

Aleksandra Wawro\*

Department of Innovative Biomaterials and Nanotechnologies,  
Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants, Poznan

Submitted in May, accepted in July 2018

1. Introduction. 2. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Yeast genome. 2.2. Role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the bioethanol production. 3. Pathways of genetic improvement. 4. Methods of genetic improvement. 5. Genome shuffling. 5.1. Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains by genome shuffling method. 6. Conclusion

**Abstract:** Modern technologies of bioethanol production require distillery yeast characterized by thermotolerance, osmotolerance and increased resistance to secondary metabolites. To date, no strains have been observed in nature which possess all of the above-mentioned characteristics. For many years, intensive research has been carried out to improve the technological properties of industrial strains. A number of methods have been developed to allow genetic improvement of distillery yeasts. One of the most promising and effective methods is genome shuffling, allowing the creation of hybrids whose genome is a combination of large DNA fragments derived from strains with distinct phenotypic traits. Genome shuffling creates a chance that the new strain will have valuable functional genes, including their full operons. This, in turn, increases the chance of a long-term maintenance of beneficial technological features by the obtained hybrids.

#### Tasowanie genomowe jako alternatywna metoda ulepszania właściwości technologicznych drożdży gorzelnicznych

**Streszczenie:** Nowoczesne technologie produkcji bioetanolu wymagają drożdży gorzelnicznych charakteryzujących się termotolerancją, osmotolerancją i zwiększoną odpornością na metabolity wtórne. Do tej pory nie zaobserwowano w naturze żadnych szczepów łączących wszystkie wyżej wymienione cechy. Od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad poprawą właściwości technologicznych szczepów przemysłowych. Opracowano szereg metod umożliwiających genetyczną poprawę drożdży gorzelnicznych. Jedną z najbardziej obiecujących i skutecznych metod jest tasowanie genomowe, umożliwiające tworzenie hybryd, których genom jest wynikiem połączenia dużych fragmentów DNA pochodzących ze szczepów o wyraźnych różnych cechach fenotypowych. Tasowanie genomowe stwarza wielką szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne, łącznie z ich kompletnymi operonami, co zwiększa szansę na długoterminowe utrzymanie korzystnych cech technologicznych przez uzyskane hybrydy drożdży gorzelnicznych.

1. Wstęp. 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Genom drożdży. 2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu. 3. Kierunki ulepszania genetycznego. 4. Metody ulepszania genetycznego. 5. Tasowanie genomowe. 5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego. 6. Podsumowanie

**Key words:** bioethanol production, genome shuffling, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast

**Słowa kluczowe:** produkcja bioetanolu, tasowanie genomowe, *Saccharomyces cerevisiae*, drożdże

## 1. Introduction

Modern bioethanol production technologies are based on a single-stage ethanol fermentation process combined with the plant polysaccharide hydrolysis (SSF) process, which is much more efficient due to the simplified production line and reduction of the total hydrolysis and fermentation time [31]. The fact that in the SSF process microorganisms and enzymes are placed in a single bioreactor enables distillery yeast to convert glucose to ethanol much faster, whereas continuous removal of sugars from the substrate reduces inhibition of enzyme activity [12, 50]. Despite numerous advantages, the SSF technology also has disadvantages associated with the differences between optimum temperatures for cellulase activity and the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The optimal temperature for enzymes is 50–60°C, while the temperature

enabling the growth of distillers yeast ranges between 30 and 37°C [6, 11, 42]. Conducting hydrolysis at temperatures appropriate for yeast slows down its course, reducing the rate of ethanol production [56]. For an efficient conversion of biomass to ethanol, it is important that *S. cerevisiae* yeast be resistant to deteriorating conditions of the external environment in which it grows and metabolises [14, 22, 26]. A significant obstacle to be overcome by yeast during bioethanol production is the use of high density fermentation worts, which results in an increased osmotic pressure. Another unit operation used in the distillation industry is high-temperature hydrothermal treatment, which facilitates the operation of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, and often takes place at temperatures above 200°C. Under such conditions, many different toxins are formed, such as acetic acid, furfural and hydroxyfurfural, which negatively affect yeast physiology [22].

\* Corresponding autor: PhD Aleksandra Wawro, Department of Innovative Biomaterials and Nanotechnologies, Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants, Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznan; tel. +48 618 455 814; e-mail: aleksandra.wawro@iwnirz.pl

The search for yeast strains with increased tolerance to stress factors has been under way for years. The most difficult element in the construction of such strains is combining several beneficial features into one single microorganism. The methods used hitherto did not guarantee obtaining strains of sustained positive properties. In recent years, new techniques of yeast genetic modification have emerged, enabling the creation of strains which combine several unique, industrially useful technological properties.

## 2. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Yeasts are single-celled organism, the shape of which depends on the yeast type, as well as on the physiological state of the cells. Radical environmental conditions also have a significant impact on their shape. However, the size of cells depends on the species, the level of development and the growing conditions [8].

On average, the yeast cell wall constitutes 10–25% of the total cell mass, this proportion depends primarily on the growth conditions. The main components of the cell wall of all fungi are polysaccharides and glycoproteins. When placed in a hypertonic environment, the cell begins to shrink rapidly as its original volume is reduced by up to 60% [24]. In the hypo-osmotic environment, in turn, the water penetrating into the cell causes its swelling, which may cause the cell membrane to burst and the cell itself to die [8, 34]. The majority of yeasts are mesophilic organisms and grow best at 20–28°C, although there are also psychrophilic (4–15°C) and thermophilic (above 30°C) species [8]. Yeast cells grow properly in the presence of water, since metabolic changes and the transport of nutrients are dependent on water. Another important factor is the concentration of sugars and salts dissolved in water, which in large amounts causes a decrease in water activity ( $a_w$ ). The optimum water activity corresponds to the optimum osmotic pressure, when the growth rate and yeast life activity is the highest [8, 29, 43]. *S. cerevisiae* are classified as yeasts whose optimum temperature ranges between 30–35°C, whereas slight deviations from the minimum and maximum are dependent on individual strains [55]. Both too high and too low temperatures cause damage to the cytoplasmic cell membrane, which in turn leads to permeability impairment [44].

### 2.1. Yeast genome

The genome of yeast called *S. cerevisiae* was the first eukaryotic genome to be sequenced in its entirety in the history of genetics. On April 24, 1996, to be precise, thanks to the cooperation of 600 scientists from

Europe, North America and Japan, its full nucleotide sequence was officially presented [15, 19, 32]. Fungi, as the simplest eukaryotes, have smaller genomes, but vertebrates have much larger genomes. However, this relationship is not all clear, which is described by the so-called C-value paradox (the amount of DNA in the haploid genome). In the second half of the twentieth century, research was conducted which showed that in the genomes of less complex organisms, space is much better utilised, and the genes are very close to each other and hence their number is higher [2]. The yeast genome contains a higher number of genes, and among them only a few genes are discontinuous (interrupted by non-coding sections), it also has few repetitive dispersed sequences in the genome. According to scientific reports, almost 23% of the yeast genome is almost identical to the human genome [9].

The plasticity of the yeast genome is a very important condition affecting the dynamic adaptation to environmental changes. Genes, and even entire operons, are transferred as mobile genetic units through intracellular and intercellular transfers. Then, the genes or also operons undergo extensive recombination processes. In the case of eukaryotes, repetitive sequences play a more important role. In the eukaryotic genome, up to 50% are movable elements which can act as recombinant “hot-spots” (sites very susceptible to mutations) which the sequences are more likely to join [38]. Thanks to this, it is possible to ensure the effectiveness of the genomic shuffling method described in this article.

### 2.2. Role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the bioethanol production

Fermentation of glucose into ethanol and carbon dioxide by yeast takes place along the fructose-bisphosphate pathway, in which one glucose molecule is metabolized, two molecules of pyruvate are formed, transformed in the next step to acetaldehyde reduced to ethanol. Carbon dioxide is also released. The two moles of ATP produced as a result of glycolysis are used for the processes of yeast cell biosynthesis, which includes a range of bioreactions requiring energy [16, 44]. Therefore, the production of ethanol is significantly connected with the growth of yeast cells. Without the continuous use of ATP molecules by yeast for their growth, glycolysis is stopped immediately because the intracellular accumulation of ATP molecules results in the inhibition of phosphofructokinase (PFK), one of the most important enzymes regulating the glycolysis process [3].

The maximum concentration of ethanol depends on the immunity of yeast to the resulting product, and as the ethanol concentration increases, the fermentation

rate is always significantly slowed down. The toxic effect of ethanol affects the metabolic processes, and its strongest action occurs at the stage of yeast cell reproduction. Yeast resistance to ethanol depends primarily on the chemical composition of their cytoplasmic membrane, which in turn results from the presence or absence of oxygen in the environment [10, 23].

The main features of distillery yeast *S. cerevisiae* is the ability to carry out fast and dynamic ethanol fermentation, as well as resistance to 10–15% of ethanol concentration and high ability to ferment sugars from the hexose group (glucose, maltose, sucrose, galactose). Yeast effectively ferments at the temperature of 30–33°C at a relatively low pH. They are resistant to organic acids such as tartaric, malic or citric acid and other non-volatile acids. While, volatile acids, such as acetic acids, are toxic to yeast [13, 27, 30, 39].

