

MONIKA DZWONEK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ,  
WANDA DUSZKIEWICZ-REINHARD

### PRÓBA UZYSKANIA NOWEGO SZCZEPU WINIARSKIEGO NA DRODZE ELEKTROFUZJI PROTOPLASTÓW

#### Streszczenie

Przeprowadzono elektrofuzję protoplastów pomiędzy przemysłowym szczepem winiarskim *Saccharomyces cerevisiae* S.o./2 i szczepem *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637, stosowanym do odkwaszania moszczów gronowych po zakończeniu fermentacji alkoholowej. W celu wytypowania markerów pozwalających na izolację fuzantów określono zdolność obu szczepów drożdży do asymilacji różnych źródeł węgla oraz do wzrostu na podłożach o podwyższonym stężeniu sacharozy lub cykloheksimidu.

Przed procesem elektrofuzji optymalizowano protoplastyzację, stosując różne enzymy lityczne, dobierając odpowiednio ich dawki oraz kombinacje. Jednocześnie ustalono właściwe parametry przebiegu elektrofuzji.

Z grupy fuzantów wybrano dwie stabilne hybrydy (F1 i F2) i poddano charakterystyce w kierunku określenia zawartości DNA w komórce, zdolności przemiany kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego oraz produkcji etanolu. Otrzymane wyniki wskazują, że obydwa szczepy mają zwiększoną zawartość DNA w komórkach. Fuzanty prowadziły fermentację jabłczanowo-mleczanową o wydajności porównywalnej ze szczepem *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637 i fermentację alkoholową na poziomie porównywalnym ze szczepem *S. cerevisiae* S.o./2.

**Słowa kluczowe:** elektrofuzja protoplastów, fermentacja jabłczanowo-mleczanowa, *Saccharomyces cerevisiae*.

#### Wprowadzenie

Postęp w biotechnologii i inżynierii genetycznej umożliwił zastosowanie nowych metod genetycznej modyfikacji szczepów stosowanych w przemyśle fermentacyjnym. Dotychczas stosowane metody modyfikacji polegające na doborze naturalnym, selekcji oraz adaptacji środowiskowej są coraz częściej zastępowane technikami pozwalającymi na dokonywanie pożądaných zmian genetycznych w określonym

kierunku [9]. Najczęściej, z praktycznego punktu widzenia, manipulacje te prowadzą się do połączenia pozytywnych cech szczepów wyjściowych w celu otrzymania nowych szczepów o określonym fenotypie. Do najważniejszych metod modyfikacji genetycznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* należą: mutagenizacja, naturalna hybrydyzacja płciowa, cytotukcja, transformacja oraz fuzja protoplastów [1, 11, 12, 13].

Szczepy drożdży, które nie mogą w naturalny sposób łączyć się na drodze płciowej lub paraseksualnej mogą być krzyżowane na drodze somatycznej fuzji protoplastów. Od strony technicznej fuzję protoplastów można przeprowadzić dwoma sposobami. Pierwszy sposób polega na wirowaniu mieszaniny komórek pozbawionych ściany komórkowej w środowisku 30% glikolu polietylenowego (PEG) o masie cząsteczkowej 4000–6000. Drugim sposobem umożliwiającym rekombinację materiału genetycznego jest wykorzystanie zjawiska elektrofuzji protoplastów, podczas której pod wpływem pola elektrycznego następuje łączenie się komórek. Po prawidłowo przeprowadzonym procesie fuzji protoplastów należy stworzyć komórkom właściwe warunki regeneracji ściany komórkowej na odpowiednio skomponowanym podłożu izoosmotycznym. Podłoże regeneracyjne powinno zawierać także czynniki selektywne, umożliwiające wzrost jedynie produktom fuzji [4].

