

# Próby transformacji cechy killerowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do amyloリティcznego szczepu *Schwanniomyces occidentalis*

H. Stobińska

E. Drewicz

D. Kręgiel

H. Oberman

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii  
Politechnika Łódzka  
Łódź

## 1. Wprowadzenie

Do konstrukcji nowych szczepów przemysłowych stosowana jest m.in. indukowana fuzja protoplastów, która jest metodą prostą i nie wymaga specjalnego wyposażenia laboratoryjnego. Metoda polega na enzymatycznej degradacji ściany komórkowej mikroorganizmów w osmotycznie stabilizowanym środowisku i łączeniu się protoplastów szczepów rodzicielskich w roztworze glikolu polietylenowego (PEG) i jonów wapnia (13,17,18). Do selekcji powstałych hybrydów należy zastosować odpowiednie podłoże regeneracyjne eliminujące komórki rodzicielskie (4,13,22).

Wydajność fuzji zależy od właściwości łączonych szczepów oraz od warunków jej prowadzenia.

W selekcji hybrydów, otrzymanych metodą indukowanej fuzji protoplastów, wykorzystywana jest auksotrofia, uszkodzenia oddechowe lub oporność na antybiotyki szczepów wyjściowych (4,6,9). Przygotowanie mutantów auksotroficznych, oddechowych lub opornych na określony antybiotyk nie wyklucza jednakże innych niepożądanych zmian w genomie. Przygotowanie takich mutantów jest trudne, zwłaszcza u szczepów poliploidalnych. Z tego względu do selekcji hybrydów zalecane są raczej metody, które nie wymagają mutacji u stosowanych szczepów rodzicielskich. Nowe metody selekcji są oparte na naturalnych właściwościach szczepów rodzicielskich i mają na celu eliminację jednego z nich.

Alternatywną metodą selekcji produktów fuzji jest wykorzystanie białek killerowych jako naturalnych produktów wytwarzanych przez niektóre drożdże (2,8,22).

Zjawisko killerowe występuje często u różnych rodzajów drożdży, lecz najlepiej poznane zostało u drożdży *Saccharomyces* sp. i dlatego zastosowanie czynnika killerowego w badaniach genetycznych nad udoskonaleniem szczepów przemysłowych jest oparte głównie na tym rodzaju (14,15,19,20).

Toksyna killerowa jest białkiem pozakomórkowym, wytwarzanym w zakresie temperatur 20-24°C i przy kwaśnym odczynie środowiska (pH = 4,2-5,0), zabijającym wrażliwe komórki (R<sup>-</sup>). U *Saccharomyces cerevisiae* produkcja toksyny killerowej (K<sup>+</sup>) i oporność na nią (R<sup>+</sup>) jest uwarunkowana występowaniem podwójnego łańcucha RNA (MdsRNA), który stanowi część cząsteczki wirusopodobnej zlokalizowanej w cytozolu (1,19). Drożdże killerowe jako zakażenia różnych środowisk przemysłowych stanowią większe niebezpieczeństwo niż drożdże dzikie zanieczyszczające środowiska fermentacyjne, ponieważ poza konkurencją o substrat zabijają również wrażliwe szczepy produkcyjne (11,21). Mogą też zakłócać przebieg procesów fermentacyjnych, co w efekcie obniża wydajność tych procesów. Logicznym rozwiązaniem tego problemu mogłoby być otrzymanie takiego szczepu produkcyjnego, który wytwarza toksynę killerową i jednocześnie jest na nią odporny. Dane literatury (2,5,8,9,14,15,17,21-23) świadczą o dużych możliwościach ulepszenia drobnoustrojów na drodze transformacji czynnika killerowego do komórek. Udana próba doskonalenia cech szczepów przemysłowych cytowane w literaturze inspirowały nasze badania, w których stosując metodę międzyrodzajowej fuzji protoplastów zmierzano do uzyskania mieszańców o właściwościach amylolitycznych i fermentacyjnych. Cechy te pozwoliłyby pominąć w procesie technologicznym etap wstępnej hydrolizy złożonego substratu skrobiowego.