### 3. Pathways of genetic improvement

There are many physical, chemical and biological factors in the external environment that have a significant influence on the growth and metabolism of *S. cerevisiae* yeast cells [22, 47]. The most important environmental changes, often called environmental stress, which determine the action of microorganisms during the ethanol fermentation process include: increasing the process temperature, associated with the use of SSF (temperature stress), increasing osmotic pressure, due to high sugar levels (osmotic stress), increased ethanol concentration, which further aggravates osmotic stress and inhibits yeast growth, increasing the concentration of toxic chemical compounds, such as: furfural, hydroxyfurfural and acetic acid, increasing the toxicity arising from lipid peroxidation and the production of peroxide radicals and aldehyde compounds (oxidative stress) also mechanical stress, resulting from the operation of devices used during the fermentation process, leading to the damage of yeast cells [22]. The relative immunity of *S. cerevisiae* to emerging environmental stresses, is the reason for the most frequent selection of this species of microorganisms for fermentation processes [37]. However, it is necessary to learn the mechanisms of response of distillery yeast cells to environmental stress and to try reducing the negative effects, which is directly connected with improving the course of the bioethanol production process.

Distillers yeast have a high capability for glucose decomposition and, consequently, to produce bioethanol, both in the case of starchy and lignocellulosic raw materials. However, an important problem is the inability to biosynthesize enzymes which are necessary for polysaccharides transformation. In the case of starch polymers, amylolytic enzymes are very important,

while the activity of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes is crucial for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. Recently, the recombinants of *S. cerevisiae* yeast offer a broad perspective; due to their newly acquired properties, they directly convert starch and cellulose to glucose [25, 60].

Distillers yeast *S. cerevisiae* used in the ethanol fermentation process is not able to ferment pentoses [52]. Neither do they have sufficient cellulolytic, hemicellulolytic and amylolytic activity [55]. The first attempts to develop methods of engineering the metabolism of simple sugars in yeasts were undertaken in the 1970s [17]. The main aim is to endow the strains producing ethanol with the ability to break down pentoses. One of the main directions in this field is the method of introducing genes of xylose and arabinose metabolism from other organisms into yeast cells. Despite the fact that the *S. cerevisiae* yeast does not have the ability to metabolize xylose, they produce a small amount of ethanol on a substrate with xylulose under conditions of limited oxygenation. Xylulose is subjected to oxidation and reduction reactions, and previously is phosphorylated by xylulokinase (XKS1) to xylulose 5-phosphate. As a consequence, during the reaction of the pentose-phosphate pathway, it is transformed into the intermediates of glycolysis, which ultimately can lead to the production of ethanol [40, 51].

### 4. Methods of genetic improvement

In recent decades, the most common methods for improving genetic strains have been classical methods such as mutagenization and protoplast fusion as well as genetic engineering methods using recombinant DNA technology *in vitro* – gene cloning [18, 33, 58]. Classical methods of microbial development have been known since the beginning of the biotechnology industry, but their scope of modifications is limited. Genetic engineering, on the other hand, offers a much better chance of obtaining strains with new properties [36]. The response of *S. cerevisiae* cells to environmental stress is controlled by a multi-gen system which is located in the yeast genome in many loci. Many of these genes are not well phenotypically characterized and there is little data on their organisation, and hence classical genetic engineering methods are of little use in influencing cellular tolerance. Therefore, combinatorial engineering and its genome shuffling method have become an important tool for improving industrial microbial strains. This technique allows targeted evolution of whole organisms through recursive recombination at the genome level [7].

Along with the development of molecular biology engineering and genetic engineering techniques, it is

easier to directly introduce changes to genetic material, and the assessment of the effects of these changes acquires more significance. The analysis of the effects of genetic changes is used by metabolic engineering [18]. It has been described as “targeted improvement of product formation or cellular properties through the modification of specific biochemical reactions or the introduction of new genes with the use of recombinant DNA technology” [49]. Metabolic engineering includes whole cell systems and all genetic manipulations that change the overall performance of bioprocesses, which distinguishes it from simple genetic engineering methods [5]. Metabolic engineering is an interdisciplinary field which uses the principles of chemical reactions engineering, computer science, biochemistry and molecular biology to modify metabolic pathways and obtain the maximum flux of the selected metabolite [28]. The use of metabolic engineering to improve phenotypes stems from the emergence of more versatile genetic tools, as well as the enriched knowledge of the cell of microorganisms. Despite the amazing results that have been obtained through the use of metabolic engineering, the deficiencies concerning detailed knowledge of the genotype-phenotype relationship limit the use of this method [21]. Increasingly often, there appear scientific reports suggesting combination of metabolic engineering with genome shuffling. The genome shuffling approach has the potential to facilitate the operation of metabolic engineering and is an alternative thereto, leading to rapid achievement of the desirable phenotypes and generation of improved industrial strains [21, 48, 53]. This technique can be integrated with metabolic engineering to promote the evolutionary capability of a complex phenotype. Methods such as genome shuffling should be included as integral parts of the tools of modern metabolic engineering [21].

## 5. Genome shuffling

Genome shuffling is part of combinatorial engineering tools. This method was first presented in 2002 by the team of Willem P.C. Stemmer. These researchers focused primarily on improving strains through DNA shuffling and directed evolution. The DNA shuffling technique is an *in vitro* method of homologous recombination of the selected genes pool, mutated by random fragmentation and renewed polymerase chain reaction. Due to DNA shuffling, a directed evolution of several genes has been achieved, which is why genome shuffling has been suggested as a similar strategy [21]. This process combines the advantage of crossing many parents, enabled by DNA shuffling, as well as recombination of entire genomes, associated with conventional cultures or protoplast fusion [1]. Thanks to shuffling,

simultaneous genetic change is possible at various positions of the entire genome, based on the plasticity of the genome, without the need to obtain data on its sequence [21, 38]. Due to simultaneous changes in various positions of the genome, this method enables the collection of beneficial mutations and the elimination of these unwanted, and therefore gives the possibility to obtain microorganisms which are best suited to selected culture conditions [54].

Genome shuffling is based on the production of genetic and phenotypic diversity in the population through screening and selection of improved phenotypes [21]. While classic methods for improving microorganisms only help to select mutants for the next rounds, genome shuffling uses a much higher proportion of the diversity present in a given population [48]. The methods used so far to improve microorganisms, did not guarantee the acquisition of strains that would retain the desired characteristics for a long-term. Genome shuffling allows one to combine entire genomes, which creates a chance that the new strain will have valuable functional genes, including their complete operons, which contain, apart from functional genes, ones that regulate their expression. It provides the possibility of long-term maintenance of the desired phenotype through the resulting hybrids. Researchers from the W.C.P. Stemmer group compared the effects of improving strains via classical methods and the genome shuffling method. The authors found that 20 rounds of classic strain improvement methods, using approximately one million tests performed over a period of 20 years, allowed for 6-fold higher production of natural secondary metabolites by strains. However, in the case of genome shuffling, two rounds were enough to achieve similar results in one year and using only 24 thousand tests [61].

The technique of genome shuffling is particularly suitable for the improvement of many phenotypic characteristics which are difficult to modify by traditional methods, due to the lack of information on the set of genes which need to be modified in order to be able to induce a beneficial effect of changes [4]. Compared with other genetic engineering techniques, genome shuffling is much more convenient and easier to implement. The use of this method does not require expensive equipment and materials, hence its cost is not high. In addition, due to the relatively simple and precise implementation possibility, genome shuffling can be disseminated among many research laboratories [21].

Genome shuffling is a technique based on the fusion of protoplasts used to modify phenotypic traits since the late 1970s. Protoplasts derived from various strains are successfully combined, which indicates a very wide application of this technique in cell engineering [21, 38]. Despite the fact that the genome shuffling method



originates from protoplast fusion, it is significantly different from it. As already mentioned, a conventional fusion takes place between two cells with different genetic traits and, as a consequence, strong recombinants with traits from both parents can be obtained. The recombination effect results from combining only two parents from one generation. Genome shuffling allows for combining multiple parents from each generation, as well as several repetitive genome fusion rounds. It is also possible to combine genomes from organisms belonging to remote taxonomic groups and to attach fragments of isolated DNA to the genome of a given cell. This approach definitely increases the genetic diversity of the progeny and significantly increases the chance of obtaining a high yield of the strain.

The efficiency of genome shuffling is higher than in conventional methods, such as mutagenization or protoplast fusion, as this technique accelerates the process of improving the properties of the strains through the recursive fusion of protoplasts between the strains of many parents. If a larger number of parental strains are involved, more hybrids can be proportionally obtained. It is necessary to indicate that the key advantage of genome shuffling is to strengthen the genetic diversity of the offspring population. It is also important that the genome shuffling method is not limited to microorganisms that have a "clear" genetic basis. Despite the fact that conventional gene recombination technology allows combinations between multiple parents, it only refers to DNA fragments and not to whole genomes. Although the cellular phenotype is a manifestation of the global level of gene expression, metabolic demand or cell stresses, the cellular profile depends on the expression of a large number of genes which are poorly understood and very widely distributed within the genome. Genome shuffling, as an engineering strategy for whole genomes, having the potential to use microorganisms without knowing their genetic basis, is much more effective [21, 41]. Taking into consideration that genome shuffling is based on a natural homologous recombination, the mutant population obtained is not considered to be genetically modified organisms. The strains improved using this method, can be used, among others, for the production of bioethanol [21, 38, 46, 59].

