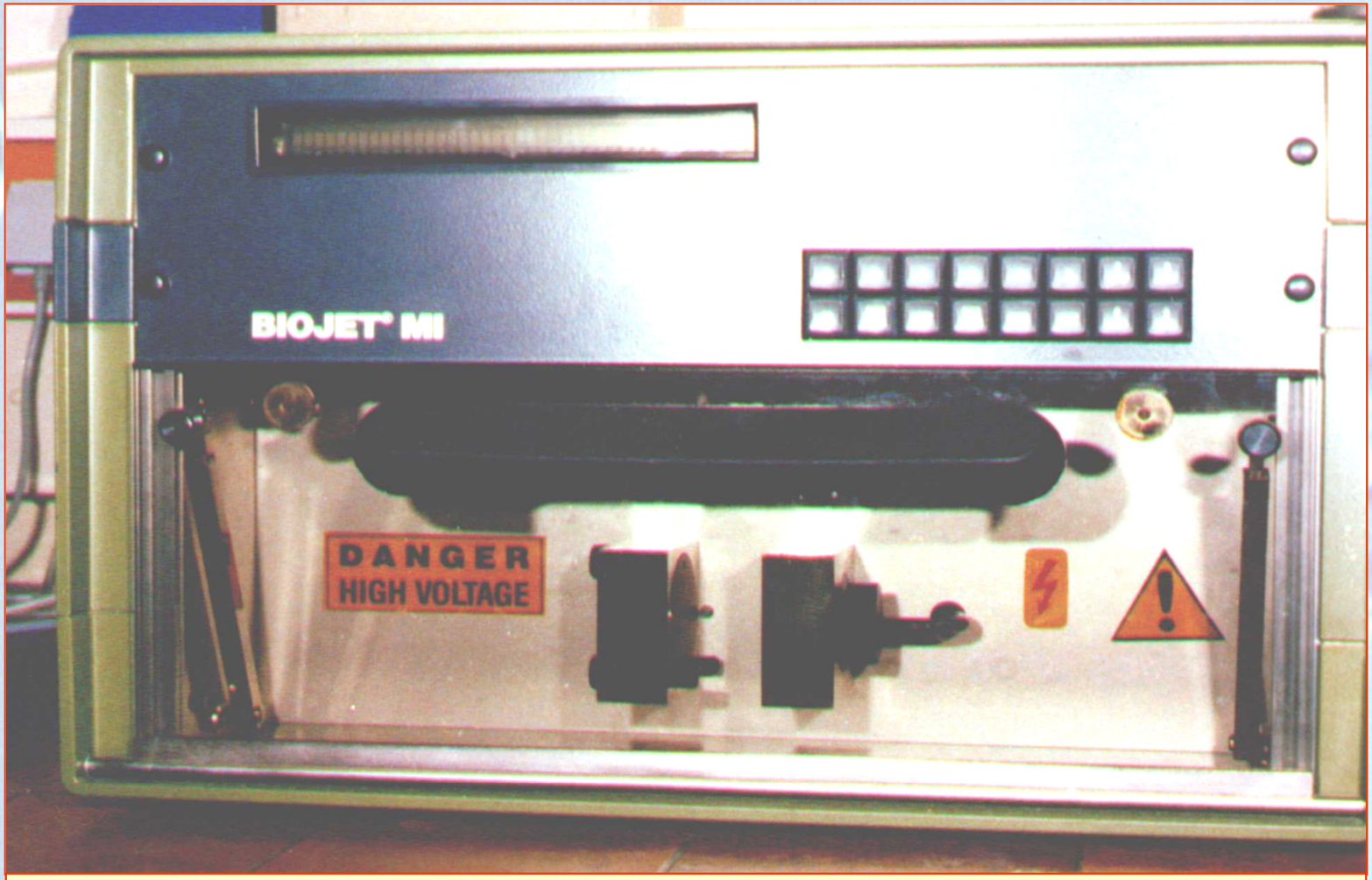
Wektor episomalny



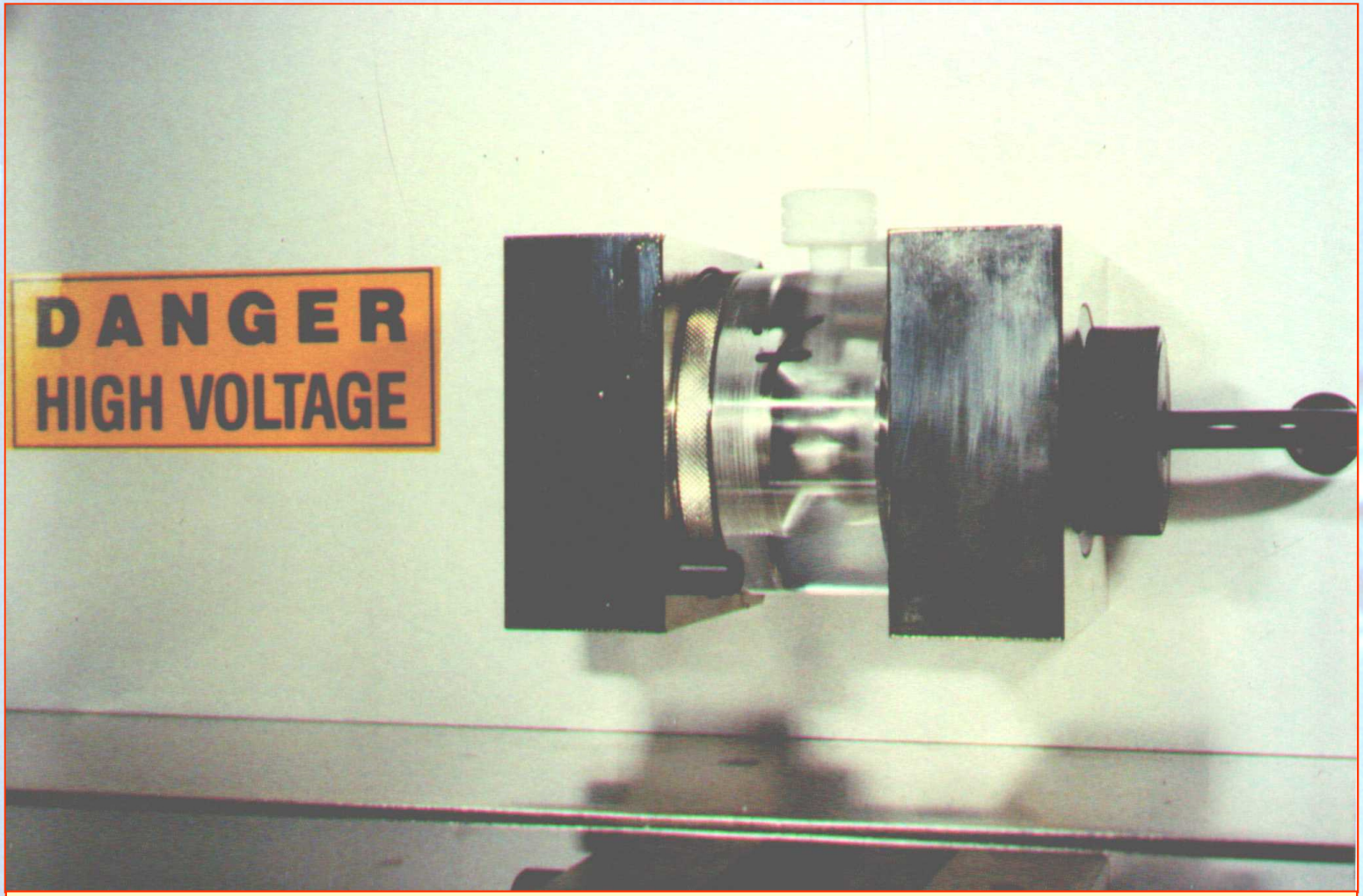
Metody Fizyczne Konstrukcji Drożdży

Transformacja
lub co-transformacja

chemiczna i elektrotransformacja odpowiednich wektorów: integracyjnych, replikatywnych, episomalnych lub systemów YAC (yeast artificial chromosom), będących tzw. kasetą ekspresyjną (expression cassettte)