Celem pracy było otrzymanie somatycznych hybrydów z trwale zachowaną cechą killerową. Toksyna produkowana przez skonstruowany hybryd może stanowić naturalną ochronę fermentującego środowiska skrobiowego przed zakażeniami drożdżami dzikimi, które są na czynnik killerowy wrażliwe.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiał biologiczny

W badaniach stosowano szczepy drożdży:

- 1) *Schwanniomyces occidentalis* Y6 — szczep o wysokich uzdolnieniach amylolitycznych,
- 2) *Saccharomyces cerevisiae* T158C — szczep superkillerowy wytwarzający toksynę typu K1,
- 3) *Saccharomyces cerevisiae* rasy „Burgund” — producent toksyny killerowej typu K2,
- 4) *Saccharomyces cerevisiae* W6 — szczep wrażliwy na toksynę killerową typu K1 i K2.

### 2.2. Podłoża hodowlane

Szczepy hodowano w warunkach standardowych, przechowywano w temperaturze 4°C. Podłoża hodowlane stosowane w pracy oraz ich przeznaczenie przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1  
 PODŁOŻA HODOWLANE I ICH PRZEZNACZENIE

Podłoże	Skład (%)		Przeznaczenie
YPG (3)	pepton Difco ekstrakt drożdżowy glukoza agar	0,5 0,25 1,0 2,0	namnażanie materiału biologicznego, przechowywanie szczepów
YPS (3)	pepton Difco ekstrakt drożdżowy skrobia agar	0,5 0,25 1,0 2,0	przechowywanie szczepów
YPG MB (20)	pepton Difco ekstrakt drożdżowy glukoza błękit metylenowy agar pH = 4.7	0,5 0,25 1,0 0,003 2,0	oznaczanie aktywności killerowej
Minimalne M <sub>0</sub> ze skrobią* (3)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O ekstrakt drożdżowy skrobia agar	0,3 0,1 0,05 0,1 1,0 2,0	oznaczanie aktywności amylolitycznej, przechowywanie szczepów
Minimalne M <sub>0</sub> ze skrobią	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O skrobia agar	0,3 0,1 0,05 1,0 2,0	selekcja hybrydów, przechowywanie szczepów
Minimalne M <sub>0</sub> z mannitolem (6)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O ekstrakt drożdżowy mannitol	0,3 0,1 0,01 0,1 8,0	regeneracja produktów fuzji
Podłoże Jacobsena (10)	glukoza ekstrakt drożdżowy agar	0,5 0,3 2,0	regeneracja protoplastów
Podłoże minimalne M <sub>0</sub> + RBB Starch (16)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O skrobia RBB Starch agar	0,3 0,1 0,05 1,0 0,2 2,0	oznaczanie aktywności amylolitycznej, selekcja hybrydów

\* podłoże minimalne M<sub>0</sub> z dodatkiem ekstraktu drożdżowego

### 2.3. Badanie aktywności killerowej

Wytwarzanie toksyny killerowej oznaczano metodą testów krzyżowych wg Woods i Bevan (20).

## 2.4. Oznaczanie aktywności amylolitycznej

Aktywność amylolityczną badanych drożdży oznaczano w teście płytkowym w podłożu minimalnym  $M_0$  zawierającym skrobię w postaci RBB Starch (tab. 1) (16).

## 2.5. Otrzymywanie, fuzja i regeneracja protoplastów

Protoplasty otrzymywano stosując warunki opisane w pracy Oberman i in. (13). Międzyrodzajową fuzję protoplastów przeprowadzono wg metody Fourniera (6).

# 3. Omówienie wyników

## 3.1. Międzyrodzajowa fuzja protoplastów

Fuzję protoplastów wykonano stosując następujące układy drożdży:

1) *Schwanniomyces occidentalis* Y6 (amyl.<sup>+</sup>) i *Saccharomyces cerevisiae* T158C (K1),

2) *Schwanniomyces occidentalis* Y6 (amyl.<sup>+</sup>) i *Saccharomyces cerevisiae* (K2).