W procesie produkcji wina bardzo często istnieje konieczność obniżenia kwasowości moszczów. Nadmiar kwasów usunąć można przez kupażowanie i rozcieńczanie, na drodze chemicznej neutralizacji kwasów, jednakże techniki te nie zawsze prowadzą do pożądaných rezultatów i często związane są z pogorszeniem cech sensorycznych wina [14]. Kwasowość win gronowych pochodzi od dwóch kwasów: winowego i jabłkowego, który może być metabolizowany przez bakterie mlekowe *Leuconostoc oenos* i *Lactobacillus plantarum* oraz drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe*, prowadząc do obniżenia kwasowości ogólnej wina [4, 14]. Drożdże winiarskie *S. cerevisiae* prowadzą biodegradację kwasu jabłkowego na bardzo niskim poziomie, a wprowadzenie do procesu fermentacji win innych mikroorganizmów wiąże się z wystąpieniem niekorzystnych interakcji pomiędzy populacjami, co przyczynia się do obniżenia cech jakościowych produktu finalnego [3, 5].

Celem pracy było uzyskanie techniką elektrofuzji protoplastów nowego szczepu przemysłowych drożdży winiarskich o zdolnościach przeprowadzania fermentacji jabłczanowo-mleczanowej.

### **Materiał i metody badań**

Materiał badawczy stanowiły szczepy: *Saccharomyces cerevisiae* S.o./2 rasy Bratysława, pochodzący z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii

i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie oraz rho<sup>-</sup> mutant szczepu *S. cerevisiae* ATTC 38637, mający zdolność przemiany kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego.

W celu wytypowania markerów umożliwiających izolację produktów fuzji określano wybrane cechy szczepów rodzicielskich użytych do fuzji, takie jak: zdolność do asymilacji różnych źródeł węgla oraz oporność na podwyższone stężenie sacharozy i cykloheksimidu [8].

Zdolność obu szczepów do asymilacji różnych źródeł węgla określano za pomocą komercyjnego testu API 20C AUX (BioMerieux nr katalogowy: 20210), zawierającego 20 różnych związków węgla, które mogą być wykorzystywane przez drożdże do wzrostu. Wynik testu odczytywano po 72 godz. inkubacji w temp. 28°C na podstawie zmętnienia podłoża.

Oporność szczepów na podwyższone stężenia sacharozy oceniano na podstawie wzrostu na zmodyfikowanym podłożu YPD zawierającym: 1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu oraz w miejsce glukozy wprowadzono sacharozę w ilości odpowiednio: 10, 20, 30 lub 40%, 2% agaru, pH 5,5.

Oporność badanych szczepów na cykloheksimid sprawdzano na podłożu SD (0,67% YNB, 1% glukozy, 2% agaru, pH 5,5), do którego dodawano cykloheksimid (Sigma nr kat.C7698) w stężeniu: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 i 4,0 µg/ml podłoża. Hodowle prowadzono w temp. 28°C przez 5 dni. Wyniki interpretowano na podstawie zdolności wzrostu badanych szczepów na danym podłożu.

Optymalizację protoplastyzacji komórek szczepów rodzicielskich wykonywano w następujący sposób. Szczepy rodzicielskie hodowano osobno na płynnym podłożu YPG (1% ekstrakt drożdżowy, 2% peptonu, 2% glukozy). Komórki w logarytmicznej fazie wzrostu odwirowywano (EPPENDORF, Eppendorf Centrifuge 5804 R, 4 000 rpm, 3 min.), dwukrotnie przemywano jałową wodą i zawieszano w 50 mM EDTA z dodatkiem 0,5% 2-merkaptetanolu. Zawiesinę inkubowano w temp. 30°C przez 30 min. Następnie komórki odwirowywano (EPPENDORF, Mini Spin Plus, 1 000 rpm, 1 min.) i zawieszano w roztworze o składzie: 10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1,2 M sorbitol, 10 mM EDTA, do którego dodawano odpowiedni preparat enzymatyczny w określonej dawce. Sprawdzone skuteczność działania następujących enzymów: preparat enzymatyczny z *Trichoderma harzianum* (Sigma nr kat. L2265) w dawce 0,0015 g i 0,0030 g; preparat enzymatyczny z *Rhisoctonia solani* (Sigma nr kat. L8757) w dawce 0,015 g i 0,030 g; β-glukuronidaza (Serva nr kat. 22867) w dawce 0,2 ml i 0,3 ml; litikaza (Sigma nr kat. L-2524) w dawce 300 u i 500 u; litikaza w dawce 500 u łącznie z β-glukuronidazą w dawce 0,3 ml; litikaza w dawce 500 u łącznie z preparatem enzymatycznym z *Rhisoctonia solani* w dawce 0,030 g. Protoplastyzację prowadzono w temp. 37°C przez 30 min [4, 10]. Stopień protoplastyzacji oceniano mikroskopowo, licząc komórki w komorze Thoma, na