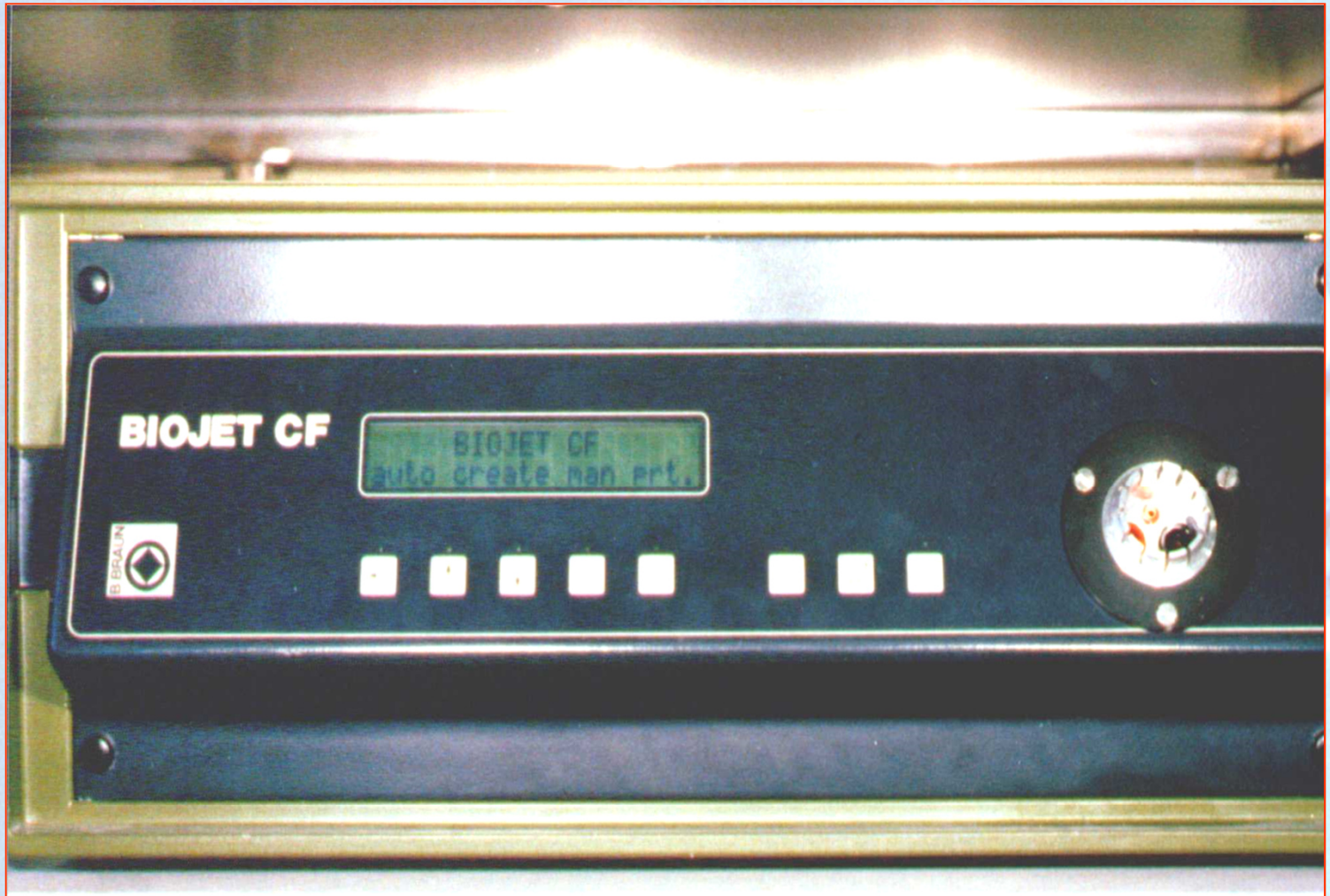
Urządzenie do elektrotransformacji



Komora do elektrotransformacji

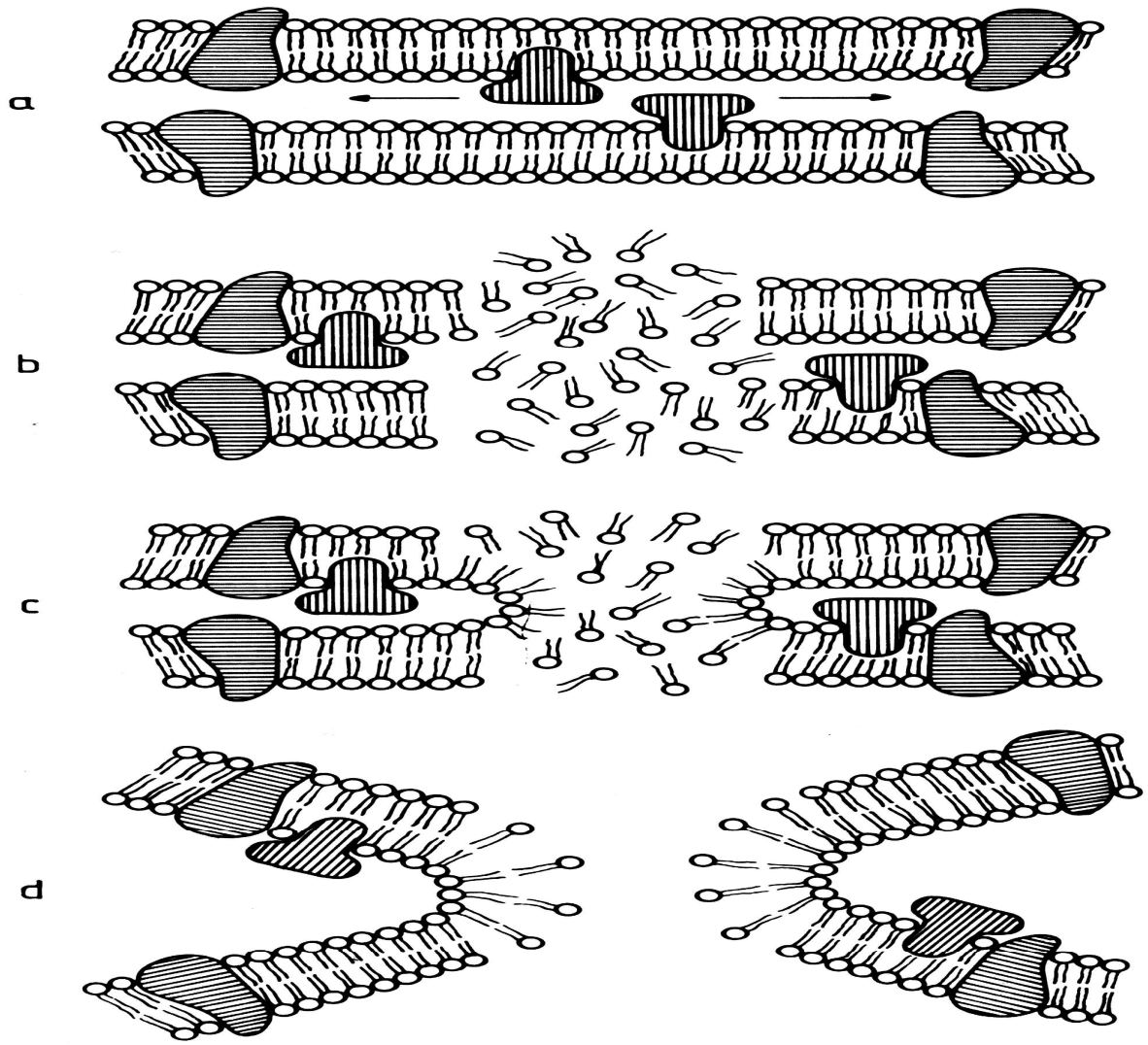
Fuzja
lub elektrofuzja protoplastów

kompetentnych komórek, z odpowiednim zestawem cech genetycznych, których ekspresja wyrażać się będzie pożądanymi właściwościami technologicznymi, np. drożdże amylolityczne lub flokulujące