The library of parental strains is constructed on the basis of the screening of initial (wild) strains or mutants, based on phenotypic differences. Creating a library also aims at generating a greater number of genotypes. The desired strains undergo recursive protoplast fusion in the next step. The main idea of parental strains selection is to create phenotypic and genotypic diversity. Failure to adopt an appropriate selection means that the desired phenotype is not obtained. Both wild strains with high yields and populations with increased variety

should be used in the first stage of genome shuffling. The structure of the parent strain library is based on the classic approach, such as mutagenesis, which is the leading method of activating a diverse population [21]. In this process, the wild strain is subjected to one or more rounds of mutagenesis, with the participation of a mutagen. Genome shuffling uses the diversity among existing populations and allows for the so-called backcrossing (offspring with the parent) to eliminate unimportant or harmful gene changes that may accumulate during the process of random mutagenesis [41]. Parental strains selection is focused on the target phenotype, such as productivity of metabolites or resistance to external environment factors. It often happens that strains with increased productivity or greater tolerance to environmental conditions are characterized by weakened growth [21]. The next stage of genome shuffling is the protoplast fusion, which allows homologous recombination of genomes [41]. Conventional protoplast fusion is a very effective method, resulting in high frequency of gene transfer and recombination efficiency. However, this only applies to the situation when we have two parents, because when the fusion takes place between many parents, its efficiency is low. This problem is solved by genome shuffling, which includes the recursive protoplast fusion method between many different parent strains in each generation, which provides information exchange within the population. After just two rounds of fusion, a strain with several improved phenotypic traits can be obtained [21]. The high efficiency of the recursive protoplast fusion is the backbone of the success of genome shuffling [57]. The last stage of genome shuffling is the selection of the desired phenotype using the screening method. This is one of the most important steps of the entire genome shuffling procedure. The classical screening methods are based on physicochemical and biochemical characteristics as well as on genetic markers [11]. The development of a high-throughput screening procedure to enhance the success of obtaining an improved phenotype is also increasingly expansive. Vital changes in the screening procedure as well as analytical technologies, such as HPLC or mass spectroscopy, provide an opportunity to test extensive libraries of strains and increase the chance of success in isolating the desired phenotypes [21].

### 5.1. Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains by genome shuffling method

Scientific reports indicate improvement in phenotypic traits of distillery yeast strains *S. cerevisiae* obtained through genome shuffling. Many scientists describe in their publications that only after two rounds of genome shuffling they succeeded in obtaining strains

with the desired technological characteristics. Steensels et al. observed that the genome shuffling method is very fast due to the fact that two rounds of shuffling allow one to achieve the results which a few years ago required at least two decades of research and a huge financial outlay [48]. Zheng et al. after two rounds of genome shuffling obtained a *S. cerevisiae* yeast strain characterized by 21.6% higher fermentation activity. They showed that in one improved strain there are several technologically desirable characteristics, including resistance to the presence of a toxic metabolite such as acetic acid [62]. After genome shuffling Gong et al. isolated over 200 improved strains of *S. cerevisiae*. After initial selection they limited them to 21 strains producing a larger amount of ethanol than parental strains, and from amongst them selected two that showed thermotolerance at temp. 43°C [20]. Similar research work was conducted by Orosco et al. The authors applied genome shuffling to enhance the immunity of *S. cerevisiae* yeast to increased temperature and ethanol content. After performing several rounds of shuffling, they obtained a strain which, at the temperature of 42°C and at 18% ethanol concentration, was characterized by over 10% higher fermentation activity than the industrial initial strain [35]. Shi et al., on the other hand, performed three rounds of shuffling and received a very valuable strain of *S. cerevisiae* yeast, which, in the temperature of 45°C and 20% ethanol concentration, was able to produce 10% (w/v) ethanol [45]. As proven by the results mentioned above, it is possible to obtain new hybrids of distillery yeasts endowed with characteristics important for the distillation industry. However, in order to achieve a complete success with this method, it is necessary to verify the functional features of the new and improved strains of yeast, by undertaking studies on the stability of both the phenotype and the genotype.

## 6. Conclusion

Genome shuffling is one of the new techniques which uses already existing diversity to a much greater extent. Therefore, prospects for obtaining the desired distillery yeast strains with increased resistance to environmental stress are on the rise. It is also important that most methods of improving the properties of a strain are not mutually exclusive, but can be combined to create even greater variations and minimize the disadvantages of individual techniques. This can be observed even in the case of the combination of a random mutagenization with multiple rounds of genome shuffling, which is a very promising solution, with regard to the recombination of both the expected mutations and the elimination of harmful mutations. Genome shuffling

is a fast and convenient technique with great potential for obtaining desired phenotypic traits. Therefore, this method is increasingly used in innovative research on the technological features of *Saccharomyces cerevisiae* yeast used in the production of bioethanol.

## Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

## References

1. Adrio J.L., Demain A.L.: Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 187–214 (2006)
2. Babik W.: Ewolucja genomów i powstawanie nowych genów. *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych.* **58**, 385–393 (2009)
3. Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young A.: Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* **26**, 89–105 (2008)
4. Bajwa P.K., Pinel D., Martin V.J.J., Trevors J.T., Lee H.: Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *J. Microbiol. Methods.* **81**, 179–186 (2010)
5. Bekker V., Dodd A., Brady D., Rumbold K.: Tools for metabolic engineering in *Streptomyces*. *Bioengineered.* **5**, 293–299 (2014)
6. Białas W., Wojciechowska D., Szymanowska D., Grajek W.: Optymalizacja procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi metodą powierzchni odpowiedzi. *Biotechnologia*, **4**, 183–199 (2009)
7. Biot-Pelletier D., Martin V.J.J.: Evolutionary engineering by genome shuffling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3877–3887 (2014)
8. Bonin S.: Tradycyjne metody modyfikacji drożdży (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 282–301
9. Brown T.A.: Genomy. PWN Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 2001, s. 472
10. Chmiel A.: Biotechnologia podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wydawnictwo Naukowe PWN (wyd. 2), Warszawa, 1994, s. 364
11. Choudhary J., Singh S., Nain L.: Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Biotechnol.* **21**, 82–92 (2016)
12. Costa D.A., de Souza C.J.A., Costa P.S., Rodrigues M.Q.R.B., dos Santos A.F., Lopes M.R., Genier H.L.A., Silveira W.B., Fietto L.G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3829–3840 (2014)
13. Demain i Báez-Vásquez Demain A.L., Báez-Vásquez M.A.: Biofuels of the Present and the Future (w) New and Future Developments in Catalysis: Catalytic Biomass Conversion, red. S.L. Suib, Elsevier, 2013, s. 325–370
14. Edgardo A., Parra C., Rodriguez M., Jaime B.: Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **43**, 120–123 (2008)
15. Engel S.R., Cherry J.M. wsp.: The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3-Genes Genom. Genet.* **4**, 389–398 (2014)