podstawie zmiany kształtu sprotoplastyzowanych komórek. Wynik podawano w procentach protoplastów względem ogólnej liczby komórek.

Przygotowanie protoplastów do elektrofuzji polegało na przemyciu ich w buforze 10 mM Tris-HCl (pH 7,0) i zawieszeniu w 1,2 M sorbitolu. Następnie mieszano równe objętości protoplastów dwóch szczepów rodzicielskich i wprowadzano do komory fuzyjnej podłączonej do generatora napięcia (KRUSS, komora ramkowa, generator napięcia BIO-JET CF 50). Elektrofuzję protoplastów szczepów rodzicielskich prowadzono przy parametrach zbliżonych do opisanych przez Gniewosz i wsp. [2]: częstotliwość 2 000 kHz, napięcie pola zmiennego 5–20 V, amplituda impulsu prostokątnego 30–140 V, liczba impulsów 2–4, czas trwania impulsów 40–60  $\mu$ s, odstęp pomiędzy impulsami 1–10 s. Po elektrofuzji protoplasty regenerowano w 1,2 M sorbitolu przez 12 godz., a następnie hodowano na podłożu selekcyjnym o składzie: 0,67% YNB, 2% glicerolu, 1  $\mu$ g/ml podłoża cykloheksimidu, 2% agaru w temp. 28°C przez 10 dni. Uzyskane kolonie poddawano selekcji poprzez dziesięciokrotne przeszczepianie na podłoże selekcyjne, celem wyeliminowania niestabilnych hybryd.

W uzyskanych fuzantach określano ilość DNA izolowaną z  $10^6$  komórek zgodnie z protokołem lizy alkalicznej, dezintegrując komórki za pomocą kulek szklanych i mierząc ilość otrzymanego DNA spektrofotometrycznie (BIO-RAD, Smart Spec<sup>TM</sup> 3 000) przy długości fali 320 nm [6]. Określano także ich zdolności asymilacyjne, oporność na wysokie stężenia sacharozy i cykloheksimidu w podłożu. Przeprowadzono fermentację winiarską przez 28 dni w temp. 22°C na podłożu modelowym, sporządzonym na bazie odkwaszonego koncentratu gronowego o ekstrakcie 25°Błg, którego kwasowość odtwarzano do poziomu charakterystycznego dla moszczy gronowych przez dodatek 6 g/dm<sup>3</sup> moszczu kwasu jabłkowego i 4 g/dm<sup>3</sup> kwasu winowego [14]. Po zakończonej fermentacji określano ilość uzyskanego alkoholu etylowego [7] oraz zawartość kwasu D-mlekowego metodą enzymatyczną za pomocą komercyjnych zestawów firmy Boehringer Mannheim [nr kat. 11112821035], monitorując przebieg reakcji spektrofotometrycznie (BIO-RAD, Smart Spec<sup>TM</sup> 3 000) przy długości fali 340 nm.

## Wyniki i ich omówienie

W tab. 1. przedstawiono zdolności asymilacji różnych źródeł węgla przez szczepy rodzicielskie *S.o./2* i rho<sup>-</sup> ATCC 38637. Szczepy te mogą wykorzystywać do swojego wzrostu tylko sześć spośród dziewiętnastu badanych związków. Pięć z nich może być wykorzystywanych zarówno przez szczep *S.o./2*, jak i rho<sup>-</sup> ATCC 38637 i są to: glukoza, maltoza, sacharoza, trehaloza i rafinoza. Natomiast szczepy te różnią się zdolnością wykorzystania galaktozy, której nie asymiluje *S.o./2* oraz glicerolu, którego nie wykorzystuje drugi szczep rodzicielski rho<sup>-</sup> ATCC 38637.

