

VPLYV IMOBILIZÁCIE NA ZLOŽENIE LIPIDOV VÍNNYCH KVASINIEK POČAS ETANOLOVÉHO STRESU

Ing. Jozef GREGO, Ing. Ján ŠAJBIDOR, CSc., Doc. Ing. Fedor MALÍK, CSc., Ing. Štefan KRÁSNY, Katedra biochemickej technológie CHTF, STU Bratislava

Kľúčové slová: *vínne kvasinky, imobilizácia, lipidy, etanolový stres*

663.3

Ú V O D

Je známe, že kvasinky reagujú na etanolový stres reštrukturalizáciou intracelulárnych lipidov [1,2]. Keďže prvým miestom kontaktu bunky s vonkajším prostredím je cytoplazmatická membrána, registrujeme zmeny v zložení sterolov [3], fosfolipidov [4] a mastných kyselín [5]. Uvedené zmeny môžeme považovať za súčasť mechanizmov prispôsobenia sa a charakter týchto zmien je v súlade s teóriou homeoviskózne adaptácie [6,7]. S určitým zjednodušením sa dá konštatovať, že dôsledky adaptácie smerujú k zachovaniu podobných fyzikálnych podmienok v cytoplazmatickej membráne ako boli pred stresom [8].

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* reaguje na prítomnosť etanolu poklesom obsahu nasýtených mastných kyselín, najmä kyseliny palmitovej - 16:0, oproti obsahu mononenasýtených kyselín, z ktorých je najhojnejšie zastúpená kyselina olejová - 18:1. Uvedené zmeny v profile mastných kyselín sú sprevádzané zvýšením obsahu sterolov. Intenzita a vzájomný pomer týchto zmien, ako aj charakter alternácií mastných kyselín, je špecifickou vlastnosťou kmeňa a závisí okrem genotypu najmä na intenzite stresového faktora [9,10]. Je známe, že kvasinky kultivované za anaeróbnych podmienok majú nižší obsah ergosterolu a nenasýtených mastných kyselín než aeróbne kultúry. Indukovaný stres sa preto na obraze lipidov anaeróbných kultúr prejaví menej [9].

Vínne kvasinky sú počas fermentácie dlhodobo vystavené etanolovému stresu. Imobilizáciou sa dostanú do prostredia, ktorého vplyv na niektoré fyziologické parametre kvasinkovej populácie je predmetom diskusií [11]. Najpoužívanjšou imobilizačnou technikou je metóda "entrapment", pri ktorej sú bunky uzatvárané do prírodných, alebo syntetických gélov. Pre potreby imobilizácie vínnych kvasiniek sa najčastejšie používa alginátový alebo pektátový gél. Bunky sa po imobilizácii dostávajú do prostredia s lokálnym prehustením biomasy, pričom na bunky pôsobí fyzikálnochemicky aj použitý gél. Tieto skutočnosti majú za dôsledok zmenu fyziologických vlastností imobilizovanej kultúry v porovnaní s jej voľnou formou. Podľa niektorých autorov sa imobilizované bunky menia morfológicky, majú iné rastové charakteristiky a mení sa aj aktivita enzýmov glykolýzy. Zmeny boli zaznamenané aj v zložení cytoplazmatickej membrány a bunkových stien [12]. Štúdiom vplyvu imobilizácie do alginátového gélu na zloženie vnútrobunkových lipidov vínnych kvasiniek sa zaoberala Fumi a kol. [13], ktorá uvádza niektoré odlišnosti medzi lipidmi imobilizovaných a voľných kvasiniek. Popisuje, že:

- zloženie fosfolipidov imobilizovaných buniek je porovnateľné s voľnými kvasinkami
- celkový obsah mastných kyselín je u imobilizovaných kvasiniek vyšší o približne jednu tretinu
- pomer voľných a viazaných mastných kyselín vo fosfolipide je u imobilizovaných kvasiniek vyšší

- u imobilizovaných kvasiniek bol zaregistrovaný vyšší podiel mastných kyselín s dlhým reťazcom ($C > 18$).

Z praktického hľadiska je zaujímavé, že zmena zloženia vnútrobunkového lipidu vplyva na rezistenciu kvasiniek voči etanolu. Táto technologicky významná vlastnosť vínnych kvasiniek je v korelácii s obsahom kyseliny olejovej v bunkovom lipide [14]. Vysoký obsah kyseliny olejovej vo fosfolipidoch a kyseliny palmitovej v esterifikovaných steroloch sú tiež v priamej súvislosti s prežívaním stresovaných buniek [15].

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv imobilizácie kmeňa vínnej kvasinky na obsah lipidov a profil mastných kyselín celkového lipidu.