16. Evans G.G., Furlong J.: Environmental Biotechnology: Theory and Application. John Wiley & Sons (wyd. 2), 2011, s. 11–48
17. Fernandes i Murray Fernandes S., Murray P.: Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation. *Bioeng Bugs*. **1**, 424–428 (2010)
18. Fiedurek J.: Biologiczne podstawy procesów mikrobiologicznych (w) Podstawy biotechnologii przemysłowej, red. W. Bednarski, J. Fiedurek, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 23007, s. 57–85
19. Goffeau A., Oliver S.G. i wsp.: Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563–567 (1996)
20. Gong G., Ma L., Chen X.: Isolation and improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for producing the distilled liquor. *J. Chem. Pharm. Res.* **6**, 283–88 (2014)
21. Gong J., Zheng H., Wu Z., Chen T., Zhao X.: Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnol Adv.* **27**, 996–1005 (2009)
22. Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, **3**, 46–63 (2008)
23. Henderson C.M., Block D.E.: Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2966–2972 (2014)
24. Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J.: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 185–202 (2006)
25. Kroumov A.D., Modenes, Maicon A.N., de Araujo Tait M.C.: Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochem. Eng. Journal*. **28**, 243–255 (2006)
26. Kumari R., Pramanik K.: Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *Biosci. Bioeng.* **114**, 622–629 (2012)
27. Kunicka A., Rajkowska K.: Charakterystyka mikroorganizmów. Drożdże (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania (tom I), red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
28. Ledakowicz S.: Od inżynierii metabolicznej przez biologię systemów do inżynierii biologicznej. *Inż. Ap. Chem.* **48**, 17–20 (2009)
29. Levin D.E.: Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. **189**, 1145–1175 (2011)
30. Lipińska E.: Drożdże gorzelnicze i biosynteza etanolu (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 155–166
31. Liu Z.-H., Qin L., Zhu J.-Q., Li B.-Z. and Yuan Y.-J.: Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnol. Biofuels*. **7**, 167 (2014)
32. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*. **3**, 7–21 (2005)
33. Nicholl Nicholl D.S.T.: An introduction to genetic engineering, Cambridge University Press (wyd. 3), s. 327 (2008)
34. Orlean P.: Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Wall Gen.* **192**, 775–818 (2012)
35. Orosco F.L., Estrada S.M., Simbahan J.F., Alcantara V.A., Pajares I.G.: Genome shuffling for improved thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* 2013. *Philipp. Sci. Lett.* **10**, 22–28 (2017)
36. Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J.: Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287–301 (2000)
37. Pereira F.B., Romania A., Ruiz H.A., Teixeira J.A., Domingues L.: Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* **161**, 192–199 (2014)
38. Petri R., Schmidt-Dannert C.: Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 298–304 (2004)
39. Podgórska I., Solarska E.: Wykorzystanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zabezpieczaniu procesów fermentacyjnych. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, **3**, doi:10.15199/64.2016.3.6 (2016)
40. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttilä M.: Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS Yeast Res.* **3**, 185–189 (2003)
41. Rubin-Pitel S.B., Chao C.M.-H., Chen W., Zhao H.: Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development (w) Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, red. Yang S.-T., Elsevier, 2007, s. 49–72
42. Ruiz H.A., Silva D.P., Ruzene D.S., Lima L.F., Vicente A.A., Teixeira J.A.: Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. *Fuel*, **95**, 528–536 (2012)
43. Satyanarayana T., Kunze G.: Yeast biotechnology: diversity and applications, Springer Netherlands, 2009
44. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2003
45. Shi D.J., Wang C.L., Wang K.M.: Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 139–147 (2009)
46. Snoek T., Picca Nicolino M., Van den Bremt S., Mertens S., Saels V., Verplaetse A., Steensels J., Verstrepen K.J.: Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels*. **26**, 8–32 (2015)
47. Spencer J., Phister T.G., Smart K.A., Greetham D. Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC Research Notes*. **7**, 151 (2014)
48. Steenles J., Snoek T., Meersman E., Picca Nicolino M., Voordeckers K., Verstrepen K.J.: Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 47–995 (2014)
49. Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J.: Metabolic Engineering: Principles and Methodologies, San Diego, Academic Press, 1998, s. 725
50. Strąk E., Balcerek M.: Wybrane technologie wykorzystywane w przemyśle gorzelniczym, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **14**, 33–44 (2015)
51. Sybirny W., Puchalski Cz., Sybirny A.: Metaboliczna inżynieria drobnoustrojów do konstruowania wydajnych producentów bioetanolu z lignocelulozy. *Biotechnologia*, **4**, 38–54 (2007)
52. Świątek M., Lewandowska M., Bednarski W.: Doskonalenie procesów biotechnologicznych stosowanych w produkcji etanolu II generacji z surowców lignocelulozowych. *Postępy Nauk Rolniczych*, **1**, 121–131 (2011)
53. Tao X., Zheng D., Liu T., Wang P., Zhao W., Zhu M., Jiang X., Zhao Y., Wu X.: A Novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. *Plos One*, **7**, 1–10 (2012)
54. Walczak P., Kunicka A., Kręgiel D., Drewicz E.: Ulepszanie i przechowywanie mikroorganizmów (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania, red.

- Z. Libudziś, K. Kowal, Z. Żakowska (tom I), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
53. Wallace V.: Improving stress tolerance in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic biomass department of chemistry, Lund University, praca doktorska, 2014
  54. Wallace-Salinas V., Gorwa-Grauslund M.F.: Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol. Biofuels*. **6**, 151 (2013)
  55. Wang M., Zhang W., Xu W., Shen Y., Du L.: Optimization of genome shuffling for high-yield production of the antitumor deacetylmycoepoxydiene in an endophytic fungus of mangrove plants. *Microbiol. Biotechnol. Appl.* 1–8 (2016)
  56. Węgleński P., Golik P.: Inżyniera genetyczna (w) Genetyka molekularna, red. P. Węgleński. Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2008, s. 109–134
  57. Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A.: Novel strategy for yeast construction using delta-integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1491–1498 (2010)
  58. Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino Ch. Fukuda H., Kondo A.: Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol. Biofuels*. **4**, doi: 10.1186/1754-6834-4-8 (2011)
  59. Zhang Y.X., Perry K. Vinci V.A., Powell K., Stemmer W.P.C., del Cardayre S.B.: Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, **415**, 644–646 (2002)
  60. Zheng D.Q., Wu X.Ch., Wang P-M., Chi X-Q., Tao X-L., Li P. Jiang X-H., Zhao Y-H.: Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 415–422 (2011)



## TASOWANIE GENOMOWE JAKO ALTERNATYWNA METODA ULEPSZANIA WŁAŚCIWOŚCI TECHNOLOGICZNYCH DROŻDZY GORZELNICZYCH

Aleksandra Wawro\*

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

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w lipcu 2018 r.

**Streszczenie:** Nowoczesne technologie produkcji bioetanolu wymagają drożdży gorzelnicznych charakteryzujących się termotolerancją, osmotolerancją i zwiększonej odporności na metabolity wtórne. Do tej pory nie zaobserwowano w naturze żadnych szczepów łączących wszystkie wyżej wymienione cechy. Od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad poprawą właściwości technologicznych szczepów przemysłowych. Opracowano szereg metod umożliwiających genetyczną poprawę drożdży gorzelnicznych. Jedną z najbardziej obiecujących i skutecznych metod jest tasowanie genomowe, umożliwiające tworzenie hybryd, których genom jest wynikiem połączenia dużych fragmentów DNA pochodzących ze szczepów o wyraźnych różnych cechach fenotypowych. Tasowanie genomowe stwarza wielką szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne, łącznie z ich kompletnymi operonami, co zwiększa szansę na długoterminowe utrzymanie korzystnych cech technologicznych przez uzyskane hybrydy drożdży gorzelnicznych.

1. Wstęp. 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Genom drożdży. 2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu. 3. Kierunki ulepszania genetycznego. 4. Metody ulepszania genetycznego. 5. Tasowanie genomowe. 5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego. 6. Podsumowanie

### Genome shuffling as an alternative method of improving the properties of distillery yeast

**Abstract:** Modern technologies of bioethanol production require distillation yeast characterized by thermotolerance, osmotolerance and increased resistance to secondary metabolites. To date, no strains have been observed in nature which possess all of the above-mentioned characteristics. For many years, intensive research has been carried out to improve the technological properties of industrial strains. A number of methods have been developed to allow genetic improvement of distillery yeasts. One of the most promising and effective methods is genome shuffling, allowing the creation of hybrids whose genome is a combination of large DNA fragments derived from strains with distinct phenotypic traits. Genome shuffling creates a chance that the new strain will have valuable functional genes, including their full operons. This, in turn, increases the chance of a long-term maintenance of beneficial technological features by the obtained hybrids.

1. Introduction. 2. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Yeast genome. 2.2. Role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the bioethanol production. 3. Pathways of genetic improvement. 4. Methods of genetic improvement. 5. Genome shuffling. 5.1. Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains by genome shuffling method. 6. Conclusion

**Słowa kluczowe:** tasowanie genomowe, drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, produkcja bioetanolu

**Key words:** genome shuffling, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol production

## 1. Wstęp

Współczesne technologie produkcji bioetanolu oparte są na jednoetapowym procesie fermentacji etanolowej, połączonym z procesem hydrolizy roślinnych polisacharydów (-SSF), który jest dużo wydajniejszy, ze względu na uproszczoną linię technologiczną oraz skrócenie łącznego czasu hydrolizy i fermentacji [31]. Ze względu na to, że w procesie SSF mikroorganizmy i enzymy umieszczane są w jednym bioreaktorze, drożdże gorzelniczne mają możliwość dużo szybszego przekształcania glukozy w etanol, a ciągle usuwanie cukrów z podłoża zmniejsza hamowanie aktywności enzymów [12, 50]. Mimo wielu zalet, technologia SSF posiada wady, związane z różnicami między optymalnymi temperaturami dla działania celulaz i wzrostu komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Optimum

temperaturowe dla enzymów wynosi 50–60°C, podczas gdy zakres temperatur, przy których wzrastają drożdże gorzelniczne mieści się w granicach od 30 do 37°C [6, 11, 42]. Prowadzenie hydrolizy w temperaturach właściwych dla drożdży spowalnia jej przebieg, zmniejszając tempo wytwarzania etanolu [56]. Dla wydajnej konwersji biomasy do etanolu ważne jest, by drożdże *S. cerevisiae* były odporne na pogarszające się warunki środowiska zewnętrznego, w których wzrastają i metabolizują [14, 22, 26]. Podczas produkcji bioetanolu poważną przeszkodą dla drożdży jest stosowanie brzocek fermentacyjnych o wysokiej gęstości, czego konsekwencją jest zwiększone ciśnienie osmotyczne. Inną operacją jednostkową, wykorzystywaną w przemyśle gorzelnicznym, jest wysokotemperaturowa obróbka hydrotermiczna, ułatwiająca działanie enzymów celulo-lycznych i hemicelulo-lycznych, a przebiegająca czę-

\* Autor korespondencyjny: Aleksandra Wawro, Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań; tel. 618455-814; e-mail: aleksandra.wawro@iwnirz.pl

sto w temperaturze powyżej 200°C. W takich warunkach tworzy się wiele różnych toksyn jak kwas octowy, furfural i hydroksyfurfural, które wpływają negatywnie na fizjologię drożdży [22].