Fuzję protoplastów indukowano 20% roztworem PEG 4000. PEG wzmacniał aglutynację protoplastów, w wyniku której następowało wyraźne łączenie się komórek w konglomeraty. Wykorzystując metodę Fourniera (6), po 60 min procesu fuzji dodawano podłoże minimalne  $M_0$  zawierające mannitol (tab. 1) w celu zapoczątkowania regeneracji protoplastów. Po 24 godz. tej wstępnej regeneracji badaną zawiesinę wysiewano na podłoże Jacobsena oraz podłoże minimalne  $M_0$  ze skrobią stabilizowaną osmotycznie 0,4 M  $MgSO_4$  (tab. 1). Do wyosobniania produktów fuzji wykorzystano cechy różnicujące szczepy wyjściowe, tj. zdolność hydrolizowania skrobi i aktywność killerową w stosunku do szczepu wrażliwego W6.

Międzyrodzajowa fuzja protoplastów drożdży *Schwanniomyces occidentalis* i *Saccharomyces cerevisiae* pozwoliła uzyskać 14-16 hybrydów tylko z układu protoplastów Y6 x Burgund z częstotliwością fuzji równą  $(5,7 - 5,8) \cdot 10^{-4}\%$  (tab. 2). Wytworzone hybrydy zostały wyselekcjonowane na podłożu minimalnym zawierającym 1% skrobi, na którym tworzyły kremowobiałe kolonie o regularnych brzegach z wyraźną strefą hydrolizy skrobi. Komórki hybrydów były kuliste, o rozmiarach (9 - 10  $\mu m$ ) 2-krotnie większych od komórek wyjściowych (4 - 5  $\mu m$ ). Hybrydy amylolityczne, wyodrębnione z podłoża minimalnego  $M_0$  ze skrobią, wykazały zdolność do tworzenia 4 kulistych zarodników w worku, podobnie jak szczep wyjściowy *S. cerevisiae* „Burgund”. Ponadto komórki hybrydów charakteryzowały się aktywnością killerową, co wskazuje na transformację cechy killerowej do komórek drożdży *Schwanniomyces occidentalis*. Badacze czescy donoszą o udanych próbach transformacji cechy killerowej drożdży *S. cerevisiae* T158C do drożdży piwowskich *S. uvarum*, w wyniku czego powstały somatyczne hybrydy piwowskie o właściwościach killerowych (9,22).

TABELA 2  
WYNIKI FUZJI PROTOPLASTÓW DROŻDŻY

Układ protoplastów	Ilość protoplastów (kom/cm <sup>3</sup> )	Liczba hybrydów (CFU/cm <sup>3</sup> )	Efekt fuzji	
			częstotliwość (%)	liczba hybrydów
Y6 × Burgund	2,31 · 10 <sup>7</sup> 1,37 · 10 <sup>6</sup>	1,4 · 10 <sup>4</sup>	5,7 · 10 <sup>-4</sup>	14
Y6 × Burgund	1,07 · 10 <sup>8</sup> 1,16 · 10 <sup>8</sup>	1,3 · 10 <sup>5</sup>	5,8 · 10 <sup>-4</sup>	16
Y6 × T158C	2,31 · 10 <sup>7</sup> 2,48 · 10 <sup>5</sup>	0	0	0

