

## II. K problematice využití fúze protoplastů pro přípravu nových průmyslových kmenů kvasinek

RNDr. BLANKA JANDEROVÁ, CSc., RNDr. VLADIMÍR VONDREJS, CSc., prof. PhMr. RNDr. OLGA BENDO VÁ, DrSc., přírodovědecká fakulta UK, Praha

**Klíčová slova:** kvasinky, kmen, buňka, indukovaná fúze, genetická manipulace, fúze protoplastů

Rozpracování nových genetických metod, jako jsou indukovaná fúze protoplastů nebo možnost přenosu genů mezi buňkami pomocí vektorů, vyvolalo očekávání nových nebývalých možností při šlechtění průmyslových kmenů kvasinek.

Klasickými genetickými metodami lze získat hybridní kmeny pouze v rámci jednoho druhu a pouze u některých rodů kvasinek. Metoda indukované fúze protoplastů však umožňuje získání hybridů i mezi kmeny kvasinek vzájemně se nekřížících, nebo přípravu hybridů mezidruhových i mezirodových [1, 2, 3]. Možnost přenosu genetické informace mezi různými druhy nebo rody kvasinek je mnohdy právě nutnou podmínkou pro získání nových kmenů s požadovanými vlastnostmi.

Protoplasty byly úspěšně připraveny z buněk celé řady různých rodů a druhů kvasinek [3]. Jejich příprava v principu nepůsobí podstatně potíže. Různé druhy a kmeny kvasinek se však liší svou citlivostí k lytickým enzymům. Například u polyploidních kmenů pivovarských kvasinek vznikají protoplasty pomaleji a jsou fragilnější než u haploidních laboratorních kmenů. Je proto třeba pečlivě volit vhodný typ a dobu působení lytického enzymu a typ a koncentraci osmotického stabilizátoru [6, 7].

Stožitější problém představuje nalezení vhodných podmínek selekce hybridních klonů. Vzhledem k tomu, že hybridní protoplasty a následně buňky vznikají s frekvencí  $10^{-3}$  a nižší, je vhodné zvolit nebo geneticky označit ro-

dičovské kmeny tak, aby byla možná de ekce hybridního klonu ve formě kolonie na agarové půdě. Pro práci s průmyslovými kmeny kvasinek lze využít komplemen ace respirační deficiencie a auxotrofní mutace v hybridní buňce [9, 10, 11] nebo komplementace rozdílných vlastností kmenů — např. odlišných požadavků na růstové faktory nebo rozdílu ve spektru využitelných zdrojů uhlíku [12, 5]. Jako vhodné se ukazují i ty selekční postupy, které využívají citlivosti kmenů k nějakému faktoru, např. antibiotiku nebo killerovému faktoru [13, 14].

Získání hybridního kmene pomocí indukované fúze protoplastů není však zdaleka konečnou fází práce experimentátora. Má-li být nově získaný kmen použit v průmyslovém měřítku, je třeba provést jeho velmi podrobnou charakterizaci, která má odpovědět na celou řadu otázek. První z nich je: **vykazuje hybridní kmen skutečně tu vlastnost, o kterou měl být původní kmen obohacen?** Ve většině případů jsou vzniklé klony identifikovány za pomoci minimálního počtu obecněji použitelných znaků. U získaných klonů je zpravidla až v další fázi pozorován projev nově nabytých vlastností. Zkušenosti ukazují, že v mnoha případech je cíle dosaženo a že klony vykazují i ty vlastnosti, na něž selekce nebyla přímo zaměřena. Jako příklad lze uvést získání hybridů schopných štěpit škrob a dextransy fúzí protoplastů *Saccharomyces cerevisiae* (nebo *Saccharomyces uvarum*) a *Saccharomyces diastaticus* (donor vlastnosti). Tyto hybridy byly získány jak v případech,