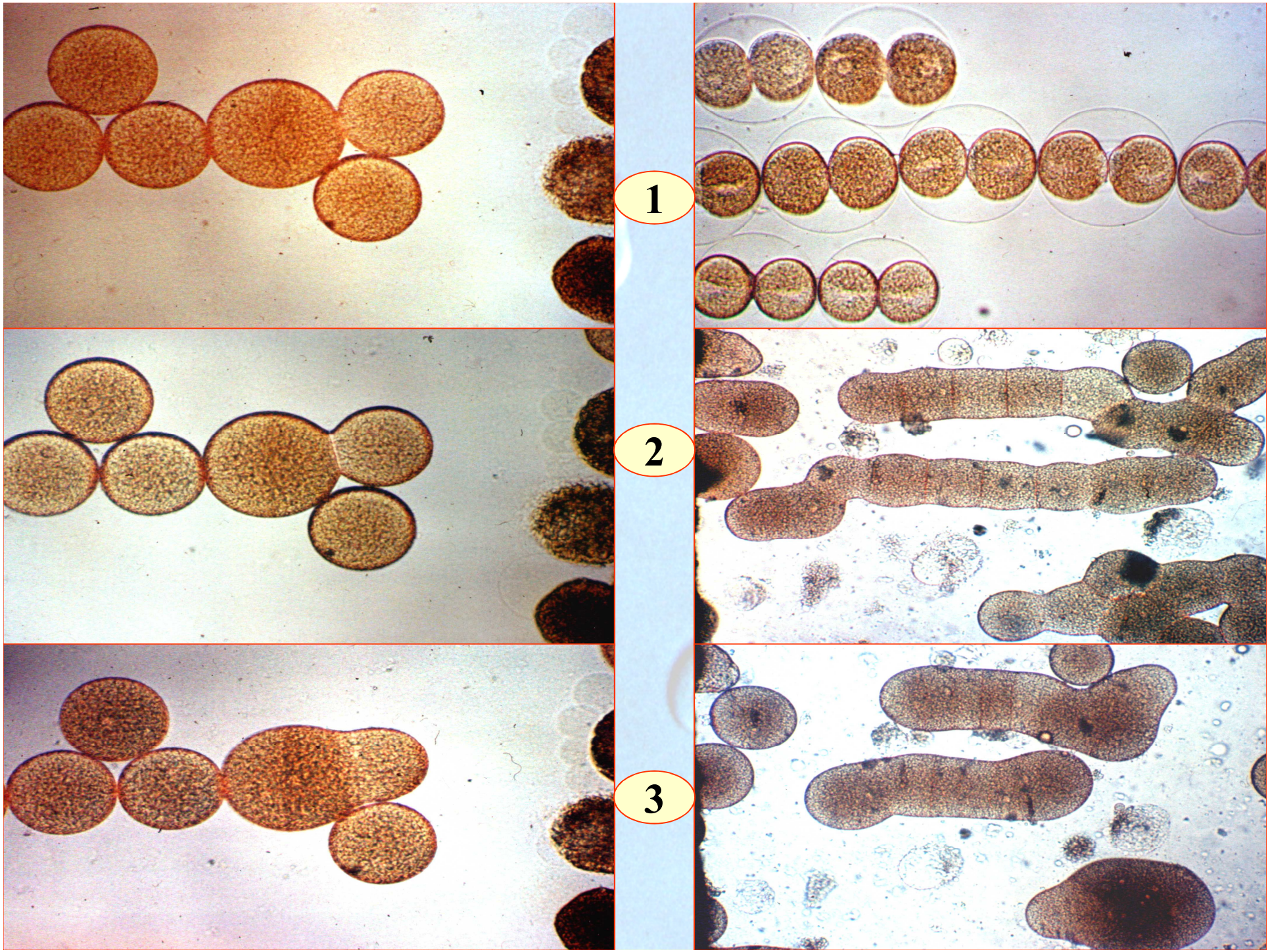


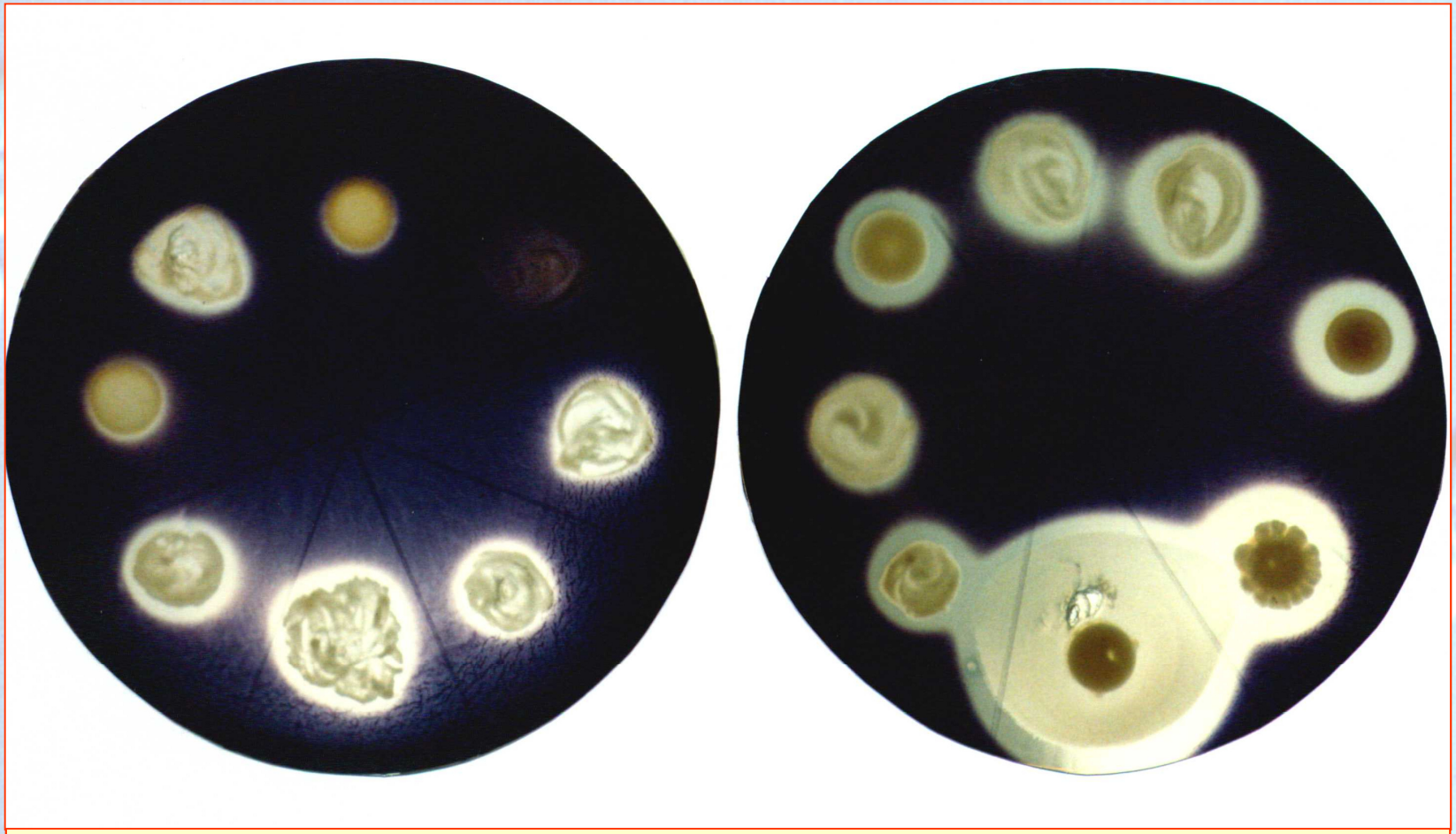
Aparat do elektrofuzji

Komora helikalna do elektrofuzji



Tworzenie się nowych połączeń fosfolipidowych membrany


1
2
3