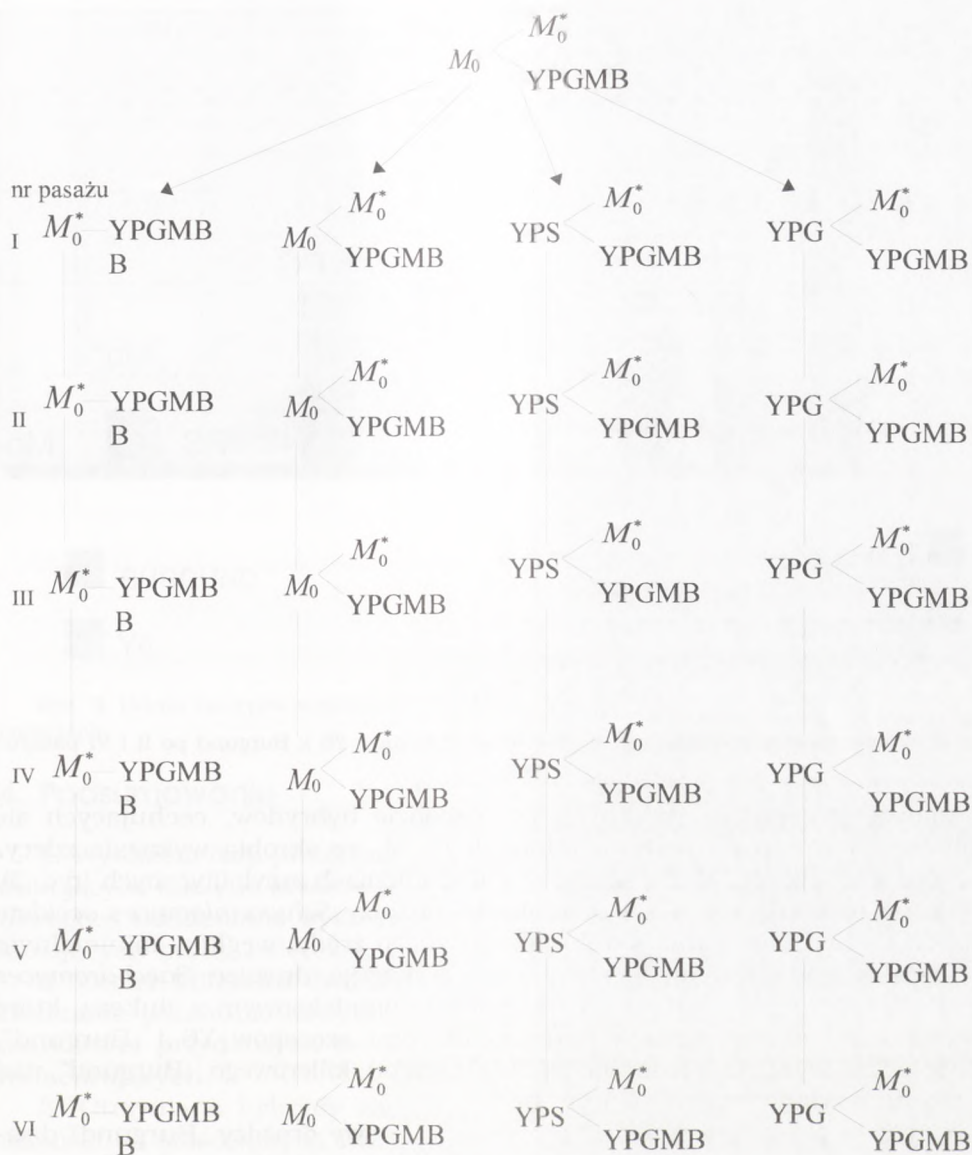
### 3.2. Kontrola stabilności somatycznych hybrydów

Ocenę trwałości otrzymanych hybrydów na podłożu kompleksowym YPG i YPS oraz na podłożu minimalnym M<sub>0</sub> ze skrobią wykonano zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 1. Wyniki tej oceny zostały przedstawione w tabeli 3 oraz na rycinach 2 i 3. Na ich tle widać, że najlepszą trwałość wykazywały hybrydy na podłożu kompleksowym z glukozą (YPG). Na podłożach ze skrobią, zarówno kompleksowym jak i minimalnym M<sub>0</sub>, następowało szybkie rewertowanie mieszańców do szczepów macierzystych.