Szczepy te różniły się także opornością na cykloheksimid znajdujący się w podłożu (tab. 2). Szczep *S.o./2* był wysoce wrażliwy na dodatek cykloheksimidu do podłoża.

Już najmniejszy dodatek cykloheksymidu do podłoża w ilości 0,5 µg/ml hamował wzrost szczepu *S.o./2*, podczas gdy tolerancja szczepu ATCC 38637 była 8-krotnie wyższa – zaobserwowano jego wzrost na podłożach zawierających nawet 4 µg cykloheksimidu /ml.

Tabela 1

Asymilacja związków węgla przez szczepy rodzicielskie *S. cerevisiae S.o./2* i *S. cerevisiae rho<sup>-</sup>* ATCC 38637.

Assimilation of the carbon sources by two parental strains *S. cerevisiae S.o./2* and *S. cerevisiae rho<sup>-</sup>* ATCC 38637.

Szczep Strain	Źródło węgla / Carbon source																		
	G L U	G L Y	2 K G	A R A	X Y L	A D O	X L T	G A L	I N O	S O R	M D G	N A G	C E L	L A C	M A L	S A C	T R E	M L Z	R A F
<i>S.o./2</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>rho<sup>-</sup></i> ATCC 38637	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

Objaśnienia: / Explanatory notes:

GLU – glukoza / glucose; GLY – glicerol / glycerol; 2KG – 2-keto-D-glukagon / 2-keto-D-glucagon; ARA – arabinoza / arabinose; XYL – ksyloza /xylose; ADO – adonitol /adonitol; XLT – ksylitol /xylitol; GAL – galaktoza / galactose; INO – inozytol / inositol; SOR – sorbitol / sorbitol; MDG – α-metylo-D-glukoza / α-methyl-D-glucose;NAG – N-acetylo-D-glukoza / N-acethyl-D-glucose; CEL – celobioza / cellobiose; LAC – laktoza / lactose; MAL – maltoza /maltose; SAC – sacharoza /saccharose; TRE – trehaloza / trehalose; MLZ – melecytoza / melesitose; RAF – rafinoza / rafinose;

+ – asymilacja / assimilation occurred; - – brak asymilacji / no assimilation occurred.

Tabela 2

Oporność na cykloheksimid szczepów rodzicielskich *S. cerevisiae S.o./2* i *S. cerevisiae rho<sup>-</sup>* ATCC 38637. Resistance of two parental strains *S. cerevisiae S.o./2* and *S. cerevisiae rho<sup>-</sup>* ATCC 38637 to cycloheximid.

Szczep Strain	Cykloheksimid / Cycloheximid [µg/ml]							
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
<i>S.o./2</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>rho<sup>-</sup></i> ATCC 38637	+	+	+	+	+	+	+	+

+ – wzrost / growth occurred;

- – brak wzrostu / no growth occurred.

Następnie sprawdzono oporność szczepów rodzicielskich na duże stężenie sacharozy w podłożu, wynoszące od 10 do 40%, a wyniki tego doświadczenia przedstawiono w tab. 3.

Tabela 3

Zdolność wzrostu szczepów rodzicielskich *S. cerevisiae* S.o./2 i *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637 w podłożu z dużą zawartością sacharozy.

Growth ability of two parental strains *S. cerevisiae* S.o./2 and *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637 in a medium with a high saccharose content.

Szczep Strain	Sacharoza / Saccharose [%]			
	10	20	30	40
S.o./2	+	+	+	+
rho <sup>-</sup> ATCC 38637	+	+	+	+

+ – wzrost / growth occurred;

-- brak wzrostu / no growth occurred.

