

ALEKSANDRA WAWRO¹, ADAM RZESZUTEK², ŻANETA BARTKOWIAK²,
DOMINIKA PIEPRZYK-KOKOCHA¹, WŁODZIMIERZ GRAJEK²

¹Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OPTIMALIZACJA MUTAGENIZACJI CHEMICZNEJ DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Z UŻYCIEM METANOSULFONIANU ETYLU (EMS)*

OPTIMIZATION OF CHEMICAL MUTAGENESIS
OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
USING ETHYL METHANESULFONATE (EMS)

Streszczenie. W pracy podjęto próbę optymalizacji metody mutagenizacji chemicznej drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae* z użyciem czynnika alkilującego – metanosulfonianu etylu (EMS). Przeprowadzono kilka rund mutagenizacji. Za zmienne przyjęto stężenie mutagenu oraz czas ekspozycji na czynnik mutujący. Optymalne warunki zapewniające wymaganą śmiertelność komórek drożdży osiągnięto w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu komórek po podaniu mutagenu w stężeniu 114,5–137,4 mg/cm³, przy czasie ekspozycji 60 min. W rezultacie otrzymano kilkadziesiąt mutantów drożdży. Na podstawie testów fermentacyjnych wybrano spośród nich pięć wykazujących większą produktywność objętościową etanolu niż szczep wyjściowy. Uzyskane mutanty poddano skringowi pod kątem ich oporności na kwas octowy. Stwierdzono, że zmutowane komórki drożdży wykazały dwa razy większą oporność na kwas niż szczep wyjściowy.

Słowa kluczowe: drożdże, *Saccharomyces cerevisiae*, mutagenizacja chemiczna, EMS, produktywność objętościowa etanolu (Pv)

*Badania zrealizowano w ramach projektu Programu Badań Stosowanych 1/A8/9/2012: „Opracowanie innowacyjnej technologii produkcji bioetanolu II generacji z biomasy sorgo (*Sorghum* sp.) i miskanta (*Miscanthus* sp.)”.

Wstęp

Dynamiczny postęp mikrobiologii przemysłowej oraz wzrost znaczenia mikroorganizmów jako producentów związków ważnych dla przemysłu doprowadziły do rozwoju technik ulepszania dotychczas wykorzystywanych szczepów drobnoustrojów. Doskonalenie pożądanych cech mikroorganizmów jest ważne, ponieważ procesy biotechnologiczne prowadzone z wykorzystaniem dzikich szczepów wyizolowanych ze środowiska naturalnego na ogół przebiegają z wydajnością niewystarczającą, aby ich użycie na skalę przemysłową było ekonomicznie opłacalne. Dla maksymalnego wykorzystania potencjału biotechnologicznego drobnoustrojów stosuje się modyfikację genotypu w celu uzyskania nowych szczepów przemysłowych posiadających takie pożądane cechy, jak zwiększona produktywność oraz oporności na stropy środowiskowe wywołane wyższą temperaturą bądź obecnością toksyn. Modyfikację genotypu szczepu macierzystego prowadzi się na drodze mutagenyzy indukowanej *in vivo* z wykorzystaniem różnych czynników wywołujących określone, trwałe zmiany w genomowym DNA.