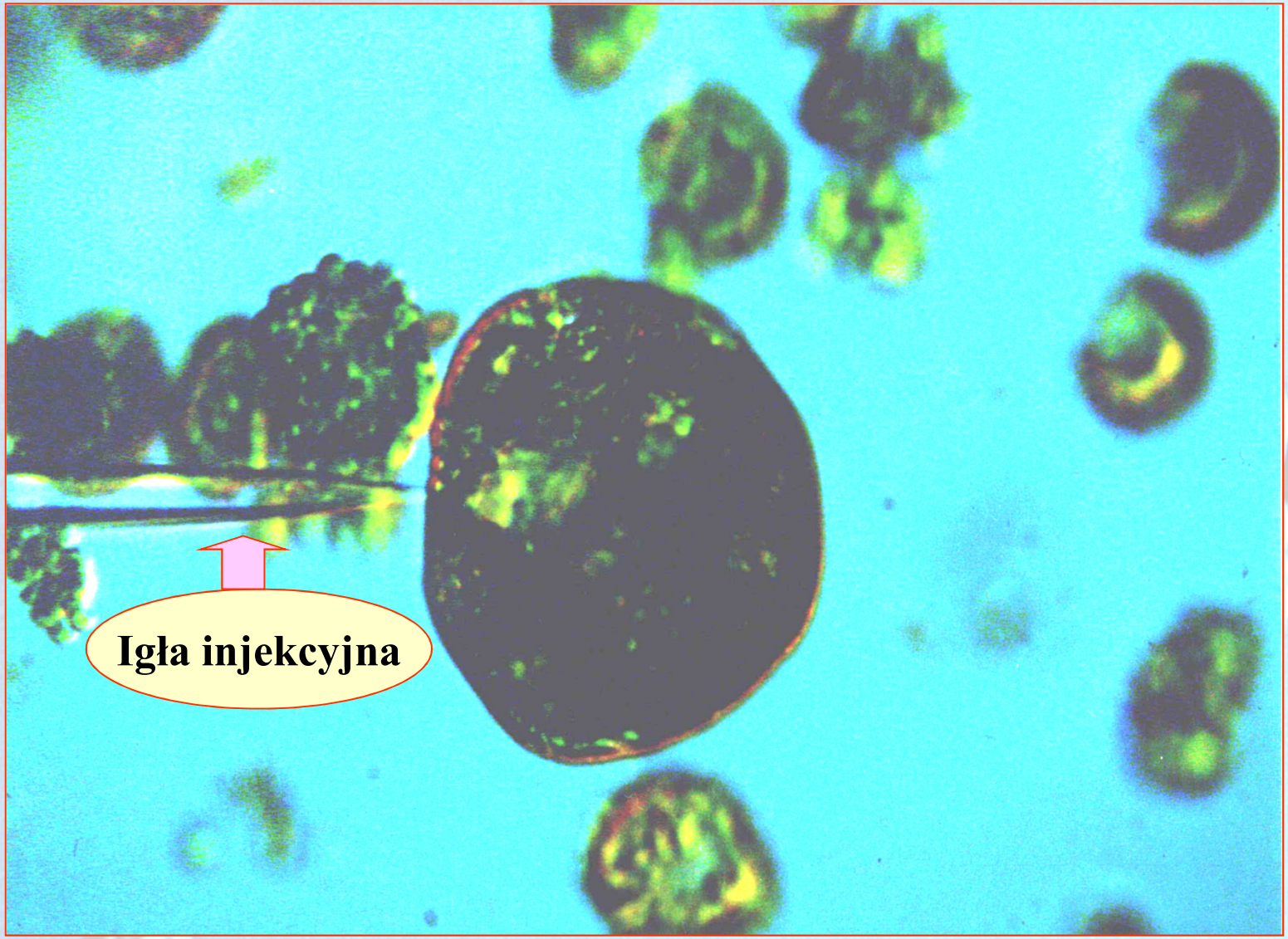


Przykłady drożdży amylolitycznych otrzymanych w wyniku elektrofuzji protoplastów

Szczepy drożdży amylolitycznych otrzymanych w wyniku elektrofuzji protoplastów