MATERIÁL A METÓDY

Pracovali sme s kmeňom vínnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* 6C, ktorý bol izolovaný z dokvášajúceho vína odrody Rizling vlašský z juhomoravskej vinohradníckej oblasti. Je to alkoholrezistentný, hlbokoprekvášajúci kmeň vhodný pre technológiu výroby sektu.

Kvasničné bunky boli pomnožené v kvapalnom YM médiu (1% glukóza, 0,5% peptón, 0,3% kvasničný autolyzát, 0,3% sladový extrakt) na trepačke 24 hodín pri teplote 28 °C. Napropagovaná biomasa bola odstredená a v časti vzorky bola gravimetricky stanovená sušina. Na imobilizáciu buniek do 2% alginátového gélu sme použili metódu "entrapment". Suspenziu kvasiniek v sóle alginátu sodného sme po kvapkách gélovali v roztoku chloridu vápenatého 0,2 mol.l⁻¹. Tak sme pripravili preparát imobilizovaných kvasiniek vo forme gélových guľčiek s priemerom cca 2mm. Imobilizované kvasinky boli prenesené do fyziologického roztoku. Do ďalšej kadičky sme podobným spôsobom umiestnili približne také isté množstvo neimobilizovaných buniek a obe sme nechali adaptovať na rovnaké podmienky. Po uplynutí troch hodín sme kvasničné bunky resp. imobilizát oddelili od fyziologického roztoku odstredením resp. filtráciou. Obidve vzorky sme rozdelili na dva rovnaké podiely a prvý sme preniesli do rovnakého objemu 10% etanolu vo fyziologickom roztoku. Druhý podiel sme ponechali len v čistom fyziologickom roztoku bez etanolu. Za tri hodiny sme pôsobenie stresu prerušili odstredením resp. filtráciou a bunky ihneď podrobili extrakcii a následnej purifikácii podľa Folcha [16]. Pre porovnanie sme podobným spôsobom spracovali aj vzorku imobilizovaných kvasničných buniek po trojdňovej fermentácii ovocného muštu. Získané chloroformové extrakty sme na rotačnej vákuovej odparke zabuštili a gravimetricky stanovili obsah lipidu. Časť sme použili na spektrofotometrické stanovenie sterolov. Vo zvyšku lipidu sme analyzovali profil mastných kyselín plynovou chromatografiou [17].

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa súčasných poznatkov o adaptačných zmenách lipidov kvasiniek platí, že stres indukuje okrem iných efektov aj akumuláciu ergosterolu a kyseliny olejovej [10].

Na druhej strane prídavok sterolov [18] a kyseliny olejovej podporuje etanolovú toleranciu [19].

Posúdiť, či imobilizácia pôsobí ako stresový faktor nie je jednoduché. Naše výsledky potvrdili, že imobilizované bunky (IB) mali oproti voľným (FB) znížený obsah 16:0 a 16:1. Na druhej strane relatívne percento 18:0 + 18:1 bolo u IB vyššie než u FB. Dehydrogenácia kyseliny olejovej na 18:2 je viazaná na oxidáciu a preto prítomnosť viac než 6% 18:2 v IB je prekvapením. Zaujímavý je pokles obsahu sterolov po imobilizácii. Uvedené výsledky sú v súlade so zisteniami Fumi a kol. [14]. Je možné predpokladať, že kvasinka po imobilizácii reštrukturalizuje membránové lipidy v relatívne malom rozsahu.

Prítomnosť etanolu znížila detegované množstvo celkového lipidu v preparáte imobilizovaných (IE) ale aj voľných (FE) kvasiniek. Pokles je možné vysvetliť permeabilizáciou membrány a čiastočnou extrakciou lipidu do prostredia. Táto úvaha sa však nedá použiť pri interpretácii zmien v zastúpení mastných kyselín v preparátoch voľných (FE) alebo imobilizovaných (IE) buniek vystavených etanolovému pôsobeniu. Pokles v relatívnom percentuálnom obsahu 16:0 v FE alebo IE a súčasným zvýšením hladiny nenasýtených mastných kyselín môže byť výsledkom aktívneho procesu aktivácie dehydrogenácie mastných kyselín, alebo dôsledkom selektívnej etanolovej extrakcie lipidických štruktúr obsahujúcich najmä nasýtené mastné kyseliny. Druhá možnosť sa zdá menej pravdepodobná. Zaujímavý je výrazný rozdiel v obsahu sterolov medzi FE a IE. Je možné, že gélové prostredie bunkového nosiča bráni vyplavovaniu sterolov do prostredia v priebehu etanolového stresu.

Obsah lipidu, sterolov a profil mastných kyselín u imobilizovaných buniek po trojdňovej fermentácii muštu (M) sa oproti rovnakým parametrom u imobilizovaných buniek adaptovaných po dobu troch hodín na fyziologický roztok (IB) zmenil veľmi málo. Môžeme konštatovať, že rastová fáza nemala na sledované parametre imobilizovaných buniek signifikantný vplyv.