W ostatnich latach zauważalny jest wzrost znaczenia konwersji biomasy do bioetanolu, będącego paliwem alternatywnym wobec paliw kopalnych. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są wykorzystywane na dużą skalę w powyższym procesie ze względu na dobre przystosowanie do warunków przemysłowych oraz wysoką wydajność procesu fermentacji surowców będących podstawowym źródłem skrobi w gorzelnictwie (kukurydza, ziemniaki). Obecnie w celu wykorzystania tańszego surowca, a przez to zwiększenia opłacalności ekonomicznej produkcji, rozwój prac nad technologią wytwarzania bioetanolu jest skupiony m.in. na przemianie ksylozy w etanol w procesie fermentacji, na wykorzystaniu celulaz do hydrolizy materiałów lignocelulozowych oraz na równoczesnej fermentacji etanolowej wraz z hydrolizą enzymatyczną (Lin i Tanaka, 2006). Podstawową przeszkodą w produkcji bioetanolu metodą jednoczesnej hydrolizy i fermentacji jest różnica pomiędzy optimum temperaturowym działania enzymów (45–50°C) a optymalną temperaturą fermentacji drożdży (35–37°C). Rozbieżność temperatur tych dwóch procesów, a także toksyny powstające w czasie hydrolizy biomasy roślinnej (kwas octowy, furfural i jego pochodne) uniemożliwiają jednoczesne ich przeprowadzenie z wykorzystaniem szczepów obecnie używanych w przemyśle (Ballesteros i in., 2004; Jeffries i in., 2000; Jeffries i Shi, 1999). W celu wykonania opłacalnej, jednoczesnej hydrolizy i fermentacji biomasy przez drożdże należałoby uzyskać taki szczep, który cechowałaby dobra wydajność produkcji alkoholu etylowego w powyższych warunkach. Najbardziej odpowiednią metodą do realizacji tego zamierzenia wydaje się mutagenizacja chemiczna komórek drożdżowych *in vivo*.

W niniejszej pracy drożdże *Saccharomyces cerevisiae* szczepu Ethanol Red zostały poddane procesowi mutagenizacji chemicznej metanosulfonianem etylu (EMS). Powoduje on przypadkowe, punktowe mutacje poprzez substytucję nukleotydu w łańcuchu DNA (szczególnie w wyniku alkilacji guaniny). Jest to jeden z najczęściej stosowanych związków alkilujących. W literaturze spotkać można wiele doniesień o efektywnym działaniu EMS podczas procesu mutagenizacji chemicznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Balakumar i in., 2001; Haq i in., 2010; Hou, 2010), stąd też ten właśnie związek wytypowano jako skuteczny czynnik mutageny pozwalający na otrzymanie

zmutowanych komórek drożdży. Uzyskane szczepy poddano testom fermentacyjnym w celu określenia ich wydajności produkcji etanolu w stosunku do szczepu wyjściowego.

Material i metody

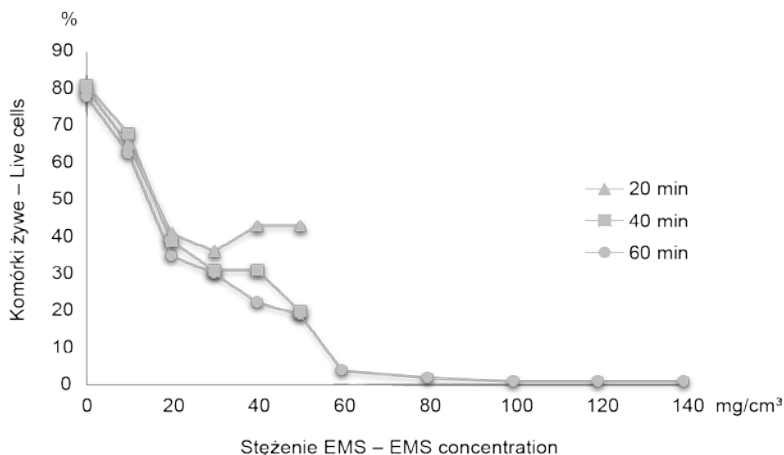
Materiał do badań stanowiły drożdże *Saccharomyces cerevisiae* francuskiej rasy Ethanol Red (ER) firmy Lesaffre. Mikroorganizm przechowywano na pożywce YPD z dodatkiem 2-procentowego (w/v) agaru-agaru w temperaturze 4–8°C. Mutagenizację chemiczną wykonano czynnikiem mutagennym EMS (Sigma-Aldrich). Hodowle drożdży ER prowadzono na płynnej pożywce YPD (1-procentowy ekstrakt drożdżowy, 2-procentowy pepton, 2-procentowa glukoza) w kolbach Erlenmeyera w temperaturze 30°C przez 16 h. Komórki będące w fazie logarytmicznego wzrostu (1×10^8 jtk/cm³) wirowano, dwukrotnie przemywano wodą destylowaną, a w dalszej kolejności osad komórek zawieszano w 0,05-molowym buforze fosforanowym (pH 7,0). Następnie dodawano EMS w stężeniu 11,5–137,4 mg/cm³ i przeprowadzono mutagenizację w czasie 20–60 min, w temperaturze 30°C, w termomikserze (Eppendorf) przy ciągłym mieszaniu z szybkością 350 obr/min. W następnej kolejności dodano 5-procentowy roztwór tiosiarczanu sodu w ilości pozwalającej na zatrzymanie procesu mutagenizacji i ponownie dwukrotnie przemywano komórki wodą destylowaną. Przeżywalność komórek drożdży określano pod mikroskopem po przyżyciowym ich wybarwieniu błękitem metylenowym. Pozwoliło to na wybór dawki EMS optymalnej dla zmniejszenia przeżywalności komórek do poziomu około 1–3%. Powstałe mutanty przechowywano w 20-procentowym glicerolu w temperaturze –20°C.