Od lat trwają poszukiwania szczepów drożdży o zwiększonej tolerancji na czynniki stresowe. Najtrudniejszym elementem przy konstrukcji takich szczepów jest połączenie w jednym mikroorganizmie jednocześnie kilku korzystnych cech. Dotychczas stosowane metody nie gwarantowały pozyskanie szczepów długotrwale zachowujących pozytywne cechy. W ostatnich latach pojawiły się nowe techniki modyfikacji genetycznej drożdży, umożliwiające uzyskanie szczepów łączącego kilka unikalnych, przydatnych przemysłowo właściwości technologicznych.

## 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże to jednokomórkowce, których kształt uzależniony jest od rodzaju drożdży, a także stanu fizjologicznego komórek. Istotne oddziaływanie na ich kształt mają również radykalne warunki środowiskowe. Natomiast wielkość komórek zależy od gatunku, stopnia rozwoju oraz warunków hodowli [8].

Ściana komórkowa drożdży stanowi średnio 10–25% s.s. całej masy komórkowej, udział ten zależy przede wszystkim od warunków wzrostu. Głównymi składnikami ściany komórkowej wszystkich grzybów są polisacharydy i glikoproteiny. W obecności środowiska hipertonicznego komórka zaczyna się bardzo gwałtownie kurczyć i dochodzi wtedy do utraty nawet 60% pierwotnej objętości [24]. Z kolei w środowisku hypoosmotycznym, gdy woda przenika do wnętrza komórki, dochodzi do jej pęcznienia, co może spowodować rozerwanie błony komórkowej i śmierć samej komórki [8, 34]. Drożdże w większości są organizmami mezofilnymi i najlepiej wzrastają w temperaturze 20–28°C, choć są też gatunki psychrofilne (4–15°C) oraz termofilne (powyżej 30°C) [8]. Komórki drożdży rosną prawidłowo w obecności wody, gdyż od wody zależne są przemiany metaboliczne i transport składników odżywczych. Istotne jest także stężenie cukrów i soli rozpuszczonych w wodzie, które w dużej ilości powodują obniżenie aktywności wody ( $a_w$ ). Optymalna aktywność wody odpowiada optymalnemu ciśnieniu osmotycznemu, wtedy szybkość wzrostu i aktywność życiowa drożdży jest największa [8, 29, 43]. *Saccharomyces cerevisiae* klasyfikowane są do drożdży, których optimum temperaturowe mieści się w zakresie 30–35°C, a nieznaczne odchylenia od minimum i maksimum uzależnione są od poszczególnych szczepów [55]. Zbyt wysoka, jak również zbyt niska temperatura powoduje uszkodzenie cytoplazmatycznej błony komórkowej, co w efekcie prowadzi do zaburzenia jej przepuszczalności [44].

### 2.1. Genom drożdży

Genom drożdży *S. cerevisiae* był w historii genetyki pierwszym genomem eukariotycznym, który został zsekwencjonowany w całości. Dokładnie 24 kwietnia 1996 roku, dzięki współpracy 600 naukowców z Europy, Ameryki Północnej i Japonii, oficjalnie przedstawiono jego pełną sekwencję nukleotydową [15, 19, 32]. Grzyby jako najprostsze eukarionty mają genomy mniejsze, ale już kręgowce, mają genomy zdecydowanie większe. Jednakże zależność ta, nie jest do końca jasna, co opisuje tzw. paradoks wartości C (ilość DNA w haploidalnym genomie). W drugiej połowie XX w. przeprowadzono badania, które wykazały, że w genomach organizmów mniej złożonych, są dużo lepiej zagospodarowane przestrzenie, a geny znajdują się bardzo blisko siebie i stąd ich ilość jest większa [2]. Genom drożdży zawiera większą liczbę genów, a wśród nich tylko nieliczne geny są nieciągłe (poprzerywane odcinkami niekodującymi), posiada także niewiele powtarzających się sekwencji rozproszonych w genomie. Według doniesień naukowych prawie 23% genomu drożdży jest niemal identyczne jak genom ludzkiego [9].

Plastyczność genomu drożdży jest bardzo ważnym warunkiem wpływającym na dynamiczną adaptację do zmian środowiskowych. Geny, a nawet całe operony, są przenoszone jako mobilne jednostki genetyczne przez wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe transfery. Następnie geny lub też operony ulegają rozległym procesom rekombinacji. W przypadku organizmów eukariotycznych powtarzające się sekwencje odgrywają jeszcze istotniejszą rolę. W genomie eukariotycznym aż 50% stanowią elementy ruchome, które mogą działać jako rekombinacyjne „hot-spots” (tzw. gorące miejsca, bardzo podatne na mutacje), do których sekwencje chętniej się przyłączają [38]. Dzięki temu możliwe jest zapewnienie skuteczności opisywanej w tym artykule metody tasowania genomowego.

### 2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu

Fermentacja glukozy do etanolu i dwutlenku węgla przez drożdże odbywa się na szlaku fruktozobisfosforanowym, w którym metabolizowana jest jedna cząsteczka glukozy, powstają dwie cząsteczki pirogronianu, przekształcane w następnym etapie do aldehydu octowego, ulegającego redukcji do etanolu. Dochodzi także do wydzielania ditlenku węgla. Powstające w wyniku glikolizy dwa mole ATP są wykorzystywane do procesów biosyntezy składników komórek drożdży, która obejmuje szereg bioreakcji wymagających energii [16, 44]. Stąd też, produkcja etanolu jest w istotny sposób połączona ze wzrostem komórek drożdży. Bez ciągłego wykorzystania cząsteczek ATP przez drożdże do

ich wzrostu, glikoliza zostaje natychmiast zatrzymana, ponieważ kumulacja wewnątrzkomórkowa cząsteczek ATP powoduje hamowanie działania fosfofruktokinazy (PFK), jednego z najważniejszych enzymów regulacyjnych procesu glikolizy [3].

Maksymalne stężenie etanolu jest zależne od odporności drożdży na powstały produkt, a wraz ze wzrostem stężenia etanolu szybkość fermentacji zawsze ulega znaczącemu spowolnieniu. Toksyczne działanie etanolu wpływa na procesy metaboliczne, a jego najsilniejsze działanie przypada na etap rozmnażania komórek drożdży. Odporność drożdży na etanol zależy przede wszystkim od składu chemicznego ich błony cytoplazmatycznej, co z kolei wynika z obecności lub braku tlenu w środowisku [10, 23].

Głównymi cechami drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* jest zdolność do przeprowadzenia szybkiej i dynamicznej fermentacji etanolowej, a także odporność na 10–15% stężenia etanolu oraz wysoka zdolność fermentowania cukrów z grupy heksoz (glukoza, maltoza, sacharoza, galaktoza). Drożdże najefektywniej fermentują w temperaturze 30–33°C przy stosunkowo niskim pH. Są odporne na działanie takich kwasów organicznych, jak kwas winowy, jabłkowy czy cytrynowy i innych kwasów nietlotnych. Natomiast kwasy lotne, takie jak octowy, są dla drożdży toksyczne [13, 27, 30, 39].

### 3. Kierunki ulepszania genetycznego

Istnieje bardzo wiele czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych środowiska zewnętrznego, które w istotny sposób wpływają na wzrost i metabolizm komórek drożdży *S. cerevisiae* [22, 47]. Do najważniejszych zmian środowiskowych, nazywanych często stresami środowiskowymi, które determinują działanie mikroorganizmów podczas procesu fermentacji etanolowej należą: podwyższenie temperatury procesu, związane z zastosowaniem technologii SSF (stres temperaturowy), zwiększenie ciśnienia osmotycznego, ze względu na wysoki poziom cukru (stres osmotyczny), zwiększenie stężenia etanolu, co jeszcze bardziej pogłębia stres osmotyczny i powoduje hamowanie wzrostu drożdży, zwiększenie stężenia toksycznych związków chemicznych, takich jak: furfural, hydroksyfurfural oraz kwas octowy, zwiększenie toksyczności powstającej w wyniku peroksydacji lipidów oraz produkcji rodników nadtlenkowych i związków aldehydowych (stres oksydacyjny) a także stres mechaniczny, wynikający z działania urządzeń stosowanych podczas procesu fermentacji, prowadzący do uszkodzeń komórek drożdży [22]. Względna odporność *S. cerevisiae* na pojawiające się stresy środowiskowe, jest powodem najczęstszego wyboru tego gatunku mikroorganizmów do procesów

fermentacyjnych [37]. Jednakże, konieczne jest poznanie mechanizmów odpowiedzi komórek drożdży gorzelniczych na stresy środowiskowe oraz podejmowanie próby maksymalnego zredukowania negatywnych skutków, co bezpośrednio łączy się z usprawnieniem przebiegu procesu produkcji bioetanolu.

Drożdże gorzelnicze wykazują dużą zdolność do rozkładu glukozy i w konsekwencji do wytwarzania bioetanolu, zarówno w przypadku surowców skrobiowych, jak i lignocelulozowych. Istotny problem stanowi jednak brak zdolności do biosyntezy enzymów niezbędnych do przekształcania polisacharydów. W przypadku polimerów skrobiowych bardzo ważne są enzymy amylolityczne, natomiast do hydrolizy biomasy lignocelulozowej kluczowe jest działanie enzymów celulolitycznych i hemicelulolitycznych. Obecnie szeroką perspektywę stanowią rekombinanty drożdży *S. cerevisiae*, które dzięki swoim nowo nabytym właściwościom, w sposób bezpośredni przekształcają skrobię i celulozę do glukozy [25, 60].

