

RNDr. VLADIMÍR JIRKŮ, CSc., Vysoká škola chemickotechnologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: kvasinky, buňka, ethanol, inhibice, tolerance k ethanolu, terčová struktura, hraniční koncentrace, fermentativní aktivita, biologická (cytoplazmatická) membrána, osmotický tlak, integrita membrány, genetická determinace, teplota

Pivovarství, vinařství, výroba saké a lihovarství obecně patří k průmyslovým odvětvím s nesmírně dlouhým vývojem. Společným prvkem tohoto vývoje není jen produkce ethanolu kvasinkami rodu *Saccharomyces*, ale i problematika tolerance kvasinkové buňky k tomuto produktu její metabolické aktivity. Můžeme však říci, že teprve od druhé poloviny minulého století jsou získávány exaktní poznatky vedoucí k názoru, že tolerance (aktuální citlivost) kvasinkové buňky k ethanolu je výsledkem celé řady faktorů. Jejich detailní poznání se nyní chápe jako základní podmínka cílených manipulací a kroků, které by optimalizovaly tuto průmyslově významnou vlastnost kvasinkové buňky.

Otázky spojené s pojmem „tolerance k ethanolu“ se týkají fyziologické podstaty této vlastnosti, její genetické determinace a regulace, mechanismu exkrece ethanolu a terčových struktur a procesů, na kterých je realizován toxický a inhibiční účinek ethanolu. Přibližně do poloviny 70. let bylo možno řešení těchto otázek dokumentovat pouze dílčími pohledy nevelkého počtu publikací. Výrazné zvýšení vědeckého zájmu o tuto problematiku stimulovala až energetická krize, přesněji snaha o nahrazení fosilních paliv produkty založenými na ethanolu. Společným jmenovatelem současného zájmu je nadprodukce ethanolu, v jejímž řešení je otázka citlivosti producenta základní.

1. Základní metodické aspekty

Stanovení ethanolové tolerance buněčné populace producenta je nejčastěji založeno na určení koncentrace ethanolu, při které dochází k úplné inhibici růstu a reprodukce producenta v definovaných podmínkách „batch“ kultivace. Tento způsob byl v komparativních studiích tolerance pravděpodobně poprvé použit koncem 50. let [1] a jeho podstatou je zachování schopnosti růstu buněčné populace v 10 ml definovaného média s obsahem 1 až 14 obj. % ethanolu. Nejvyšší koncentrace ethanolu neovlivňující růst a reprodukci po daném intervalu kontaktu buněk s ethanolem je označována jako hraniční koncentrace ethanolové tolerance. Na základě tohoto přístupu byly kvasinkové kmeny děleny do třech kategorií: málo tolerantní (3 až 6 obj. %); středně tolerantní (6 až 10 obj. %) a vysoce tolerantní (10 až 13 obj. %).

Aplikace této metody nebraly delší dobu v úvahu vliv vypařování ethanolu a další faktory ovlivňující přesnost stanovení [2]. Potenciální nepřesnosti již odstraňuje metoda zavedená v roce 1975 [3], jejíž podstatou je dosažení nárůstu 10^5 buněk ml^{-1} , a to v prostředí definovaného média s ethanolem, při teplotě 20 °C a výchozí inokulaci 50 až 100 buňkami ml^{-1} . V roce 1980 Rose [4] definuje toleranci k ethanolu na základě koncentrace, která právě inhibuje růst a reprodukci testovaného kmeny. Podstatné je, že tato metoda již zahrnuje vliv faktorů, které ethanolovou toleranci ovlivňují, tj. vliv teploty, vypařování ethanolu, koncentrací substrátů, zastoupení nutričně významných složek a způsobu přípravy inokula testované buněčné populace. Variace této kategorie metod se dále týkaly organizace a uspořádání experimentu [5–7].

Jiný způsob stanovení tolerance k ethanolu je porovnání fermentativní aktivity kultury inkubované v přítom-

nosti a nepřítomnosti ethanolu [8–10]. Obecnou nevýhodou těchto metod je skutečnost, že nevyjadřují toleranci k ethanolu v absolutních koncentracích.

Způsob, který je založen na stanovení reprodukční schopnosti populace vystavené a nevystavené účinku ethanolu [2, 3, 11], umožňuje přesně sledovat ethanolovou toleranci na pozadí vlivu nutričních faktorů a podmínek kultivace. Zachování reprodukční schopnosti může být rovněž použito jako selekční tlak v případech izolace mutantů se zvýšenou tolerancí k ethanolu [12]. Samostatnou kategorií jsou metody definující toleranci k ethanolu jako maximální možnou produkci ethanolu testovanou buněčnou populací [13, 14].