W celu scharakteryzowania powstałych mutantów poddano je skringowi w testach fermentacyjnych, w których kryterium wyboru stanowiła produktywność objętościowa etanolu (Pv), wyrażana w gramach na 1 dm³ w czasie 24 h, oraz oporność na kwas octowy. Testy fermentacyjne oceniające aktywność fermentacyjną drożdży prowadzono w pożywkach YFM (skład i objętość: glukoza – 300 g/dm³, ekstrakt drożdżowy – 3 g/dm³, KH₂PO₄ – 1 g/dm³, (NH)₂SO₄ – 3 g/dm³, MgSO₄ · 7H₂O – 0,5 g/dm³, MnSO₄ · 7H₂O – 0,1 g/dm³, ZnSO₄ · 7H₂O – 0,1 g/dm³) w kolbach Erlenmeyera w temperaturze 38°C przez 24 h. Testy skringowe na oporność drożdży na toksyczne działanie kwasu octowego prowadzono w pożywce YFM zmodyfikowanej dodatkiem kwasu octowego w stężeniu 0,05%, 0,1%, 0,15% oraz 0,2% (v/v). Produktywność objętościową etanolu (Pv) oznaczano za pomocą chromatografii gazowej (GC), stosując chromatograf Agilent Technologies, wyposażony w kolumnę Phenomen 7HG-G013-11 (30 m × 250 μm × 0,25 μm) i detektor FID. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie wyników badań wykazano, że stężenie mutagenu w zakresie od 11,5 do 57,3 mg/cm³, przy zastosowanym czasie ekspozycji na EMS (20, 40 i 60 min), było niewystarczające do skutecznej mutagenizacji chemicznej drożdży. Wraz ze wzrostem stężenia mutagenu zmniejszała się proporcjonalnie liczebność żywych komórek, jednak

nie była ona mniejsza niż 40%. W przypadku wszystkich trzech czasów ekspozycji przy stężeniu EMS równym 22,9 mg/cm³ zaobserwowano prawie identyczny spadek żywotności komórek, co sugerować mogło, że zdecydowanie większy wpływ na zmianę przeżywalności mikroorganizmów miało stężenie mutagenu niż czas trwania mutagenizacji. W dalszych badaniach, przy stężeniu EMS wynoszącym 57,3 mg/cm³, zależność ta nie była tak jednoznaczna, dlatego w ostateczności wybrano 60-minutowy czas trwania mutagenizacji. Jak się okazało, wytypowane na początku badań, na podstawie literatury, stężenie mutagenu w zakresie do 57,3 mg/cm³ było niewystarczające, stąd też zwiększono je do takiego, by odpowiednia śmiertelność została osiągnięta. Optymalny efekt letalny drożdży, wynoszący około 99%, uzyskano dopiero po zastosowaniu stężenia EMS na poziomie 114,5–137,4 mg/cm³. Na rysunku 1 przedstawiono przeżywalność komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako funkcję stężenia EMS i czasu ekspozycji na mutagen.