Drożdże gorzelnicze *S. cerevisiae* stosowane w procesie fermentacji etanolowej nie są zdolne do fermentacji pentoz [52]. Nie posiadają także wystarczającej aktywności celulolitycznej, hemicelulolitycznej i amylolitycznej [55]. Pierwsze próby opracowania metod inżynierii metabolizmu cukrów prostych u drożdży zostały podjęte w latach 70. dwudziestego wieku [17]. Zasadniczym celem jest wytworzenie zdolności szczepów produkujących etanol do rozkładu pentoz. Jednym z głównych kierunków w tym zakresie, jest metoda polegająca na wprowadzeniu do komórek drożdży genów metabolizmu ksylozy i arabinozy z innych organizmów. Pomimo tego, że drożdże *S. cerevisiae* nie mają zdolności metabolizmu ksylozy, to na podłożu z ksyłulozą w warunkach ograniczonego natleniania wytwarzają nieznaczne ilości etanolu. Ksyłuloza jest poddawana reakcjom utleniania i redukcji, a przedtem jest fosforylowana przez ksyłulokinazę (XKS1) do ksyłulozo-5-fosforanu. W następstwie, podczas reakcji szlaku pentozo-fosforanowego zostaje przekształcona do intermediatów glikolizy, co w ostateczności może prowadzić do wyprodukowania etanolu [40, 51].

### 4. Metody ulepszania genetycznego

W ostatnich kilkudziesięciu latach najczęściej stosowanymi metodami ulepszania genetycznego szczepów były metody klasyczne, jak mutagenizacja i fuzja protoplastów, a także metody inżynierii genetycznej wykorzystujące technologie rekombinacji DNA *in vitro* – klonowanie genów [18, 33, 58]. Klasyczne metody doskonalenia drobnoustrojów są znane od początku istnienia przemysłu biotechnologicznego, a jednak ich zakres możliwości modyfikacyjnych jest ograniczony.



Z kolei inżynieria genetyczna stwarza dużo większą szansę na uzyskanie szczepów o nowych właściwościach [36]. Odpowiedź komórek *S. cerevisiae* na stresy środowiskowe jest kontrolowana przez system wielogenowy, który rozmieszczony jest w genomie drożdży w wielu loci. Wiele z tych genów nie jest dostatecznie scharakteryzowana fenotypowo i mało jest danych na temat ich organizacji, stąd klasyczne metody inżynierii genetycznej są mało przydatne podczas oddziaływania na tolerancję komórkową. Dlatego też istotnym narzędziem doskonalenia przemysłowych szczepów mikroorganizmów stała się inżynieria kombinatoryczna i należąca do niej metoda tasowania genomowego. Technika ta pozwala na ukierunkowaną ewolucję całych organizmów poprzez rekurencyjne rekombinacje na poziomie genomu [7].

Wraz z rozwojem technik inżynierii biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej, coraz prostsze jest bezpośrednio wprowadzanie zmian do materiału genetycznego, a ocena efektów tych zmian nabiera znaczenia. Analizą efektów zmian genetycznych posługuje się inżynieria metaboliczna [18]. Została opisana jako „ukierunkowana poprawa tworzenia produktów lub właściwości komórkowych poprzez modyfikacje specyficznych reakcji biochemicznych lub wprowadzenie nowych, z wykorzystaniem technologii rekombinacji DNA” [49]. Inżynieria metaboliczna uwzględnia całe systemy komórkowe oraz wszelkie manipulacje genetyczne zmieniające ogólną wydajność bioprocessów, co odróżnia ją od prostych metod inżynierii genetycznej [5]. Inżynieria metaboliczna jest interdyscyplinarną dziedziną, która wykorzystuje zasady inżynierii reakcji chemicznych, informatyki, biochemii i biologii molekularnej w celu modyfikacji szlaków metabolicznych i uzyskania maksymalnego strumienia wybranego metabolitu [28]. Zastosowanie inżynierii metabolicznej dla poprawy fenotypów wynika z pojawienia się bardziej wszechstronnych narzędzi genetycznych, a także ze wzbogaconej wiedzy o komórce mikroorganizmów. Mimo niezwykłych rezultatów, jakie zostały osiągnięte poprzez zastosowanie inżynierii metabolicznej, braki dotyczące szczegółowej wiedzy na temat relacji genotyp-fenotyp ograniczają wykorzystywanie tej metody [21]. Za to coraz częściej pojawiają się doniesienia naukowe sugerujące łączenie inżynierii metabolicznej z tasowaniem genomowym. Podejście tasowania genomowego ma potencjał do ułatwienia działań inżynierii metabolicznej i stanowi jej alternatywę, prowadząc do szybkiego uzyskania pożądanego fenotypu i generowania ulepszonych szczepów przemysłowych [21, 48, 53]. Technika ta może być zintegrowana z inżynierią metaboliczną w celu promowania zdolności ewolucyjnych złożonego fenotypu. Metody, takie jak tasowanie genomowe powinny być włączone jako integralne części narzędzi nowoczesnej inżynierii metabolicznej [21].

## 5. Tasowanie genomowe

Tasowanie genomowe (genome shuffling) należy do narzędzi inżynierii kombinatorycznej. Po raz pierwszy metoda ta została zaprezentowana w 2002 roku przez zespół Willema P.C. Stemmera. Badacze ci, koncentrowali się przede wszystkim na poprawie szczepów poprzez tasowanie DNA oraz ewolucję ukierunkowaną. Technika tasowania DNA to metoda *in vitro* homologicznej rekombinacji puli wybranych genów zmutowanych przez losową fragmentację i ponowną łańcuchową reakcję polimerazy. Dzięki tasowaniu DNA, udało się uzyskać ukierunkowaną ewolucję kilku genów, dlatego też jako podobną strategię zaproponowano właśnie tasowanie genomowe [21]. Proces ten łączy w sobie zaletę krzyżowania wielu rodziców, umożliwionego przez tasowanie DNA, a także rekombinacji całych genomów, związanej z konwencjonalnymi hodowlami lub też fuzją protoplastów [1]. Dzięki tasowaniu możliwa jest jednoczesna zmiana genetyczna w różnych pozycjach całego genomu, oparta na plastyczności genomu, bez konieczności zdobywania danych na temat jego sekwencji [21, 38]. Ze względu na jednoczesne zmiany w różnych pozycjach genomu, tasowanie umożliwia zgromadzenie pozytywnych mutacji oraz eliminację tych zbędnych, a zatem daje możliwość pozyskania mikroorganizmów najlepiej dopasowanych do wybranych warunków hodowli [54].

Tasowanie genomowe bazuje na wytwarzaniu genetycznej oraz fenotypowej różnorodności w populacji w następstwie badań przesiewowych oraz selekcji ulepszonych fenotypów [21]. Podczas gdy klasyczne metody ulepszania mikroorganizmów pomagają jedynie wybrać mutanty do następnych rund, tasowanie genomowe wykorzystuje znacznie większą proporcję różnorodności obecnej w danej populacji [48]. Dotychczas stosowane metody ulepszania mikroorganizmów nie gwarantowały pozyskania szczepów, które długotrwale zachowywałyby pożądaną cechę. Tasowanie pozwala na łączenie całych genomów, co stwarza szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne łącznie z ich kompletnymi operonami, zawierającymi obok genów funkcjonalnych także geny regulujące ich ekspresję. Daje to możliwość długotrwałego utrzymania pożądanego fenotypu przez powstałe hybrydy. Naukowcy z grupy W.C.P. Stemmera, dokonali porównania efektów ulepszania szczepów dokonywanych metodami klasycznymi i metodą tasowania genomowego. Autorzy stwierdzili, że 20 rund klasycznych metod poprawy szczepu, przy wykorzystaniu ok. miliona testów, wykonywanych przez okres 20 lat, pozwoliło na uzyskanie 6-krotnie większej produkcji naturalnych wtórnych metabolitów przez szczepy. Natomiast w przypadku tasowania, już dwie rundy były wystarczające do osiągnięcia podobnych



wyników, w ciągu jednego roku i przy użyciu tylko 24 tys. testów [61].

Technika tasowania jest szczególnie odpowiednia dla poprawy wielu cech fenotypowych, które są trudne do zmodyfikowania poprzez metody tradycyjne, ze względu na brak informacji na temat zestawu genów, które muszą zostać zmodyfikowane, by móc wywołać korzystny wpływ zmian [4]. W porównaniu z innymi technikami inżynierii genetycznej, tasowanie genomowe jest dużo wygodniejsze i łatwiejsze do realizowania. Zastosowanie tej metody nie wymaga drogich urządzeń i materiałów, stąd też jej koszt nie jest wysoki. Ponadto, z uwagi na relatywnie prostą i precyzyjną możliwość wykonania, tasowanie może być upowszechnione w wielu laboratoriach badawczych [21].