kdy byly selektovány přímo klony rostoucí na agarové půdě se škrobem [12, 15], tak tehdy, kdy byla selekce zaměřena na jiné znaky [11, 16]. V řadě případů však prokazatelně hybridní klony nevykazují některé sledované vlastnosti, které by teoreticky měly mít. Příčin může být několik: v nejjednodušším případě představují hybridní klony tzv. cybridy. Toto označení bylo zavedeno jako analogie s označením stejných typů hybridů, získaných v myších buněčných liniích [17]. Cybridní klony obsahují cytoplasmu obou rodičovských kmenů, ale jádro pouze jednoho kmene. Neprojeví se tedy u nich jaderně determinované znaky jednoho z rodičovských kmenů. Mohou být zachyceny po fúzi protoplastů zejména tehdy, je-li selekce vedena přes znaky cytoplasmaticky determinované. Pro přenos takto děděných vlastností však mohou postačovat a někdy jsou cybridní klony selektovány přímo záměrně. Jde např. o získávání kmenů schopných produkovat kilerový faktor, protein usmrcující kvasinky, které jsou k němu citlivé. Tato schopnost udílí kvasinkám možnost vlastní obrany proti kontaminantům kvasného procesu a je geneticky determinována cytoplasmaticky lokalizovanou dvouvláknovou RNA nebo DNA [18]. Indukovanou fúzi protoplastů byly už získány hybridní kmeny pivovarských a vinařských kvasinek produkujících kilerový faktor, přičemž v některých případech jde zřejmě o kmeny cybridní [4, 19, 20].

Další situací, která může být zaznamenána po indukované fúzi protoplastů, je vznik produktů, obsahujících pravděpodobně jen část genetické informace splyvajících jader. Experimentátor je vždy značně limitován ve svých možnostech prokázat, zda hybridní buňky obsahují kompletní genetickou výstavbu obou rodičovských buněk, neboť může sledovat vždy jen omezený počet znaků. Přes toto omezení lze říci, že některé hybridní klony odpovídají takovým neúplným hybridům. Tyto hybridní produkty zřejmě častěji vznikají při fúzích na větší vzdálenosti, tedy zvláště mezirodových. Při fúzích za účasti kvasinkových rodů tvořících myceliální formy jsou zpravidla vzniklé hybridy heterokaryotní, tzn. že bezprostředně po fúzi buněk nesplývají jádra [21, 22, 23]. Další kultivací hybridů může dojít ke vzniku potomstva cybridního — došlo-li k přechodu pouze 1 jádra do dceřiné buňky [24] nebo ke vzniku jednojaderných buněk obsahujících část genomu druhého jádra — došlo-li k tzv. částečné hybridizaci [21, 23]. Ale i při fúzích jiných rodů kvasinek byly zaznamenány tyto typy hybridů. Genetická analýza mezirodových hybridů mezi laboratorními auxotrofními kmeny *Saccharomyces diastaticus* a *Schizosaccharomyces pombe* prokázala, že některé hybridní kmeny obsahují jaderný genom *Saccharomyces diastaticus* s jedním chromozomem *Schizosaccharomyces pombe* [25]. Podobně u hybridů mezi *Kluyveromyces lactis* a *Yarrowia lipolytica* ukázala analýza obsahu DNA, že DNA *Kluyveromyces lactis* tvoří jen asi 14 % obsahu DNA v hybridních klonech místo teoretických 50 % [8]. Hybridy, přestože prototrofní, vzniklé fúzí auxotrofů, vykazují jen část dalších sledovaných schopností *Kluyveromyces lactis*. Obdobný vznik neúplných hybridů byl zaznamenán i v jednodušším případě při fúzi v rámci rodu *Saccharomyces* [10].

Ani úplné smísení genomů obou fúzovaných kmenů však nemusí být dostačující podmínkou projevu všech sledovaných vlastností. Geny přítomné v hybridních klonech nemusí být vždy exprimovány. Je třeba si uvědomit, že v nově konstituované hybridní buňce vznikají nové vztahy mezi různými metabolickými systémy. Bez velmi podrobné znalosti řady regulačních systémů nelze prakticky výsledky jejich interakce předpovídat. Experimentálně lze rozlišit, zda gen není přítomen nebo není pouze exprimován pomocí hybridizační Southernovy techniky [26]. Jde však o náročnou techniku, kterou lze v současnosti použít jen v některých případech. Nově utvořená genetická sestava v hybridních buňkách však může vést i k pozitivním efektům. Tento teoretický předpoklad potvrzuje např. experiment, v němž byly indukovanou fúzí protoplastů získány hybridy výrazně lépe využívající škrob než jeden rodičovský kmen — *Saccharomyces diastaticus*, přestože druhý kmen *Hansenula capsularis* využívá škrob jen slabě [27]. Genetická informace přítomná v hybridních buňkách nemusí být vyjádřena zvláště tehdy, jde-li o geny pocházející z taxonomicky vzdálené kvasinky. Transkripční a translační aparáty obou rodičovských kmenů pak mohou být