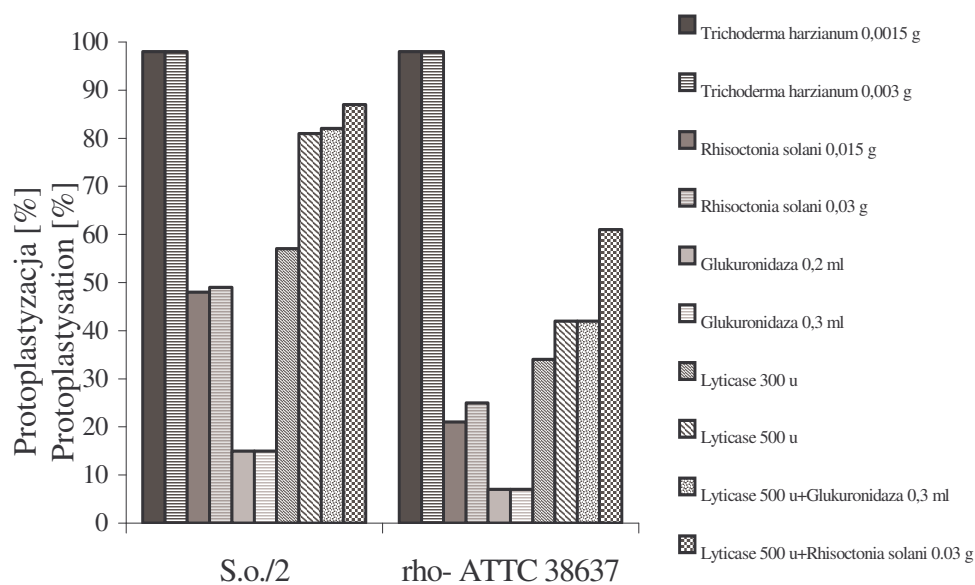
Badane szczepy wykazywały taką samą tolerancję względem dużych stężeń sacharozy, co wyrażało się ich dobrym wzrostem zarówno na podłożu z 10%, jaki i 40% zawartością tego cukru.

Spośród przebadanych cech szczepów rodzicielskich udało się wytypować markery umożliwiające izolację fuzantów po przeprowadzonej elektrofuzji. Są to cykloheksimid w stężeniu 1 µg/ml podłoża, uniemożliwiający wzrost komórek szczepu S.o./2 oraz glicerol (jako jedyne źródło węgla) niewykorzystywany przez szczep rho<sup>-</sup> ATCC 38637. Fuzanty, które będą pochodziły z hybrydyzacji somatycznej protoplastów obu szczepów powinny wykazywać dobry wzrost w obecności obu tych związków.

Następnie przystąpiono do optymalizacji enzymatycznej protoplastyzacji szczepów rodzicielskich. W badaniach wykorzystano cztery enzymy lityczne w dwóch dawkach dodawanych osobno oraz dwie kombinacje składające się z dwóch enzymów litycznych dodawanych do zawiesiny komórek łącznie, a wyniki zilustrowano na rys. 1. Ściana komórkowa szczepu rho<sup>-</sup> ATCC 38637 była znacznie trudniejsza do usunięcia w porównaniu ze szczepem S.o./2. Jedyne preparat z *Trichoderma harzianum* protoplastyzował komórki tego szczepu na poziomie powyżej 75%. W przypadku szczepu S.o./2 poziom ten osiągnęto, stosując oprócz preparatu z *Trichoderma harzianum* enzym litikazę w dawce 500 u. Połączenie litikazy z β-glukuronidazą wpłynęło na znaczne podwyższenie wydajności protoplastyzacji tego szczepu.

Najefektywniej działającym enzymem na ściany komórkowe obydwu szczepów był preparat enzymatyczny z *Trichoderma harzianum*, który w dawce 0,0015 g protoplastyzował komórki obu szczepów na poziomie 97%. Najslabiej oddziaływała β-glukuronidaza na ściany komórkowe szczepu S.o./2 i rho<sup>-</sup> ATCC 38637, dając

odpowiednio 15 i 7% protoplastów. Pomimo zwiększenia jej dawki z 0,2 ml na 0,3 ml efektywność jej działania nie poprawiła się. Uzyskano podwyższenie liczby protoplastów do poziomu powyżej 75% w przypadku szczepu *S.o./2* łącząc litikazę w dawce 500 u z  $\beta$ -glukuronidazą w dawce 0,3 ml oraz preparatem z *Rhisoctonia solani* w dawce 0,03 g. W przypadku szczepu rho<sup>-</sup> ATCC 38637, nie zaobserwowano tak wyraźnej poprawy procesu.