Je zřejmé, že tolerance kvasinkových buněk k ethanolu, definovaná absolutní koncentrací ethanolu, která ještě neovlivňuje určitou charakteristiku testované buněčné populace, bude určena vlastní citlivostí této charakteristiky k ethanolu. Jinými slovy, stanovení ethanolové tolerance založené pouze na jediné metodě může vést ke zkresleným závěrům, a to zvláště při konfrontaci s údaji získanými jinou metodou. Důvodem je jednak komplexní charakter toxického účinku ethanolu a jeho různá odezva ve sledovaných vlastnostech buňky, jednak vliv podmínek, při kterých dochází ke kontaktu buňky s ethanolem.

2. Mechanismus toxického účinku ethanolu

Terčovou strukturou buňky, se kterou je bezprostředně spojován toxický (inhibiční) účinek ethanolu, je její biologická, cytoplazmatická membrána. Vývoj poznatků v tomto směru vycházel jednak ze samostatného studia biologické membrány (stavba, složení, vztah struktury a funkce) a studia její úlohy v buněčných procesech, jednak z poznatků, že citlivost buňky k ethanolu je ovlivněna hladinou a zastoupením lipidů, které jsou součástí membrány. V současné době je k dispozici dostatek informací, které citlivost k ethanolu konfrontují s hladinou sterolů a nenasycených mastných kyselin. Z hlediska praktické aplikace těchto poznatků je klíčovým aspektem dané otázky zejména vliv dodávky kyslíku a to vzhledem k tomu, že biosyntéza určité části lipidové složky membrány je kyslíkem regulována [15–25]. Studium membránových lipidů zároveň ukázalo i možné adaptační změny, které podmiňují vývoj určité rezistence membrány v důsledku dlouhodobého kontaktu buňky s ethanolem [26].

Z hlediska mechanismu účinku lze shrnout, že ethanol snižuje integritu membrány, a to zeslabením a likvidací hydrofobních a Van der Waalsových interakcí [27]. V této souvislosti Dombek a Ingram [28] nedávno prokázali, že ethanol zvyšuje fluiditu membrány v jejích povrchových vrstvách. Z hlediska úlohy lipidové složky jsou pro praktickou aplikaci významné poznatky o stimulaci rezistence kvasinkové buňky k ethanolu přítomností dodané fosfolipidové frakce buněk *Aspergillus oryzae* [29]. Vztah složení cytoplazmatické membrány a její citlivosti k ethanolu ukazuje na závislost ethanolové tolerance na celkové fyziologii a biochemii buňky. Z hlediska známých závislostí je tedy možno shrnout, že citlivost k ethanolu může být obecně ovlivněna všemi faktory a vlivy kultivace, které celkovou fyziologii a biochemii buňky určují. V praxi to znamená, že potenciálně použitelné průmyslo-

vé substráty jsou z hlediska provozních kultivací producentů ethanolu různě vhodné.

3. Vliv osmotického tlaku a teploty

Vysoké koncentrace substrátů mohou inhibovat růst a fermentativní aktivitu kvasinkové populace v důsledku vysokého osmotického tlaku [30] i v důsledku vysokých hladin ethanolu, které jsou v těchto podmínkách rychle dosaženy. K substrátové inhibici růstu dochází však často v koncentracích, které ještě neinhibují fermentativní aktivitu [31]. Současné řešení tohoto problému spočívá v cílené přípravě osmotolerantních kvasinkových kmenů [32].

V případě vlivu teploty existuje dlouho empirická zkušenost, že přítomnost ethanolu mění výrazně závislost růstové charakteristiky kvasinkové buňky a její fermentativní aktivity na teplotě. Podobně jako v případě vlivu osmotického tlaku, vysvětluje se interakce teploty s ethanolovou tolerancí a produkcí ethanolu zvýšenou akumulací intracelulárního ethanolu při vyšších teplotách [33, 34]. Předpokladem této akumulace je indukované zastavení exportu ethanolu pravděpodobně v důsledku určitých změn transportních mechanismů membrány. Poslední práce však ukazují, že při vyšších teplotách je touto „termosenzitivní“ terčovou strukturou pro ethanol především membránový komplex mitochondrií [35, 36]. Snížení tolerance k ethanolu při vyšších teplotách lze rámcově vysvětlit tím, že interakce ethanolu s lipidovou složkou membrány násobí citlivost membrány k teplotě a opačně.