natolik rozdílné, že příslušné signální sekvence DNA či mRNA partnerského kmene nemusejí být správně rozpoznávány.

Podrobná charakterizace hybridního klonu musí dát odpověď i na další otázky: **nedošlo jako následek fúze ke ztrátě nebo potlačení některých vlastností původního kmene** — jinými slovy: zůstaly zachovány vyhovující charakteristiky průmyslového kmene? A naopak — **nezískal hybridní kmen nějaké nežádoucí vlastnosti pocházející od donorového rodičovského kmene?** Ať už indukovanou fúzí protoplastů vznikly produkty obsahující celé či jen části genetických informací rodičovských kmenů, je zřejmé, že s velkou pravděpodobností mohou být ovlivněny nejrozmanitější vlastnosti kvasinkové buňky. Ukazuje se např., že hybridní produkty rostou pomaleji než původní rodičovské druhy, což by při průmyslovém použití zpravidla znamenalo prodloužení výrobního procesu a zvýšení výrobních nákladů [8, 11]. Příkladem projevu nepříznivé vlastnosti v hybridních klonech může být produkce 4-vinylyguajacolu, látky, která způsobuje nepříjemné ovocné aroma piva. Gen determinující příslušný enzym získaly hybridy současně s genem pro produkci glukaoamylasy při indukované fúzi protoplastů pivovarských kvasinek s druhem *Saccharomyces diastaticus* [28]. Získaný hybridní kmen musí být proto velmi podrobně testován za laboratorních i provozních podmínek a pak vybrány ty klony, které nevhodné vlastnosti nevykazují. Minimální změny nežádoucího charakteru by se měly projevovat u těch hybridů, které budou obsahovat co nejmenší množství genů či chromozómů z donorového kmene. Pokud se nepodaří získat aneuploidní klony víceméně spontánní cestou, lze uměle indukovat ztráty některých chromozómů pomocí haploidizačních činidel, jako jsou benomyl, p-fluorofenylalanin nebo akriflavin [29, 30]. U hybridů vzniklých po fúzi rozdílně auxotrofních mutantů *Saccharomycopsis lipolytica* působení benomylu vedlo k přednostním ztrátám chromozómů pocházejících z těchto rodičovského jádra [31]. Haploidizační činidla tedy poskytují možnost eliminovat z hybridních kmenů chromozóm nesoucí nežádoucí gen. V optimálním případě by možná mohla být hybridní buňka zbavena většího počtu těch chromozómů, které pocházejí z donorového kmene, nenesou geny determinující požadované vlastnosti a představují tak zbytečný nebo i zatěžující komponent vzniklé di- nebo polyploidní buňky.

Mají-li být získané nové kmeny používány k výrobě, musí být nezbytně stabilní, tzn. udržet své nově získané vlastnosti po dlouhou řadu generací, popř. i za různých kultivačních podmínek. Prakticky ve všech případech, kde byla sledována stabilita znaků, na něž byla prováděna selekce, bylo však zjištěno, že primární produkty indukované fúze protoplastů jsou nestabilní. Zvláště výrazně se nestabilita projevuje u mezirodových hybridů. Při kultivaci hybridů docházelo k segregaci na původní rodičovské typy (zpravidla auxotrofní), ale vznikaly i různé intermediární formy [21, 32, 31]. Šlo-li o morfologicky odlišné rodičovské typy, pak se pasážováním zvyšovala morfologická podobnost s jedním či druhým rodičem [5, 31]. Po kultivaci hybridů vzniklých fúzí polyploidních a haploidních protoplastů byly zjišťovány subklony vykazující nižší než předpokládaný stupeň ploidie [9, 10]. Kultivace hybridů v prostředí, v němž nemusí být nově nabytá vlastnost využívána, může rovněž vést k její ztrátě — např. hybridní kmeny mezi pivovarskou *Saccharomyces uvarum* a *Schwanniomyces occidentalis* ztrácely schopnost produkovat glukaoamylasu při kultivaci v mladině [33]. V současné době se postupuje tak, že primární produkty fúze jsou po několika generacích pasážovány na pevném či v tekutém médiu pod selekčním tlakem, za kterého byly izolovány. Takto získané izoláty jsou stabilní i při kultivaci za neselektivních podmínek [10].