Rys. 1. Protoplastyzacja komórek szczepów rodzicielskich *S. cerevisiae S.o./2* i *S. cerevisiae rho<sup>-</sup> ATCC 38637* z zastosowaniem różnych enzymów.

Fig. 1. Cell protoplastisation of two parental strains *S. cerevisiae S.o./2* and *S. cerevisiae rho<sup>-</sup> ATCC 38637* by applying various types of enzymes.

W wyniku przeprowadzonej elektrofuzji badanych szczepów na podłożu selekcyjnym uzyskano kilkadziesiąt kolonii, które poddawano selekcji poprzez dziesięciokrotne przeszczepianie na podłożę selekcyjne, celem wyeliminowania niestabilnych hybryd. Dwa z nich oznaczone jako F1 i F2 okazały się stabilne i zostały skierowane do kolejnych badań.

Uzyskane fuzanty miały cechy charakterystyczne dla obydwu szczepów rodzicielskich (zdolność wykorzystywania glicerolu i oporność na cykloheksimid w podłożu). W celu stwierdzenia hybrydyzacji materiału genetycznego w fuzantach przeprowadzono izolację całkowitego DNA ze szczepów F1 i F2 oraz porównano go z zawartością DNA szczepów rodzicielskich. Wyniki pomiarów przedstawiono w tab. 4.

Tabela 4

Zawartość całkowitego DNA/10<sup>6</sup> komórek szczepów rodzicielskich *S. cerevisiae* *S.o./2* i *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637 oraz fuzantów tych szczepów F1 i F2.  
Total DNA content/10<sup>6</sup> cells of two parental strains *S. cerevisiae* *S.o./2* and *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637 and fusants F1 and F2.

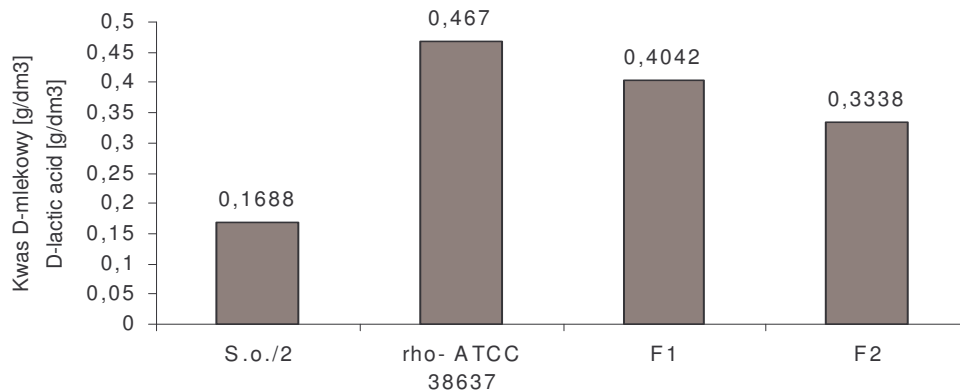
Szczep Strain	Zawartość całkowitego DNA [μg/10 <sup>6</sup> komórek] Total DNA content [μg /10 <sup>6</sup> cells]
<i>S.o./2</i>	1,16
rho <sup>-</sup> ATTC 38637	1,21
F1	1,34
F2	1,28

Zaobserwowano zwiększenie ilości materiału genetycznego w komórkach fuzantów F1 i F2 względem *S.o./2* odpowiednio o 15,3 i 10,6% oraz względem szczepu rho<sup>-</sup> ATTC 38637 odpowiednio o 10,6 i 6,0%.

W celu określenia zdolności fuzantów do przeprowadzania fermentacji jabłczanowo-mleczanowej oraz fermentacji alkoholowej, namnożonymi kulturami drożdży rodzicielskich: *S.o./2* i rho<sup>-</sup> ATCC 38637 oraz fuzantami: F1 i F2 szczepiono modelowe nastawy winiarskie, prowadząc fermentacje przez 28 dni w 22°C, analizując po jej zakończeniu wybrane parametry wina.