TABELA 3  
KONTROLA STABILNOŚCI HYBRYDÓW  
PRZECHOWYWANYCH W WARUNKACH LABORATORYJNYCH NA RÓŻNYCH PODŁOŻACH HODOWLANYCH

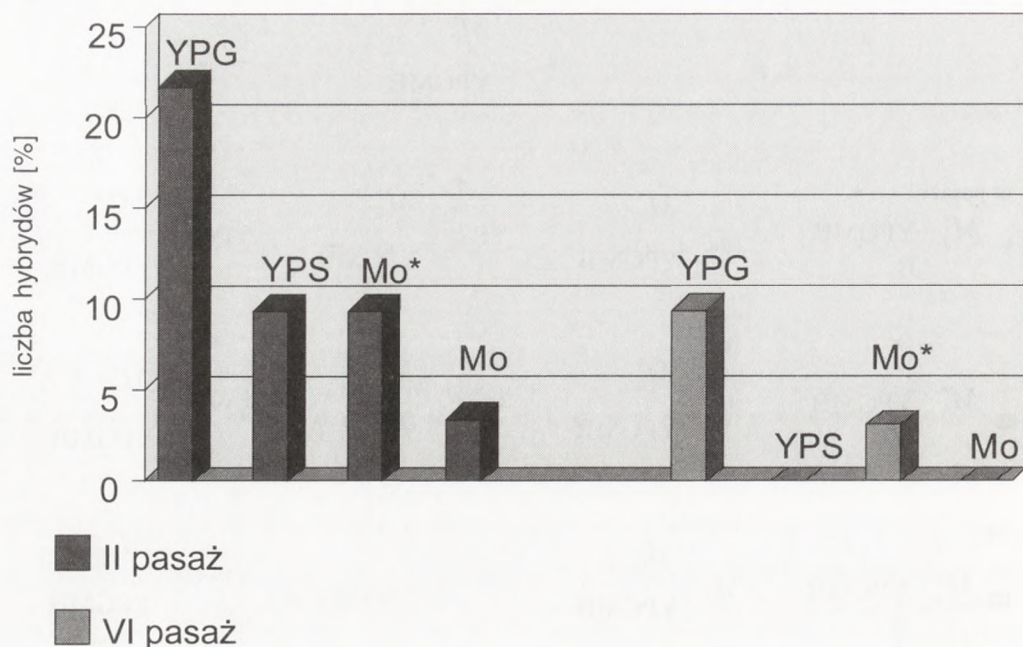
Podłoże	Nr pasażu	Czas przechowywania (tygodnie)	Udział hybrydów (%)
YPG	II	2	21,8
	IV	4	9,4
	VI	6	9,4
	VIII	8	1,3
YPS	II	2	9,4
	IV	4	3,1
	VI	6	0,0
M <sub>0</sub> ze skrobią*	II	2	9,4
	IV	4	6,2
	VI	6	3,1
M <sub>0</sub> ze skrobią	II	2	3,4
	IV	4	3,1
	VI	6	0,0

\* podłoże minimalne M<sub>0</sub> z dodatkiem ekstraktu drożdżowego



Ryc. 1. Schemat kontroli stabilności hybridów.

Po dwóch pasażach na podłożu YPG udział hybridów w populacji wynosił 21,8% i był 3-krotnie wyższy od liczby hybridów utrzymujących się na podłożach ze skrobią. W obecności skrobi już po szóstym pasażu udział hybridów był nieznaczny i wynosił od 0 do 3,1%, podczas gdy na podłożu optymalnym YPG hybridy stanowiły jeszcze do 10% populacji wyjściowej (ryc. 2).