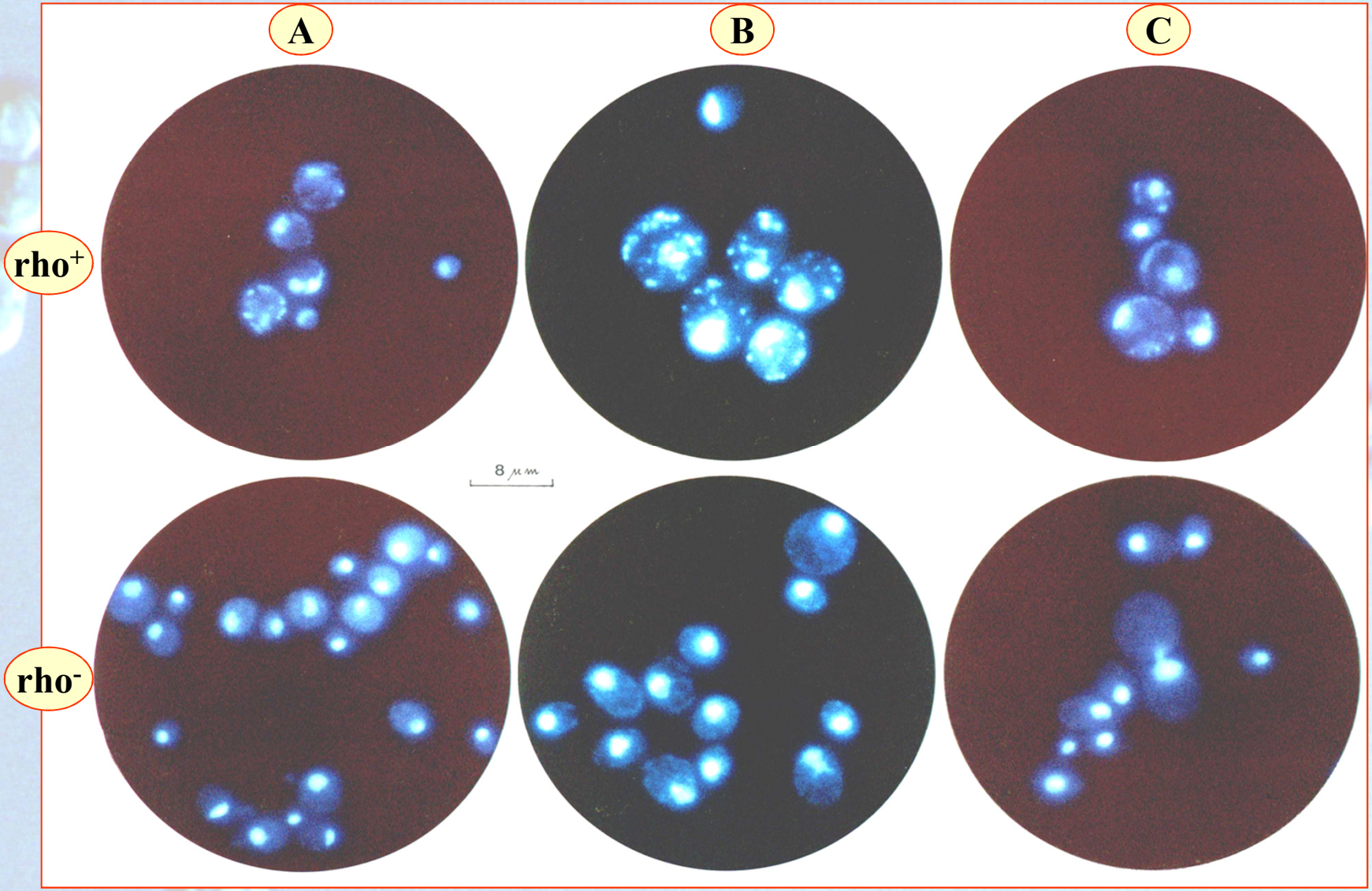
Injekcja rekombinacyjnego DNA

z odpowiednim zestawem cech genetycznych bezpośrednio do kompetentnych komórek. Ekspresja rDNA wyrażać się będzie pożądanymi właściwościami technologicznymi piwa