Podrobněji sledoval vývoj hybridů mezi *Saccharomyces diastaticus* a *Hansenula capsularis* při dlouhodobé kultivaci na médiích s různým zdrojem uhlíku Spencer *et al.* [27]. Ukázalo se, že různé kultivační podmínky vedly k různým změnám vlastností hybridů. Tento experiment naznačuje, že vlastnosti hybridů by bylo možno formovat různými směry. Teprve další experimenty mohou ukázat, zda lze záměrnou volbou kultivačních podmínek směřovat změny hybridních kmenů k žádoucím vlastnostem, popř. spojit se ztrátou vlastností nežádoucích.



## Literatura

- [1] PEBERDY, J. F.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 1979, s. 21.
- [2] FERENCZY, L.: *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **31**, 1981, s. 1.
- [3] FREEMAN, R. F., PEBERDY, J. F.: *Yeast Genetics* (Spencer, J. F. T., Spencer, D. M., Smith, A. R. W., Eds.), Springer — Verlag, Berlin, 1983.
- [4] RÖCKEN, W.: *Msch. Brauwiss.*, **9**, 1984, s. 384.
- [5] CARRAU, J. L., DE AZEVEDO, J. L., SUDBERY, P., CAMPBELL, D.: *Rev. Brasil. Genet.*, **V**, 1982, s. 221.
- [6] WETTSTEIN, D.: *EBC, Proc. 17th Congress, Berlin (West)*, 1979, s. 587.
- [7] JANDEROVÁ, B., GUINOVA-STOJANOVA, T., JANATOVÁ, I.: *Xth Internat. Specialized Symposium on Yeast, Varna, 1985, Abstracts book*, s. 95.
- [8] GROVES, D. P., OLIVER, S. G.: *Curr. Genet.*, **8**, 1984, s. 49.
- [9] STEWART, G. G.: *Canad. J. Microbiol.*, **27**, 1981, s. 973.
- [10] HALFMANN, H. J., EMEIS, G. C., ZIMMERMANN, U.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **20**, 1983, s. 13.
- [11] JANDEROVÁ, B., DAVAASURENGIJN, T., BENDOVÁ, O.: *Folia Microbiol.*, **31**, 1986, s. 339.
- [12] HOCKNEY, R. C., FREEMAN, R. F.: *Proc. 5th Internat. Protoplast Symp. Szeged*, 1979, s. 139.
- [13] SPENCER, J. F. T., LAND, P., SPENCER, D. M.: *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 1980, s. 651.
- [14] VONDREJS, V., PŠENIČKA, I., KUPCOVÁ, L., DOSTÁLOVÁ, R., JANDEROVÁ, B., BENDOVÁ, O.: *Folia biologica*, **29**, 1983, s. 372.
- [15] DE FIGUEROA, L. I., DE RICHARD, M. S., DE VAN BROOCK, M. R.: *Biotechnol. Lett.*, **6**, 1984, s. 269.
- [16] SPENCER, J. F. T., LAUD, P., SPENCER, D. M.: *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 1980, s. 651.
- [17] GOODEY, A. R., BEVAN, E. A.: *Curr. Genet.*, **7**, 1983, s. 69.
- [18] TIPPER, D. J., BOSTIAN, K. A.: *Microbiol. Rev.*, **48**, 1984, s. 125.
- [19] BENDOVÁ, O., KUPCOVÁ, L., JANDEROVÁ, B., VONDREJS, V., VERNEROVÁ, V.: *Msch. Brauwiss.*, **36**, 1983, s. 167.
- [20] SEKI, T., CHOI, E. H., RYU, D.: *Vith Internat. Symposium on Yeasts, Montpellier, 1984, s. XII-3-P*.
- [21] FOURNIER, P., PROVOST, A., BOURGUIGNON, C., HESLOT, H.: *Arch. Microbiol.*, **115**, 1977, s. 143.
- [22] FERENCZY, L.: *Advances in Protoplast Research* (Ferenczy, L. and Farkas, G. L., Eds.), Akadémia Kiadó, Budapest, Pergamon Press, Oxford, 1980, s. 55.
- [23] SARACHEK, A., WEBER, D. A.: *Curr. Genet.*, **8**, 1984, s. 181.
- [24] DE RICHARD, M. S., DE VAN BROOCK, M. R.: *Curr. Microbiol.*, **10**, 1984, s. 117.
- [25] TAMAKI, H.: *Molec. Gen. Genet.*, **187**, 1982, s. 177.
- [26] SOUTHERN, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 1975, s. 503.
- [27] SPENCER, J. F. T., SPENCER, D. M., WHITTINGTON-VAUGHAN, P., MILLER, R.: *Curr. Genet.*, **7**, 1983, s. 159.
- [28] STEWART, G. G., PANCHAL, C. J., RUSSELL, I.: *J. Inst. Brew.*, **89**, 1983, s. 170.
- [29] MORTIMER, R. K., SCHILD, D.: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broack, J. R., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, s. 11.
- [30] KLINNER, U., BÖTCHER, F.: *Zeitschr. Allg. Mikrobiol.*, **24**, 1984, s. 533.
- [31] WEBER, H., SPATA, L.: *Current Developments in Yeast Research, Advances in Biotechnology, Proc. Vth Internat. Symp. London, 1980, s. 213*.
- [32] SIFICZKI, M.: *Curr. Microbiol.*, **3**, 1979, s. 37.
- [33] DE VAN SPIEGLE, K., ISERENTANT, D.: *Vith Internat. Symposium on Yeasts, Montpellier, 1984, s. IX-4-P*.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