4: Genetika ethanolové tolerance

Otázky tohoto směru mohou vycházet ze zjištění, že v definovaných podmínkách se různé kvasinkové kmeny liší schopností tolerovat určitou koncentraci ethanolu. Na druhé straně populace určitého kmene se v definovaných podmínkách vyznačuje poměrně přesně reprodukovatelnou schopností toxický účinek ethanolu tolerovat [37]. Vzhledem ke komplexnímu charakteru inhibičního účinku ethanolu je zřejmé, že tolerance k ethanolu, jako fenomén, je geneticky determinována, a to polygenově [38]. Haploidní potomstvo odvozené od diploidních kmenů rodu *Saccharomyces* vykazuje rozdíly v ethanolové toleranci ve srovnání s diploidním kmenem, přičemž hodnoty tolerance haploidního kmene nikdy nepřesahují hodnoty diploidního rodičovského kmene. Tato skutečnost přirozeně ztěžuje přípravu a izolaci mutantů s vysokou tolerancí k ethanolu [39]. Další komplikací v tomto směru je vlastní mutagenní účinek ethanolu [40]. Současné výsledky ukazují, že optimální příprava tolerantních kmenů bude možná cestou buněčného inženýrství [41], které umožňuje kombinaci i dalších vhodných vlastností producentů ethanolu. Pro selekci mutantů a hybridních kmenů jsou vhodné podmínky kontinuální kultivace [39]. V roce 1983 byl identifikován možný genetický marker ethanolové tolerance (mutace pep. 4.3). Mutace tohoto lokusu podmiňují membránové změny, které jsou podstatou snížení citlivosti k ethanolu [42].

Uvedený přehled je orientován na shrnutí literárních odkazů, které se týkají pouze základních otázek a poznatků zmíněné problematiky. V přehledu nejsou shrnuty poznatky z oblasti extracelulárního transportu ethanolu, měření intracelulárních hladin ethanolu a především problematika strategie a reorganizace technologií, směřující ke snížení toxického účinku ethanolu.

Literatura

- [1] RANGANATHAN, B. and BAHT, J. V.: J. Indian Inst. Sci. **40**, 1958, s. 105
- [2] INOUE, T., TAKAOKA, Y. and HATA, S.: J. Ferment. Technol. **40**, 1982, s. 511
- [3] DAY, A., ANDERSON, E.E. and MARTIN, P. A.: Proc. 15th conv. Eur. Brew. Cong., IRL Press, Oxford, 1975, s. 377
- [4] ROSE, A. H.: Soc. Appl. Bacteriol. **9**, 1980, s. 103
- [5] WHITE, F. H.: Proc. 15th Inst. Brew. (Aust. and N. Z. Sect.), Inst. of Brewing, Sydney, 1978, s. 133
- [6] BECZE, G. I.: Biotechnol. Bioeng. **6**, 1964, s. 191
- [7] ISMAIL, A. A. and ALI, A. M. M.: Folia Microbiol. **16**, 1971, s. 346
- [8] NOSIRO, K. and OUCHI, K.: J. Soc. Brew. (Japan) **57**, 1982, s. 824
- [9] HAYASHIDA, S., FENG, D. and HONGO, M.: Agric. Biol. Chem. **39**, 1975, s. 1025
- [10] YAMASHIRO, K., SHIMOIDE, M., TANI, Y. and FUKAI, S.: J. Ferment. Technol. **44**, 1986, s. 602
- [11] KALMOKOFF, M. and INGLEDEW, W. M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **43**, 1985, s. 189
- [12] BROWN, S. W., OLIVER, S. G. and RIGHELATO, R. C.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **11**, 1981, s. 151
- [13] CASEY, G. P., MAGNUS, C. A. and INGLEDEW, W. M.: Biotechnol. Lett. **5**, 1983, s. 429
- [14] PIERCE, G. E., LITCHFIELD, J. H. and LIPINSKY, E. S.: Dev. Ind. Microbiol. **22**, 1980, s. 703
- [15] KLEIN, H. P.: J. Bacteriol. **69**, 1955, s. 620
- [16] POPIAK, G. and CORNFORTH, J. W.: Adv. Enzymol. **22**, 1960, s. 281
- [17] OLSON, J. A., LINDBERG, M.: J. Biol. Chem. **225**, 1957, s. 941
- [18] BLOOMFIELD, D. K. and BLOCH, K.: Biochim. Biophys. Acta **33**, 1958, s. 220
- [19] BLOOMFIELD, D. K. and BLOCH, K.: J. Biol. Chem. **235**, 1960, s. 337
- [20] AHVENAINEN, J.: J. Inst. Brew. **88**, 1982, s. 367
- [21] AHVENAINEN, J. and MAKINEN, V.: Proc. 18th Conv. Eur. Brew. Cong., IRL Press, Oxford, 1981, s. 285
- [22] THOMAS, D. S. and ROSE, A. H.: Arch. Microbiol. **122**, 1979, s. 49
- [23] CARRATORE, R. D., MORGANTI, C. and BRONZETTE, G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **123**, 1984, s. 188
- [24] MORTINA, T. and MIFUCHI, I.: Chem. Pharm. Bull. **34**, 1984, s. 1624
- [25] CHEN, E. C.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **39**, 1981, s. 117
- [26] INGRAM, L. O.: J. Bacteriol. **125**, 1976, s. 670
- [27] CAREY, V. C. and INGRAM, L. O.: J. Bacteriol. **154**, 1983, s. 1291
- [28] DOMBEK, K. M. and INGRAM, L. O.: J. Bacteriol. **157**, 1984, s. 233
- [29] HAYASHIDA, S., FENG, D., OHTA, K. and HONGO, M.: Agric. Biol. Chem. **40**, 1976, s. 73
- [30] HAHN-HAGERDAL, B., LARSSON, M. and MATTIASON, B.: Biotechnol. Bioeng. Symp. **12**, 1982, s. 199
- [31] STREHAINO, P. and GOMA, G.: Am. J. Enol. Vitic. **34**, 1983, s. 1
- [32] JONES, L. P., ALEXANDER, D. and ZAJIC, J. E.: Dev. Ind. Microbiol. **23**, 1981, s. 367
- [33] NAVARRO, J. M. and DURAND, G.: Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) **129B**, 1978, s. 215
- [34] NAGODAWITHANA, T. W., CASTELLANO, C. and STEINKRAUS, K. H.: Appl. Microbiol. **28**, 1974, s. 383
- [35] CABECA-SILVA, C., MADEIRA-LOPES, A.: FEMS Microbiol. Lett. **15**, 1982, s. 149
- [36] VAN UDEN, N., LEO, C., SA-CORREIA, I. and LOUREIRO, V.: Proc. 19th Cong. Eur. Brew. Conv. IRL Press, Oxford, 1983, s. 137
- [37] CAMPBELL, I.: J. Gen. Microbiol. **63**, 1971, s. 189
- [38] ISMAIL, A. A., and ALI, A. M. M.: Folia Microbiol. **16**, 1971, s. 353
- [39] BROWN, S. W. and OLIVER, S. G.: Eur. J. Appl. Microbiol. **15**, 1982, s. 119
- [40] ZAKHAROV, I. A. and BANDAS, E. L.: Sov. Genet. **15**, 1979, s. 620
- [41] PANCHAL, C. J., PEACOCK, L. and STEWART, G. G.: Biotechnol. Lett. **4**, 1982, s. 639
- [42] SUGDEN, P. A. and OLIVER, S. G.: Biotechnol. Lett. **5**, 1983, s. 419