Igła injekcyjna

Enukleacja
oraz fuzja cytoplastów

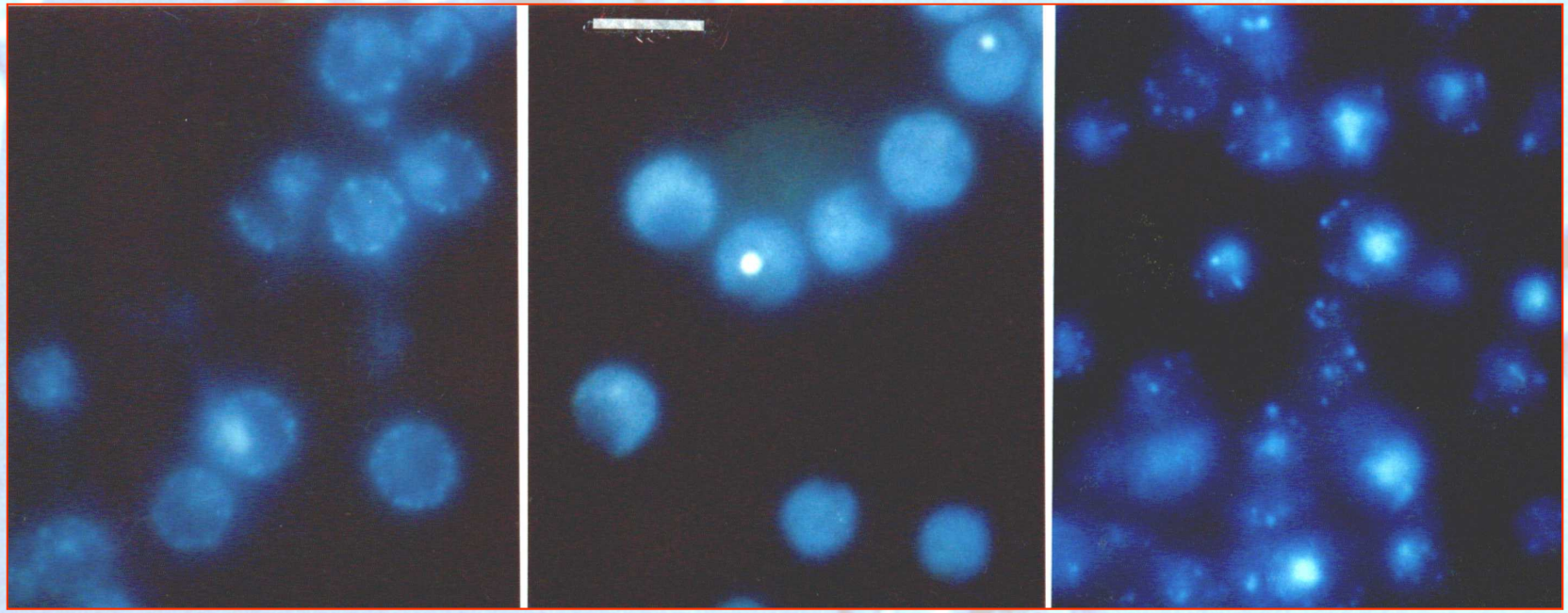
Technika ta może być szczególnie korzystna do drożdży przemysłowych, tj. polyploidów, bądź aneuploidów, *rho*$^{+}$ lub *rho*$^{-}$


A
B
C
rho+
rho-
8 μm

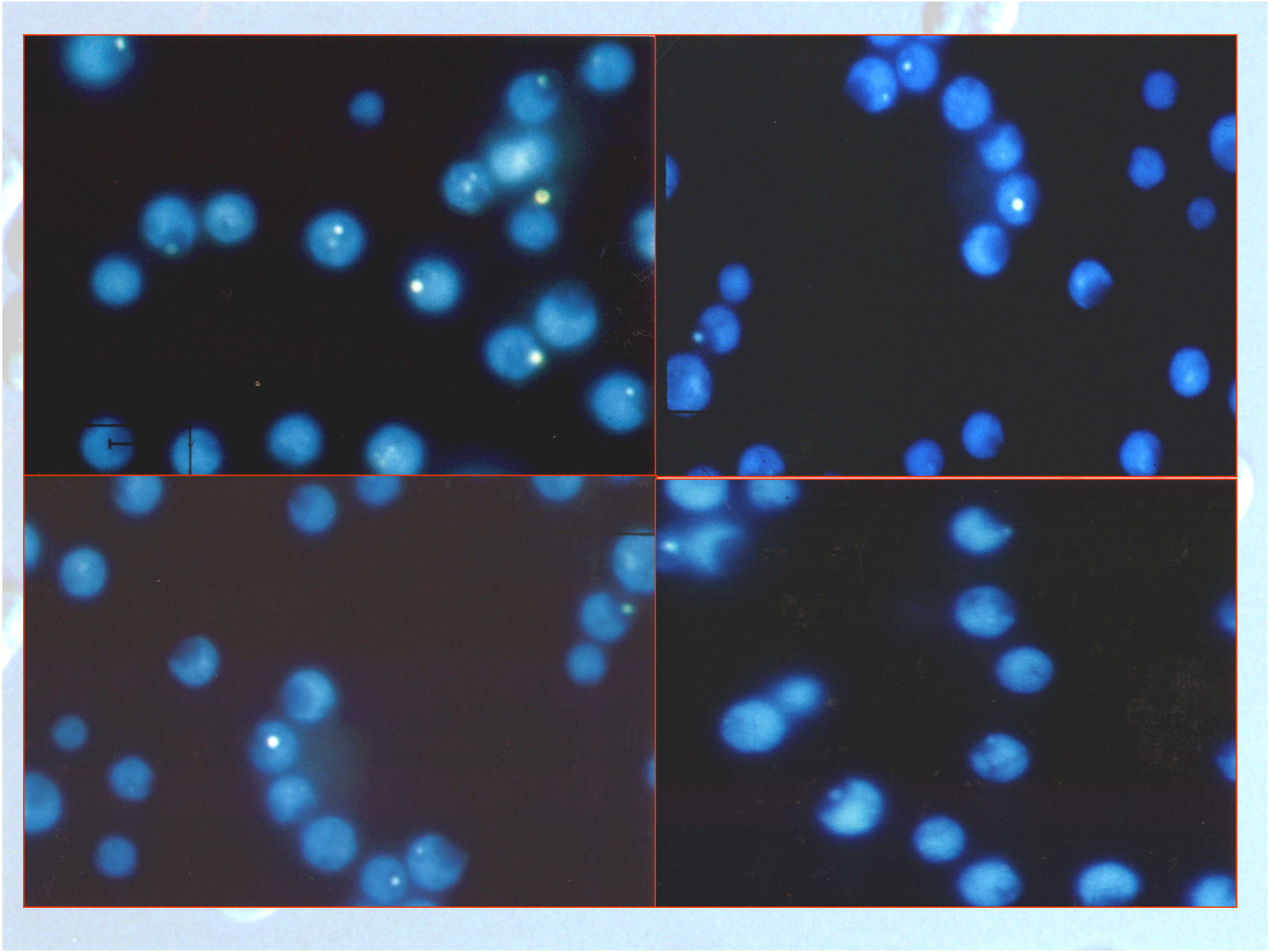
Po usunięciu jądra z jednej macierzystej komórki (enukleacja), zawierającej np. plazmidy ekspresyjne z α-ALDC, a następnie po elektrofuzji tego cytoplastu z inną, pożądaną komórką o korzystnych cechach jądrowych otrzymujemy drożdże z nowymi cytoplazmatycznymi oraz jądrowymi cechami