Tasowanie genomowe to technika oparta na fuzji protoplastów stosowanej do modyfikacji cech fenotypowych już od późnych lat 70. dwudziestego wieku. Protoplasty pochodzące z różnych szczepów z sukcesem są łączone, co wskazuje na bardzo szerokie zastosowanie techniki w inżynierii komórki [21, 38]. Pomimo tego, że metoda tasowania genomowego pochodzi od fuzji protoplastów, to w istotny sposób różni się od niej. Jak już wspomniano, konwencjonalna fuzja odbywa się pomiędzy dwiema komórkami o różnych cechach genetycznych i w konsekwencji można uzyskać silne rekombinanty z cechami pochodzącym od obu rodziców. Efekt rekombinacji wynika z połączenia tylko dwojga rodziców z jednego pokolenia. Tasowanie genomowe umożliwia kombinację pomiędzy wieloma rodzicami z każdego pokolenia, a także kilka powtarzających się rund fuzji genomu. Możliwe jest także łączenie genomów pochodzących od organizmów należących do odległych grup taksonomicznych i przyłączenie do genomu danej komórki fragmentów wyizolowanego DNA. Takie podejście zdecydowanie zwiększa różnorodność genetyczną potomstwa i znacząco podwyższa szansę na uzyskanie wysokiej wydajności szczepu.

Efektywność tasowania genomowego jest wyższa niż konwencjonalnych metod, takich jak mutagenizacja czy fuzja protoplastów, gdyż technika ta przyspiesza proces poprawy właściwości szczepów poprzez rekursywną fuzję protoplastów pomiędzy szczepami wielu rodziców. Jeżeli zaangażowana jest większa liczba szczepów rodzicielskich, wtedy można uzyskać proporcjonalnie więcej hybryd. Konieczne jest wskazanie, że kluczową zaletą tasowania jest wzmocnienie różnorodności genetycznej populacji potomstwa. Ważny jest też fakt, że metoda tasowania genomowego nie ogranicza się tylko do mikroorganizmów, które mają „klarowne” podłoże genetyczne. Mimo że, konwencjonalna technologia rekombinacji genu pozwala na kombinacje między wieloma rodzicami, to odnosi się tylko do fragmentów DNA, a nie do całych genomów. Wprawdzie fenotyp komórkowy jest przejawem globalnego poziomu eks-

presji genu, zapotrzebowania metabolicznego czy stresów komórki, to jednak profil komórkowy zależy od ekspresji dużej liczby genów, które są słabo poznane i bardzo szeroko rozmieszczone w genomie. Tasowanie jako strategia inżynierii całych genomów, mająca możliwości wykorzystywania mikroorganizmów bez znajomości podłoża genetycznego, jest dużo bardziej skuteczna [21, 41]. Biorąc pod uwagę, że tasowanie genomowe opiera się na naturalnej rekombinacji homologicznej, otrzymana zmutowana populacja, nie jest uważana za organizmy zmodyfikowane genetycznie. Ulepszone tą metodą szczepy mogą być stosowane m.in. do produkcji bioetanolu [21, 38, 46, 59].

Biblioteka szczepów rodzicielskich jest konstruowana na bazie skringingu szczepów wyjściowych (dzikich) lub mutantów w oparciu o różnice fenotypowe. Tworzenie biblioteki ma też na celu generowanie większej liczby genotypów. Pożądane szczepy w kolejnym etapie ulegają rekursywnej fuzji protoplastów. Główną ideą selekcji szczepów rodzicielskich jest właśnie wytworzenie różnorodności fenotypowej oraz genotypowej. Brak doboru odpowiedniej selekcji powoduje, że nie zostaje uzyskany pożądany fenotyp. Do pierwszego etapu tasowania powinny być stosowane zarówno szczepy dzikie z wysoką wydajnością, jak i populacje o zwiększonej różnorodności. Konstrukcja biblioteki szczepów rodzicielskich bazuje na klasycznym podejściu, takim jak mutagenizacja, która jest wiodącą metodą aktywowania zróżnicowanej populacji [21]. W tym procesie szczep dziki poddawany jest jednej lub kilku rundom mutagenizacji, przy udziale mutagenu. Tasowanie genomowe wykorzystuje różnorodność wśród populacji już istniejących i pozwala na tzw. krzyżowanie wsteczne (potomka z rodzicem), aby wyeliminować nieistotne lub szkodliwe zmiany genów, które mogą gromadzić się w trakcie przebiegu losowej mutagenizacji [41]. Selekcja szczepów rodzicielskich jest skoncentrowana na docelowym fenotypie, takim jak produktywność metabolitów czy odporność na czynniki środowiska zewnętrznego. Często zdarza się, że szczepy o zwiększonej produktywności czy większej tolerancji na warunki środowiska, charakteryzują się osłabionym wzrostem [21]. Następnym etapem tasowania genomowego jest fuzja protoplastów, która umożliwia homologiczną rekombinację genomów [41]. Konwencjonalna fuzja protoplastów jest bardzo efektywną metodą, powodującą wysoką częstotliwość transferu genu i wydajność rekombinacji. Jednak odnosi się to tylko do sytuacji, gdy mamy dwoje rodziców, bo gdy fuzja odbywa się między wieloma rodzicami, jej wydajność jest niska. Problem ten rozwiązuje tasowanie genomowe zawierające metodę rekursywnej fuzji protoplastów pomiędzy wieloma różnymi szczepami rodzicielskimi w każdym pokoleniu, która zapewnia wymianę informacji w obrębie populacji. Już po dwóch

rundach fuzji można uzyskać szczep charakteryzujący się kilkoma ulepszonymi cechami fenotypowymi [21]. Wysoka wydajność rekurencyjnej fuzji protoplastów jest istotą sukcesu tasowania genomowego [57]. Ostatnim etapem tasowania genomowego jest wybór pożądanego fenotypu z wykorzystaniem metody skryningu. Jest to jeden z ważniejszych kroków całej procedury tasowania. Klasyczne metody skryningu bazują na charakterystyce fizykochemicznej i biochemicznej, a także na markerach genetycznych [11]. Coraz bardziej ekspansywny jest także rozwój wysokowydajnej procedury skryningu dla zwiększenia sukcesu uzyskania ulepszanego fenotypu. Decydujące zmiany w procedurze badań przesiewowych, a także technologie analityczne takie jak HPLC czy spektroskopia mas, dają szansę na przetestowanie obszernych bibliotek szczepów i sukces w izolacji połączonych fenotypów [21].

### 5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego

Doniesienia naukowe wskazują na poprawę cech fenotypowych szczepów drożdży gorzelnicznych *S. cerevisiae*, uzyskanych metodą tasowania genomowego. W swoich publikacjach wielu naukowców opisuje, że już po dwóch rundach tasowania udało im się pozyskać szczepy z pożądanymi właściwościami technologicznymi. Steensels i wsp. zoobserwowali, że metoda tasowania genomowego jest bardzo szybka, z uwagi na to, że dwie rundy pozwalają na uzyskanie efektu, którego osiągnięcie jeszcze kilka lat temu, wymagało co najmniej dwóch dekad badań i ogromnego nakładu finansowego [48]. Zheng i wsp. po dwóch rundach tasowania genomowego pozyskali szczep drożdży *S. cerevisiae* odznaczający się o 21,6% większą aktywnością fermentacyjną. Wykazali, że w jednym ulepszonym szczepie znajduje się kilka połączonych technologicznie cech, w tym odporność na obecność toksycznego metabolitu jakim jest kwas octowy [62]. Gong i wsp. po przeprowadzeniu tasowania genomowego, wyizolowali ponad 200 ulepszonych szczepów *S. cerevisiae*, które po wstępnej selekcji ograniczyli do 21 szczepów, produkujących większą ilość etanolu niż szczepy rodzicielskie, a spośród nich wybrali dwa wykazały termotolerancję w temp. 43°C [20]. Podobne prace badawcze prowadził Orosco i wsp. Autorzy Ci zastosowali tasowanie genomowe, aby zwiększyć odporności drożdży *S. cerevisiae* na podwyższoną temperaturę i zawartość etanolu. Po przeprowadzeniu kilku rund tasowania, uzyskali szczep, który w temp. 42°C i przy 18% stężeniu etanolu charakteryzował się o ponad 10% wyższą aktywnością fermentacyjną niż przemysłowy szczep wyjściowy [35]. Z kolei Shi i współ. wykonali trzy rundy tasowania i otrzymali bardzo cenny szczep drożdży *S. cerevisiae*, który potrafił w temp. 45°C i przy

20% stężeniu etanolu wyprodukować 10% (w/v) etanolu [45]. Jak dowodzą przytoczone powyżej wyniki badań, możliwe jest uzyskanie nowych hybryd drożdży gorzelnicznych, posiadających istotne z punktu widzenia przemysłu gorzelniczego cechy. Jednakże do osiągnięcia pełnego sukcesu tej metody, konieczna jest weryfikacja cech użytkowych nowego, ulepszanego szczepu drożdży, wymagająca podjęcia badań nad stabilnością zarówno fenotypu jak i genotypu.