Jirků, V.: Tolerance kvasinkové buňky k ethanolu. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 4, s. 106–108.

Současné chápání podstaty tolerance buňky k ethanolu je založeno na informacích získaných biologickými a biochemickými studiemi včetně průmyslové empirické zkušenosti. V této souvislosti se věnuje pozornost testování a definování ethanolové tolerance, mechanismu inhibičního účinku ethanolu, vlivu osmotického tlaku a teploty a genetice ethanolové tolerance.

Ирку, В.: Отношение дрожжевой клетки к этанолу. Квас. прум. **33**, 1987, № 4, стр. 106–108.

Современное понимание сущности толерантности клетки в отношении к этанолу основано на сведениях, полученных при биологическом и биохимическом исследовании, включая эмпирический опыт промышленности. В связи с тем внимание уделено проведению испытания и определения этанольной толерантности, механизмом ингибирующего действия этанола, влиянию осмотического давления и температуры и генетике толерантности в отношении к этанолу.

Jirků, V.: Ethanol Tolerance of Yeast Cell. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 4, pp. 106—108.

The present understanding of the essence of ethanol tolerance in cell is based on the information obtained from biological and biochemical studies, including industrial empirical experience. In this connection, our attention is paid to the assaying and defining of ethanol tolerance, mechanism of ethanol toxicity, influence of osmotic pressure and temperature and to the genetics of ethanol tolerance.

Jirků, V.: Toleranz der Hefezelle gegenüber Äthanol. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 4, S. 106—108.

Die gegenwärtige Auffassung der Toleranz der Hefezelle gegenüber Äthanol basiert auf Informationen, die durch biologische und biochemische Studien gewonnen bzw. durch industrielle empirische Erfahrung gesammelt wurden. In diesem Zusammenhang wird dem Testen und der Definition der Äthanoltoleranz, den Mechanismen der Inhibitionswirkung des Äthanols, dem Einfluß des osmotischen Drucks und der Temperatur und der Genetik der Äthanoltoleranz Aufmerksamkeit gewidmet.