Szczep rodzicielski rho<sup>-</sup> ATCC 38637 ma zdolność przeprowadzania fermentacji jabłczanowo-mleczanowej. W celu porównania właściwości technologicznych fuzantów ze szczepami rodzicielskimi oznaczono ilość kwasu D-mlekowego w winie. Wyniki przedstawiono na rys. 2.

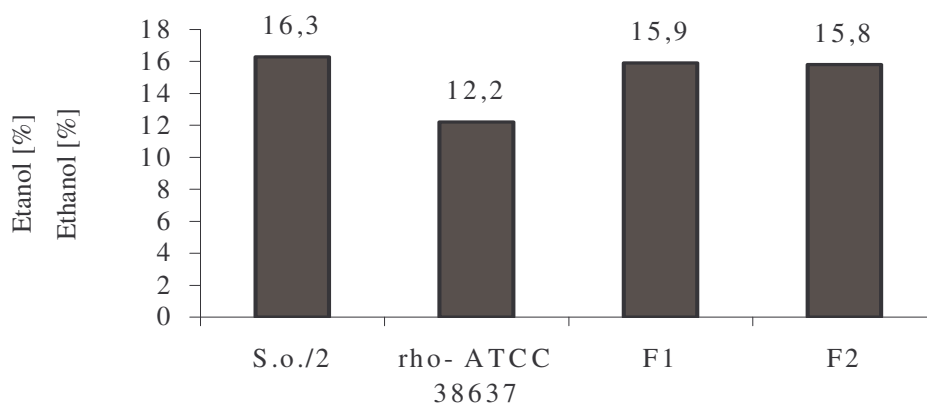




Rys. 2. Zawartość kwasu D-mlekowego w winie (wartości średnie z trzech serii).

Fig. 2. D-Lactic acid content in wine (average values for 3 series).

Wina wytwarzane przez szczep *S.o./2* zawierały znacznie mniejsze ilości kwasu D-mlekowego w porównaniu ze szczepem  $\rho^-$  ATCC 38637, jak również w odniesieniu do otrzymanych fuzantów. Ilość uzyskanego kwasu D-mlekowego w winach wytworzonych przy udziale szczepów F1 i F2 była znacznie większa niż w przypadku win uzyskanych przez szczep rodzicielski *S.o./2*, zawierając odpowiednio 86 i 71% ilości kwasu D-mlekowego obecnego w winach wytworzonych przez drugi szczep rodzicielski  $\rho^-$  ATCC 38637.



Rys. 3. Zawartość alkoholu etylowego w winie (wartość średnia z 3 serii).

Fig. 3. Ethanol content in wine (average value for 3 series).

Szczep rodzicielski *S.o./2* przeprowadzał fermentację alkoholową z dużą wydajnością, warunkując uzyskanie win o dużej mocy. Aby określić, czy otrzymane fuzanty mają również zdolności produkcji win zawierających duże ilości alkoholu

etylowego, po zakończonej fermentacji oznaczono jego zawartość. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 3.

Szczepy fuzantów charakteryzowały się przeprowadzaniem fermentacji alkoholowej na poziomie zbliżonym do szczepu rodzicielskiego *S.o./2*. Znacznie mniejszym uzyskiem alkoholu etylowego cechowały się wina wytworzone przez drugi szczep rodzicielski rho<sup>-</sup> ATCC 38637, produkujący zaledwie 12,2% alkoholu etylowego.

### Wnioski

1. Dobrymi markerami do selekcjonowania fuzantów po procesie fuzji okazały się: glicerol, będący jedynym źródłem węgla w podłożu selekcyjnym i cykloheksimid w dawce 1,0 µg/ml podłoża selekcyjnego.
2. Spośród badanych preparatów enzymatycznych do protoplastyzacji szczepów *S.o./2* i rho<sup>-</sup> ATCC 38637 najbardziej efektywny był preparat z *Trichoderma harzianum* w dawce 0,0015 g/10<sup>6</sup> komórek.
3. Fuzanty F1 i F2 wykazywały zwiększenie ilości DNA w komórkach względem szczepów rodzicielskich oraz miały zdolność wytwarzania kwasu D-mlekowego na poziomie zbliżonym do szczepu rodzicielskiego rho<sup>-</sup> ATCC 38637, a także produkowały duże ilości alkoholu etylowego, porównywalne z ilościami otrzymanymi od szczepu rodzicielskiego *S.o./2*.