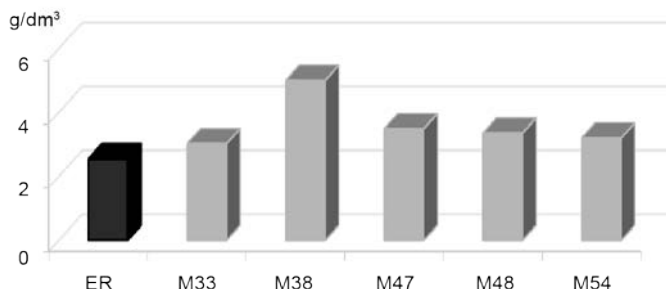


Rys. 1. Przeżywalność komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* podczas ekspozycji na EMS

Fig. 1. Viability of the yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to EMS

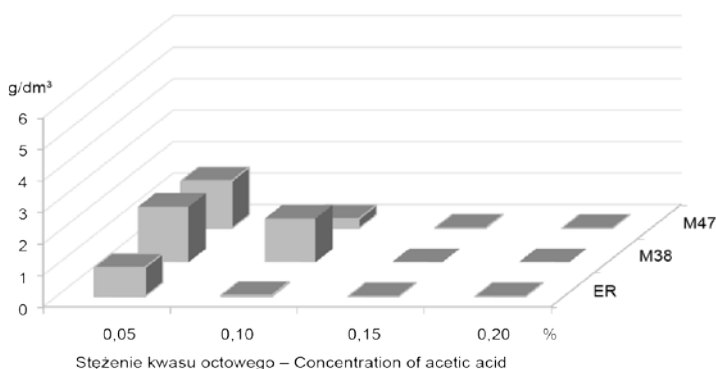
Przeprowadzono kilka rund mutagenizacji chemicznej drożdży gorzelnicznych metanosulfonaniem etylu, w wyniku których uzyskano ponad 60 mutantów. Wszystkie otrzymane mutanty poddano testom skringowym pod kątem produktywności objętościowej etanolu. W wyniku tego postępowania wyselekcjonowano pięć mutantów wykazujących dwa razy większą produktywność objętościową etanolu niż szczep wyjściowy. Produktywność objętościowa etanolu szczepu wyjściowego ER wynosiła 2,56 g/dm³ w czasie 24 h, natomiast produktywność najlepszego spośród uzyskanych mutantów – ponad 5 g/dm³ w czasie 24 h (rys. 2).

Z mutantów wyselekcjonowanych w pierwszym etapie badań skringowych wytypowano dwa szczepy, oznaczone jako M38 i M47, które poddano kolejnej procedurze skringowej. Jej celem było wyłonienie mutantu odpornego na kwas octowy. Wybrano cztery stężenia kwasu octowego: 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2% (v/v) (rys. 3).



Rys. 2. Produktywność objętościowa etanolu zmutowanych szczepów w czasie 24 h (ER – szczep wyjściowy)

Fig. 2. Volumetric ethanol productivity of the mutant strains during 24 h (ER – starting strain)



Rys. 3. Produktywność objętościowa etanolu zmutowanych szczepów w czasie 24 h w obecności kwasu octowego (ER – szczep wyjściowy)

Fig. 3. Volumetric ethanol productivity of the mutant strains during 24 h in the presence of acetic acid (ER – starting strain)

Stwierdzono, że ani szczep dziki, ani mutanty nie były hamowane przez stężenie kwasu octowego w zakresie 0,05–0,1% (v/v), natomiast zaobserwowano wyraźne hamowanie produkcji etanolu w pożywkach zawierających 0,15–0,2% (v/v) kwasu octowego. Mimo tego zauważono, że oba mutanty charakteryzowały się dwa razy większą produktywnością etanolu niż szczep rodzicielski. Zaobserwowano także, że mutant M38, przy 0,1-procentowym (v/v) stężeniu kwasu octowego, wykazywał nawet cztery razy większą produktywność etanolu niż mutant M47.