**Jandarová, B. - Vondrejs, V. - Bendová, O.: Genetické manipulace kvasinkovou buňkou. II. K problematice využití fáze protoplastů pro přípravu nových průmyslových kmenů kvasinek.** *Kvas. prům.* **33**, 1987, č. 12, s. 365—367.

Článek ukazuje, kterých výsledků bylo dosud dosaženo při využití metody indukované fáze protoplastů pro přípravu nových kmenů kvasinek, které problémy se v této oblasti výzkumu objevují, popř. jaké jsou možnosti jejich řešení.

**Яндерова, Б. - Вондрейс, В. - Бендова, О.: Генетические манипуляции дрожжевой клеткой. II. К проблематике использования слияния протопластов для получения новых промышленных штаммов дрожжей.** *Квас. прум.* **33**, 1987, № 12, стр. 365—367.

Статья показывает, какие результаты были достигнуты при использовании метода индуцированного слияния протопластов для получения новых штаммов дрожжей, далее какие проблемы в этой области исследования появляются и какие имеются возможности их решения.

**Jandarová, B. - Vondrejs, V. - Bendová, O.: Genetic Manipulation with Yeast Cell. II. Application of Protoplast Fusion for New Industrial Yeast Strain Preparations.** *Kvas. prům.* **33**, 1987, No. 12, pp. 365—367.

The results obtained by the use of induced protoplast fusion for new industrial strain preparations together with problems and their possible solutions are discussed in the article.

**Jandarová, B. - Vondrejs, V. - Bendová, O.: Genetische Manipulationen der Hefezelle. II. Zur Problematik der Ausnützung der Protoplastenfusion zur Aufbereitung neuer industrieller Hefestämme.** *Kvas. prům.* **33**, 1987, Nr. 12, S. 365—367.

Der Artikel erörtert die bisher erzielten Ergebnisse bei der Applikation der Methode der induzierten Protoplastenfusion zur Aufbereitung neuer Hefestämme. Weiter werden die Probleme diskutiert, die auf diesem Forschungsgebiet auftauchen, sowie auch ihre Lösungsmöglichkeiten.