### Literatura

- [1] Chmiel A.: Biotechnologia – Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. PWN, Warszawa 1991.
- [2] Gniewosz M., Raczyńska-Cabaj A., Duszkiewicz-Reinhard W., Stachura G.: Modification of wine yeasts from *Saccharomyces cerevisiae* by electrofusion of protoplasts. Pol. J. Food Nutri. Sci., 1999, **8/49**, 17-25.
- [3] Kunicka A., Szopa J.S.: Metabolizm kwasu jabłkowego u drożdży z rodzaju *Schizosaccharomyces* i *Saccharomyces*. Biotechnologia, 1996, **1 (32)**, 151-161.
- [4] Kunicka A., Szopa J.S.: Otrzymywanie międzyrodzajowych hybrydów drożdży *S. cerevisiae* i *S. pombe* na drodze fuzji protoplastów. Biotechnologia, 1998, **1 (40)**, 165-177.
- [5] Lonvaud-Funel A.: Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. FEMS Microbiology Letters., 1995, **126**, 209-214.
- [6] Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.: Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y 1982.
- [7] PN-90/A-79120.04. Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego.
- [8] Perez F., Regodon A., Valdes E. De Miguel C., Ramirez M.: Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeast in wine fermentations. Food Microbiol., 2000, **17**, 119-128.
- [9] Pretorius I.S., Bauer F.F.: Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. Trends Biotechnol., 2002, **20 (10)**, 426-433.

- [10] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: Methods in yeast genetics. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- [11] Spencer J.F.T., Spencer D.M., Bizeau C., Vaughan A., Martini A.: The use of mitochondrial mutants in hybridisation of industrial yeast. Current Genetics, 1985, **9**, 623-625.
- [12] Spencer J.F.T., Spencer D.M.: The use of mitochondrial mutants in hybridisation of industrial yeast. Current Genetics, 1981, **4**, 177-180.
- [13] Szopa J.S., Gańczyk B., Kowal K., Zwoliński G.: Melibiose-fermenting osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. Acta Alim. Pol., 1990, **16 (40)**, 3-4.
- [14] Wzorek W., Pogorzelski E.: Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. Wkładka do miesięcznika Przem. Ferm. Owoc. Warz. Wyd. Sigma-NOT Sp. z o.o. Warszawa 1998.

### AN ATTEMPT TO OBTAIN A NEW WINE-MAKING YEAST STRAIN BY THE PROTOPLAST ELECTROFUSION

#### S u m m a r y

A protoplast electrofusion was carried out between two industrial wine-making strains: *Saccharomyces cerevisiae* S.o./2 and *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637; the latter one is used to regulate acidity in grape wines after the completed alcoholic fermentation. For the purpose of selecting markers, which enable the isolation of fusants, there was determined the ability of the two strains to assimilate different types of carbon sources, as well as the their ability to grow on a medium with an increased content of saccharose and cycloheximide.

Prior to starting the electrofusion process, the protoplastisation was enhanced by applying changing amounts and combinations of various types of lytical enzymes. Also, optimal parameters of the electrofusion process were determined.

From a group of fusants, two stable hybrids (F1 and F2) were selected and described in order to determine the following parameters: DNA content in a cell, their ability to convert malic acid into lactic acid, and their potential to produce ethanol. The results obtained prove that the two strains investigated contain an increased content of DNA in cells. The yield of a malolactic fermentation as provided by the fusants was comparable to the yield of malolactic fermentation run by the strain *S. cerevisiae* rho<sup>-</sup> ATCC 38637, and the yield of the alcoholic fermentation run by these fusants was comparable to the alcoholic fermentation yield provided by the strain *S.cerevisiae* S.o./2.

**Key words:** protoplast electrofusion, malolactic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*. 