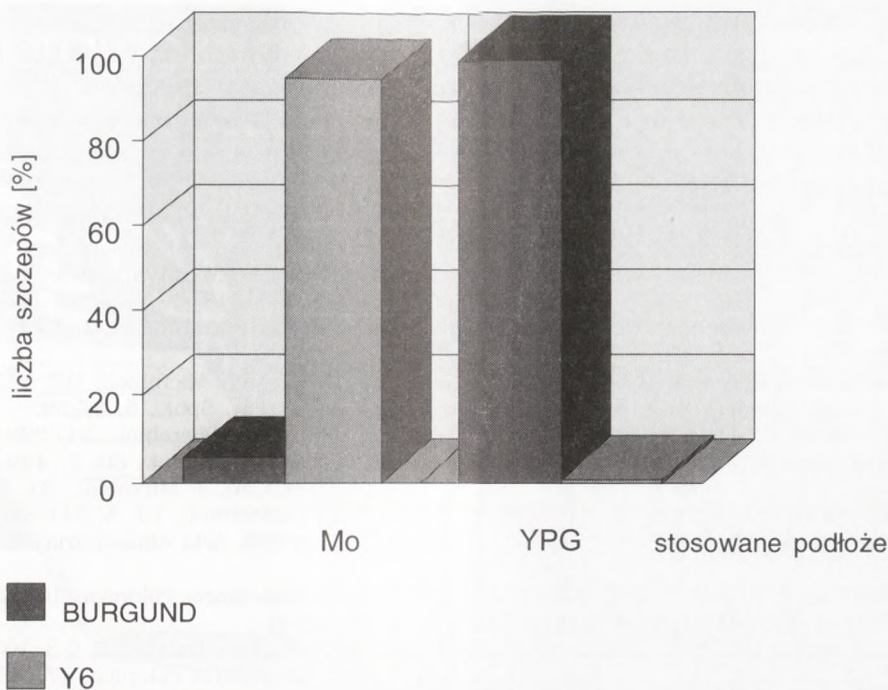
Ryc. 2. Wpływ podłoża hodowlanych na stabilność hybrydów Y6 x Burgund po II i VI pasażu.

Analiza szczepów, uzyskanych po rozpadzie hybrydów, cechujących się zdolnością wzrostu na podłożu minimalnym  $M_0$  ze skrobią wykazała zdecydowaną przewagę, tj. 94,3% szczepów o uzdolnieniach amylolytycznych (ryc. 3). Uzyskane rezultaty wynikają ze zdolności drożdży *Schwanniomyces occidentalis* Y6 do hydrolizowania skrobi jako jedyne źródła węgla w minimalnym środowisku hodowlanym. Cechy tej nie wykazują drożdże *Saccharomyces cerevisiae* „Burgund”. Natomiast na podłożu kompleksowym z glukozą, które stwarzało optymalne warunki wzrostu dla obu szczepów Y6 i „Burgund”, występowała wyraźna przewaga (99,3%) szczepu killerowego „Burgund” nad szczepem amylolytycznym Y6 (ryc. 3).

Wyniki te pozwalają sądzić, że czynnik killerowy drożdży „Burgund” działał zabójczo w stosunku do wrażliwych drożdży amylolytycznych Y6.

W literaturze brak jest danych dotyczących trwałości przechowywanych mieszańców killerowych. Doniesienia dotyczą jedynie metody uzyskiwania i metod selekcji materiału biologicznego (2,4,8,9,22). Ilnicka (7) niestabilność hybrydów wiąże z efektem wytwarzania i obecności obcego białka w komórce oraz z jej dodatkowym obciążeniem energetycznym.

Badania nad stabilnością hybrydów oraz nad wzmocnieniem nabytych cech w stosunku do szczepów wyjściowych będą stanowiły przedmiot dalszych badań.



Ryc. 3. Udział szczepów wyjściowych Y6 i „Burgund” po rozpadzie hybrydów na stosowanych podłożach.

#### 4. Podsumowanie

1. Wynikiem fuzji protoplastów drożdży fermentujących rasy „Burgund” produkujących toksynę killerową typu K2 oraz amyloリティcznych drożdży *Schwanniomyces occidentalis* było 16 hybrydów amyloリティczno-fermentujących wykazujących cechę killerową.

2. Cecha killerowa drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz zdolność wytwarzania pozakomórkowych amylaz przez *Schwanniomyces occidentalis* są markerami przydatnymi do selekcji somatycznych hybrydów amyloリティczno-fermentujących.

3. Otrzymane hybrydy zachowały stabilność w ciągu 4-6 tygodni w zależności od stosowanych warunków przechowywania. Na podłożu ze skrobią zarówno kompleksowym, jak i minimalnym, hybrydy ujawniały się tylko do IV pasaży, tj. w czasie około 4 tygodni, podczas gdy na podłożu kompleksowym z glukozą (YPG) hybrydy zachowały stabilność przez 6 kolejnych pasażów — około 6 tygodni.