W piśmiennictwie naukowym można znaleźć wiele prac poświęconych mutagenizacji chemicznej *Saccharomyces cerevisiae*, których celem było zwiększenie aktywności fermentacyjnej, jak również wzrost odporności mikroorganizmów na toksyczne działanie kwasu octowego. Ważną kwestią stanowi dobór odpowiedniej dawki mutagenu. Zetterberg (1978), opisując mechanizm efektu letalnego po przeprowadzonym procesie mutagenizacji *Saccharomyces cerevisiae*, stwierdził, że o mutantach można mówić

wtedy, kiedy śmiertelność komórek mieści się w granicach 95–99%. Hou (2010) w swoich badaniach stosował dawkę mutagenu na poziomie 4% (v/v) i w wyniku tej ekspozycji śmiertelność komórek wyniosła około 99%. Badacz uznał ten próg za odpowiedni do otrzymania zmutowanych komórek i uzyskał mutanty cechujące się zwiększoną o blisko 10% w stosunku do szczepu wyjściowego produkcją etanolu. Liu i in. (2011) prowadzili prace w celu otrzymania szczepu charakteryzującego się większą tolerancją na etanol oraz wysokie ciśnienie osmotyczne. Do mutagenizacji użyli metanosulfonianu etylu (EMS) w stężeniu około 4%, które doprowadziło do efektu letalnego wynoszącego ponad 88%.

Mobini-Dehkordi i in. (2008) w swoich badaniach zastosowali dawkę mutagenu EMS na poziomie 57,3 mg/cm³, a końcowa objętość EMS wyniosła około 3% (v/v). Uzyskali oni mutanty produkujące o niecałe 20% większą ilość etanolu niż szczepy dzikie i odznaczające się zwiększoną tolerancją na duże stężenia etanolu. Podobne badania prowadzili Thammasittirong i in. (2013) – oni również uzyskali produkcję etanolu przez wyselekcjonowane mutanty zwiększoną o blisko 20% w porównaniu ze szczepem rodzicielskim. Inni badacze, Hemmati i in. (2012), podczas mutagenizacji chemicznej drożdży stosowali EMS o stężeniu 8% (w/v) i uzyskali mutanty produkujące etanol o wydajności większej niż szczep wyjściowy o blisko 20%.

Limtong i in. (2000) prowadzili badania na dwóch stężeniach kwasu octowego: 0,5% oraz 1% (v/v). W temperaturze pokojowej 1-procentowe (v/v) stężenie kwasu octowego wpływało inhibitująco na wszystkie szczepy *Saccharomyces cerevisiae*. Stężenie kwasu na poziomie 0,5% (v/v) zmniejszyło przeżywalność drożdży, ale nie miało wpływu na maksymalne stężenie etanolu.

Znany jest fakt synergizmu stresu cieplnego i kwasowego, objawiający się tym, że przy takim samym pH, ale przy wzrastającej temperaturze, rośnie śmiertelność komórek i odwrotnie. Występuje zatem zasada pełnej synergii. Lu i in. (2012) badali wpływ stężenia kwasu octowego w różnych temperaturach na przyrost komórek drożdży. Badacze ci stwierdzili, że stężenie kwasu octowego na poziomie 0,1, 0,2 oraz 0,3% (v/v) w temperaturze 37°C nie wpłynęło na wzrost komórek oraz na zawartości etanolu w brzeczce fermentacyjnej. Podwyższenie temperatury fermentacji do 40°C przy 0,5-procentowym stężeniu kwasu octowego wpłynęło inhibitująco na wzrost komórek. Badacze ci uzyskali szczep rekombinowany, który w temperaturze 30°C tolerował 0,8-procentowe (v/v) stężenie kwasu octowego.

Wnioski

Optymalizacja metody mutagenizacji chemicznej z użyciem metanosulfonianu etylu (EMS) pozwoliła na otrzymanie kilkudziesięciu mutantów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które charakteryzowały się bardzo dobrą produktywnością objętościową etanolu, znacznie przewyższającą produktywność szczepu wyjściowego. Wybrano dwa najlepsze mutanty, które poddano skринingowi na odporność na kwas octowy. Stwierdzono, że zmutowane komórki charakteryzowały się dwa razy większą produktywnością etanolu niż szczep wyjściowy. Wykazano, że mutant M38 był zdolny do produkcji zwiększonych ilości etanolu w obecności 0,1-procentowego (v/v) kwasu octowego.