Szczepy o cechach mitochondrialnych

rho$^-$ **rho$^-$** **rho$^+$**



Cytoplasty po enukleacji jąder ze sferoplastów drożdży



Ocena metod konstrukcji drożdży transgenicznych dla browarnictwa

Zastosowanie drożdży transgenicznych z w/w zmianami powoduje szybkie obniżenie poziomu diacetylu w dojrzewającej brzeczce, pozbawiając piwo ujemnych cech smakowych, oczywiście bez innych niekorzystnych zmian w gotowym produkcie

Drożdże transgeniczne z wszczepionym zespołem genów amylolitycznych pozwalają na wydajniejszą fermentację, a czynnik flokulacyjny czyni drożdże efektywniejsze podczas fermentacji

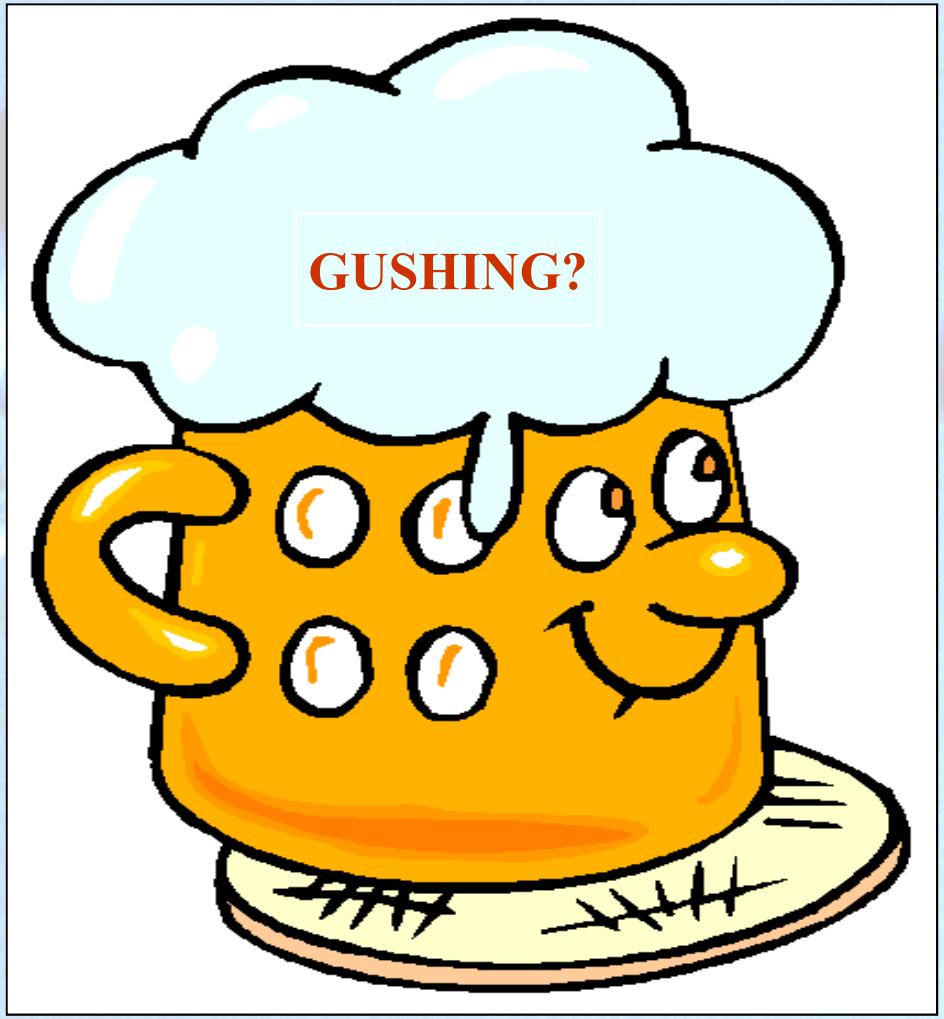
Wynika z tego, że klonowanie obcego, zrekombinowanego DNA (rDNA) w drożdżach pozwala nam na tzw. wyrażenie się badanego genu w komórce oraz na ekspresję odpowiednio zmodyfikowanych białkowych produktów

Jest to proces bardzo złożony, zważywszy, że drożdże przemysłowe są z reguły polyploidami lub aneuploidami Stąd ogromnie trudno jest generować stabilne auksotroficzne mutanty służące do selekcji transformantów oraz utrzymać stabilność klonowanej cechy technologicznej

Polyploidy lub aneuploidy przemysłowe po rekombinacji niedużego odcinka DNA mogą bowiem szybko "reperować" zmiany w swoim rodzimym, zmodyfikowanym zestawie genetycznym

Przedstawione wyżej metody i techniki rekombinacji genetycznej dają w wielu przypadkach pozytywne rezultaty, a otrzymane drożdże transgeniczne można zastosować z pełnym sukcesem w technologii browarniczej.

Pozostaje jedynie opracowanie legislacji tak otrzymanych krzyżówek genetycznych i aprobację technologów browarnictwa oraz konsumentów.



PROST !

Dziękuję za uwagę