4. Na podłożu kompleksowym YPG, optymalnym dla wzrostu obu szczepów, tj. *Saccharomyces cerevisiae* i *Schwanniomyces occidentalis*, podczas rozpadu hybrydów ujawniła się znacznie większa liczba komórek drożdży killerowych „Burgund”, co wynikać mogło z zabójczego działania wytwarzanej przez nie toksyny killerowej na szczep wrażliwy *Schwanniomyces occidentalis* Y6.



Na podłożu minimalnym ze skrobią zdecydowanie przeważały klony amylolyczne będące wynikiem indukcji skrobi jako jedyne go źródła węgla, która jest metabolizowana przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae*.

## Literatura

1. Bendowa O., (1986), *Folia Microbiol.*, 31, 422-433.
2. Bortol A., Nudel C., Giulietti A. M., Spencer J. F. T., Spencer D. M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1988), 28, 577-579.
3. Burbianka M., Pliszka A., (1981), *Mikrobiologia żywności*, PZWL, Warszawa.
4. Cvrčková F., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 515-516
5. Farris G. A., Fatichenti F., Bifulco L., Berardi L., Deiana P., Satta T., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14, 3, 219-222.
6. Fournier P., Provost A., Bourgnignon C., Heslot H., (1977), *Arch. Microbiol.*, 115, 143-149.
7. Ilnicka-Olejniczak O., (1991), *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 5, 37-59.
8. Janderova B., Davaasurengijn T., Bendova O., (1986), *Folia Microbiol.*, 31, 339-343.
9. Janderova B., Cvrčková F., Bendova O., (1990), *J. Basic Microbiol.*, 30, 7, 499-505.
10. Jacobsen T., Jensen B., Olsen J., Allermann K., (1985), *Can. J. Microbiol.*, 31, 93-96.
11. Michalcakova S., Sulo P., Slavikova E., (1993), *Acta Biotechnol.*, 13, 4, 341-350.
12. Oberman H., Stobińska H., Kregiel D., Kozanecka E., (1989), *Acta Alimentaria Polonica*, 15, 85-95.
13. Oberman H., Stobińska H., Kregiel D., (1990), *Acta Alimentaria Polonica*, 16, 83-96.
14. Salek A., (1993), *FEMS Microbiol. Letters*, 113, 1, 35-41.
15. Salek A., Schnettler R., Zimmermann U., (1992), *FEMS Microbiol. Letters*, 96, 2-3, 103-110.
16. Stobińska H., Kregiel D., Oberman H., (1991), *Acta Alimentaria Polonica*, 17, 145-158.
17. Sulo P., Michalcakova S., Reiser V., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14, 1, 55-60.
18. Svoboda A., (1988), *J. Gen. Microbiol.*, 109, 167-175.
19. Tipper D. J., Bostian K. A., (1984), *Microbiol. Rev.*, 48, 125-156.
20. Woods D. R., Bevan E. A., (1968), *J. Gen. Microbiol.*, 51, 115-126.
21. Young T. W., (1981), *J. Inst. Brew.*, 87, 292-295.
22. Vondrejs V., Psenicka I., Kupcova L., Dostalova R., Janderova B., Bendova O., (1983), *Folia Microbiol.*, 29, 372-384.
23. Vondrejs V., (1987), *Microbiol. Sciences*, 4, 10, 313-316.

## Attempts to transform the killer factor of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* to amylolytic yeasts *Schwanniomyces occidentalis*

### Summary

The fermentation yeasts *Saccharomyces cerevisiae* capable of producing killer factor type K2 and amylolytic yeasts *Schwanniomyces occidentalis* were used to obtain the somatic hybrids by means of fusion protoplasts according to Fournier.

The obtained hybrids showed amylolytic and fermentation activity. They also were characterized by the ability to form spores and to biosynthesize the killer factor.

Their stability was dependent on the composition of the cultivation medium.

### key words:

fusion of protoplasts, hybrids, killer factor, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis*.

### Adres do korespondencji:

Helena Stobińska, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,  
Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.