## 6. Podsumowanie

Tasowanie genomowe to jedna z nowych technik, która wykorzystuje już istniejącą różnorodność w znacznie większym stopniu. Coraz szersze są zatem perspektywy uzyskania połączonych szczepów drożdży gorzelnicznych o zwiększonej odporności na stresy środowiskowe. Istotne jest także to, że większość metod ulepszania właściwości szczepu nie wyklucza się wzajemnie, lecz można je łączyć, żeby stworzyć jeszcze większe zmienności, a także zminimalizować wady poszczególnych technik. Można to zaobserwować choćby przy połączeniu losowej mutagenizacji z wielokrotnymi rundami tasowania genomowego, co jest bardzo przyszłościowym rozwiązaniem, w odniesieniu do rekombinacji zarówno oczekiwanych mutacji, jak i do zlikwidowania szkodliwych mutacji. Tasowanie genomowe to technika szybka, wygodna i ma ogromny potencjał pozyskiwania połączonych cech fenotypowych. Stąd też, metoda ta znajduje coraz to szersze zastosowanie w innowacyjnych badaniach nad cechami technologicznymi drożdży *S. cerevisiae* stosowanych w produkcji bioetanolu.

## Piśmiennictwo

1. Adrio J.L., Demain A.L.: Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 187–214 (2006)
2. Babik W.: Ewolucja genomów i powstawanie nowych genów. *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*, **58**, 385–393 (2009)
3. Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young A.: Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* **26**, 89–105 (2008)
4. Bajwa P.K., Pinel D., Martin V.J.J., Trevors J.T., Lee H.: Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *J. Microbiol. Methods*. **81**, 179–186 (2010)
5. Bekker V., Dodd A., Brady D., Rumbold K.: Tools for metabolic engineering in *Streptomyces*. *Bioengineered*. **5**, 293–299 (2014)
6. Białas W., Wojciechowska D., Szymanowska D., Grajek W.: Optymalizacja procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi metodą powierzchni odpowiedzi. *Biotechnologia*, **4**, 183–199 (2009)
7. Biot-Pelletier D., Martin V.J.J.: Evolutionary engineering by genome shuffling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3877–3887 (2014)

8. Bonin S.: Tradycyjne metody modyfikacji drożdży (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 282–301
9. Brown T.A.: Genomy. PWN Wyd. Naukowe, Warszawa, 2001, s. 472
10. Chmiel A.: Biotechnologia podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. Naukowe PWN (wyd. 2), Warszawa, 1994, s. 364
11. Choudhary J., Singh S., Nain L.: Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Biotechnol.* **21**, 82–92 (2016)
12. Costa D.A., de Souza C.J.A., Costa P.S., Rodrigues M.Q.R.B., dos Santos A.F., Lopes M.R., Genier H.L.A., Silveira W.B., Fietto L.G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3829–3840 (2014)
13. Demain i Báez-Vásquez Demain A.L., Báez-Vásquez M.A.: Biofuels of the Present and the Future (w) New and Future Developments in Catalysis: Catalytic Biomass Conversion, red. S.L. Suib, Elsevier, 2013, s. 325–370
14. Edgardo A., Parra C., Rodriguez M., Jaime B.: Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **43**, 120–123 (2008)
15. Engel S.R., Cherry J.M. wsp.: The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3-Genes Genom. Genet.* **4**, 389–398 (2014)
16. Evans G.G., Furlong J.: Environmental Biotechnology: Theory and Application. John Wiley & Sons (wyd. 2), 2011, s. 11–48
17. Fernandes i Murray Fernandes S., Murray P.: Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation. *Bioeng Bugs.* **1**, 424–428 (2010)
18. Fiedurek J.: Biologiczne podstawy procesów mikrobiologicznych (w) Podstawy biotechnologii przemysłowej, red. W. Bednarski, J. Fiedurek, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 23007, s. 57–85
19. Goffeau A., Oliver S.G. i wsp.: Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563–567 (1996)
20. Gong G., Ma L., Chen X.: Isolation and improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for producing the distilled liquor. *J. Chem. Pharm. Res.* **6**, 283–288 (2014)
21. Gong J., Zheng H., Wu Z., Chen T., Zhao X.: Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnol. Adv.* **27**, 996–1005 (2009)
22. Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, **3**, 46–63 (2008)
23. Henderson C.M., Block D.E.: Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2966–2972 (2014)
24. Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J.: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 185–202 (2006)
25. Kroumov A.D., Modenes A.N., de Araujo Tait M.C.: Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochem. Eng. Journal*. **28**, 243–255 (2006)
26. Kumari R., Pramanik K.: Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *Biosci. Bioeng.* **114**, 622–629 (2012)
27. Kunicka A., Rajkowska K.: Charakterystyka mikroorganizmów. Drożdże (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania (tom I), red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
28. Ledakowicz S.: Od inżynierii metabolicznej przez biologię systemów do inżynierii biologicznej. *Inż. Ap. Chem.* **48**, 17–20 (2009)
29. Levin D.E.: Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. **189**, 1145–1175 (2011)
30. Lipińska E. Drożdże gorzelnicze i biosynteza etanolu (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 155–166
31. Liu Z.-H., Qin L., Zhu J.-Q., Li B.-Z. and Yuan Y.-J.: Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnol. Biofuels.* **7**, 167 (2014)
32. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebrat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **3**, 7–21 (2005)
33. Nicholl Nicholl D.S.T.: An introduction to genetic engineering, Cambridge University Press (wyd. 3), s. 327 (2008)
34. Orlean P.: Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Wall Genetics*. **192**, 775–818 (2012)
35. Oroscio F.L., Estrada S.M., Simbahan J.F., Alcantara V.A., Pajares I.G.: Genome shuffling for improved thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* 2013. *Philippine Science Letters*, **10**, 22–28 (2017)
36. Parekh i in. Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J.: Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287–301 (2000)
37. Pereira F.B., Romania A., Ruiz H.A., Teixeira J.A., Domingues L.: Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* **161**, 192–199 (2014)
38. Petri R., Schmidt-Dannert C.: Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. *Curr. Opinion Biotechnol.* **15**, 298–304 (2004)
39. Podgórska I., Solarz E.: Wykorzystanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zabezpieczaniu procesów fermentacyjnych. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, **3**, doi:10.15199/64.2016.3.6 (2016)
40. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttilä M.: Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS Yeast Res.* **3**, 185–189 (2003)
41. Rubin-Pitel S.B., Chao C.M.-H., Chen W., Zhao H.: Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development (w) Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, red. Yang S.-T., Elsevier, 2007, s. 49–72
42. Ruiz H.A., Silva D.P., Ruzene D.S., Lima L.F., Vicente A.A., Teixeira J.A.: Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. *Fuel*, **95**, 528–536 (2012)
43. Satyanarayana T., Kunze G.: Yeast biotechnology: diversity and applications, Springer Netherlands, 2009
44. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2003
45. Shi D.J., Wang C.L., Wang K.M.: Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 139–47 (2009)
46. Snoek T., Picca Nicolino M., Van den Bremt S., Mertens S., Saels V., Verplaetse A., Steensels J., Verstrepen K.J.: Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels.* **26**, 8–32 (2015)
47. Spencer J., Phister T.G., Smart K.A., Greetham D.: Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC Research Notes*, **7**, 151 (2014)

48. Steenles J., Snoek T., Meersman E., Picca Nicolino M., Voordeckers K., Verstrepen K.J.: Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 47–995 (2014)
49. Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J.: *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, San Diego, Academic Press, 1998, s. 725
50. Strąk E., Balcerek M.: Wybrane technologie wykorzystywane w przemyśle gorzelniczym, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **14**, 33–44 (2015)
51. Sybirny i in. Sybirny W., Puchalski Cz., Sybirny A.: Metaboliczna inżynieria drobnoustrojów do konstruowania wydajnych producentów bioetanolu z lignocelulozy. *Biotechnologia*, **4**, 38–54 (2007)
52. Świątek M., Lewandowska M., Bednarski W.: Doskonalenie procesów biotechnologicznych stosowanych w produkcji etanolu II generacji z surowców lignocelulozowych. *Postępy Nauk Rolniczych*, **1**, 121–131 (2011)
53. Tao i in. Tao X., Zheng D., Liu T., Wang P., Zhao W., Zhu M., Jiang X., Zhao Y., Wu X.: A Novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. *Plos One*, **7**, 1–10 (2012)
54. Walczak P., Kunicka A., Kręgiel D., Drewicz E.: Ulepszenie i przechowywanie mikroorganizmów (w) *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*, red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska (tom I), Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
55. Wallace V.: Improving stress tolerance in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic biomass department of chemistry, Lund University, praca doktorska, 2014
56. Wallace-Salinas V., Gorwa-Grauslund M.F.: Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol. Biofuels.* **6**, 151 (2013)
57. Wang M., Zhang W., Xu W., Shen Y., Du L.: Optimization of genome shuffling for high-yield production of the antitumor deacetylmycoepoxydiene in an endophytic fungus of mangrove plants. *Microbiol. Biotechnol. Appl.* 1–8 (2016)
58. Węgleński P., Golik P.: Inżyniera genetyczna (w) *Genetyka molekularna*, red. P. Węgleński. Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2008, s. 109–134
59. Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A.: Novel strategy for yeast construction using delta-integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1491–1498 (2010)
60. Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino Ch. Fukuda H., Kondo A.: Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol. Biofuels.* **4**, doi: 10.1186/1754-6834-4-8 (2011)
61. Zhang Y.X., Perry K. Vinci V.A., Powell K., Stemmer W.P.C., del Cardayre S.B.: Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, **415**, 644–646 (2002)
62. Zheng D.Q., Wu X.Ch., Wang P-M., Chi X-Q., Tao X-L., Li P. Jiang X-H., Zhao Y-H.: Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 415–422 (2011)