Literatura

- Balakumar, S., Arasaratnam, V., Balasubramaniam, K. (2001). Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 739–746.
- Ballesteros, M., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.*, 39, 1843–1848.
- Haq, I., Hussain, M., Ali, S., Javed, M. M., Qadeer, M. A. (2010). Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* gcu-36 through induced mutagenesis for l-phenylacetylcarbinol production. *Pak. J. Sci.*, 62, 3–11.
- Hemmati, N., Lightfoot, D. A., Fakhoury, A. (2012). A mutated yeast strain with enhanced ethanol production efficiency and stress tolerance. *Atlas J. Biol.*, 2, 2, 100–115.
- Hou, L. (2009). Novel methods of genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 31, 671–677.
- Hou, L. (2010). Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, 1084–1093.
- Jeffries, T. W., Jin, Y. S. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, 47, 221–268.
- Jeffries, T. W., Shi, N. Q. (1999). Genetic engineering for improved xylose fermentation of yeasts. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 65, 117–161.
- Limtong, S., Sumpradit, T., Kitpreechavanich, V., Tuntirungkij, M., Seki, T., Yoshida, T. (2000). Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Kasetsart J. Nat. Sci.*, 34, 64–73.
- Lin, Y., Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 627–642.
- Liu, J. J., Ding, W. T., Zhang, G. Ch., Wang, J. Y. (2011). Improving ethanol fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* in very high-gravity fermentation through chemical mutagenesis and meiotic recombination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 1239–1246.
- Lu, Y., Cheng, Y. F., He, X. P., Guo, X. N., Zhang, B. R. (2012). Improvement of robustness and ethanol production of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* under co-stress of heat and inhibitors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 73–80.
- Mobini-Dehkordi, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Ghaedi, K., Tavassoli, M., Akada, R. (2008). Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *J. Biosci. Bioeng.*, 105, 4, 403–408.
- Thammasittirong, S. N.-R., Thirasaktana, T., Thammasittirong, A., Srisodsuk, M. (2013). Improvement of ethanol production by ethanol – tolerant *Saccharomyces cerevisiae* UVNR56. *SpringerPlus*, 2, 583.
- Zetterberg, G. (1978). Mechanism of the lethal and mutagenic effects of phenoxyacetic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 60, 291–300.

OPTIMIZATION OF CHEMICAL MUTAGENESIS OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* USING ETHYL METHANESULFONATE (EMS)

Summary. This paper attempts to optimize the methods of chemical mutagenesis of distillers yeast *Saccharomyces cerevisiae* using an alkylating agent ethyl methanesulfonate (EMS). Several rounds of mutagenesis were carried out, mutagen concentration and duration of exposure were adopted as variables. Optimal conditions required to ensure the death of the yeast cells were achieved during the log phase of cell, at concentration of mutagen 114.5–137.4 mg/cm³ and during the mutagenesis duration exposure time 60 min. As a result, several tens of yeast mutants were obtained. Based on testing of fermentation were selected five mutants characterized by a higher volumetric ethanol productivity than the starting strain. The obtained mutants were subjected to the screening test for their resistance to acetic acid. It was found that the mutants showed two times higher resistance to acetic acid than the starting strain.

Key words: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, chemical mutagenesis, EMS, the volumetric ethanol productivity (Pv)

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Aleksandra Wawro, Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 71 B, 60-630 Poznań, Poland, e-mail: aleksandra.wawro@iwnirz.pl

Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:

23.02.2015

Do cytowania – For citation:

Wawro, A., Rzeszutek, A., Bartkowiak, Ż., Pieprzyk-Kokocha, D., Grajek, W. (2015). Optymalizacja mutagenizacji chemicznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z użyciem metanosulfonianu etylu (EMS). *Nauka Przyr. Technol.*, 9, 3, #34. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.3.34