Tab.1. Vplyv imobilizácie a etanolového stresu na obsah lipidov, sterolov a zloženie mastných kyselín u vinárskeho kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* 6C.

| Označenie | Mastné kyseliny (%) | | | | | |
|-----------|---------------------|-------------|------|------|-------------|------|
| | Lipidy (%) | Steroly (%) | 16:0 | 16:1 | 18:0 + 18:1 | 18:2 |
| M | 14,2 | 0,28 | 15,3 | 43,2 | 35,3 | 6,0 |
| IE | 11,5 | 0,67 | 9,2 | 55,3 | 35,4 | - |
| IB | 13,8 | 0,39 | 14,7 | 41,8 | 36,6 | 6,7 |
| FB | 13,9 | 0,52 | 16,7 | 49,7 | 33,6 | - |
| FE | 10,1 | 0,28 | 8,5 | 57,2 | 34,2 | - |

FB - neimobilizované bunky po 3h vo fyziologickom roztoku

M - imobilizované bunky po 3 dňoch fermentácie muštu

IE - imobilizované bunky stresované 3h 10%-ným etanolom

IB - imobilizované bunky po 3h vo fyziologickom roztoku

FE - neimobilizované bunky stresované 3h 10%-ným etanolom
16:0=palmitová kys., 16:1=palmitoolejová kys., 18:0=stearová kys., 18:1=olejová kys., 18:2=linolová kys.

LITERATÚRA

- [1] INGRAM, L.O., BUTTKE, T.M.: Adv. Microb. Physiol. 25, 1984, s.253
- [2] ŠAJBIDOR, J., GREGO, J.: FEMS Microbiol. Lett., 93, 1992, s.13

- [3] HAYASHIDA, S., OHTA, K.: Agric. Biol. Chem. **44**, 1980, s. 2561
- [4] HUNTER, K., ROSE, A.H.: Biochim. Biophys. Acta **260**, 1972, s. 639
- [5] JONES, R.P., GREENFIELD, P.F.: Yeast **3**, 1987, s. 223
- [6] SINENSKU, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 1974, s. 522
- [7] KATES, M.: Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. In: Membrane fluidity (Kates, M. and Manson L.A. eds.) Plenum Publishing Corporation N.Y., 1984 s. 379-395
- [8] LITTLETON, J.M.: Brit. J. Alcohol Alcoholism **14**, 1979, s. 23
- [9] SILVA, M.T., NASAMENTO, M.T., CRUZ, J.M.: European Brewing Convention Proc. 14-th Cong. (Salzburg) 1973, s. 231
- [10] BEAVAN, M.J., CHARPENTIER, C., ROSE, A.H.: J. Gen. Microbiol. **128**, 1982, s. 1447
- [11] MALÍK, F., KRÁSNÝ, S., MINÁRIK, E.: Wein-Wiss. **47**, 1992, s. 28
- [12] HILGE, R., ROTMANN, B., REHM, H.J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **33**, 1990, s. 54
- [13] FUMI, H.D., TRIOLI, G., SILVA, A., BATTISOTTI, G., RAGG, E., FAORO, F.: Ind. del Bev. **19**, 1990, s. 394
- [14] ŠAJBIDOR, J., BREIEROVÁ, E., KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Microbiol. Lett., **58**, 1989, s. 195
- [15] MISHRA, P., PRASAD, R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**, 1989, s. 294
- [16] FOLCH, J., LESS, M., SLOANE-STANLEY, G.H.: J. Biol. Chem., **226**, 1957, s. 497
- [17] ŠAJBIDOR, J., KOPECKÁ, M., ŠANDULA, J., KAČURÁKOVÁ, M.: Microbios, **68**, 1991, s. 169
- [18] HOSSACK, J.A., ROSE, A.H.: J. Bacteriol., **127**, 1976, s. 67
- [19] GHAREIB, M., YOUSSEF, K.A., KHALIL, A.A.: Folia Microbiol. **33**, 1988, s. 447

Do redakce došlo 10.4.1994
Lektorovala Ing. V. Hönigová

Grego, J., Šajbidor, J., Malík, F., Krásny, Š.: Vplyv imobilizácie na zloženie lipidov vínnych kvasiniek počas etanolového stresu. Kvas. prům., **40**, 1994, č. 6, s. 169 - 171

Porovnanie zloženia imobilizovaných a neimobilizovaných buniek kmeňa vínnej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* 6C vystavených etanolovému stresu nasvedčuje tomu, že celkový dopad etanolového stresu na zloženie mastných kyselín je u imobilizovaných buniek o niečo menší ako u neimobilizovaných. Etanolový stres zvýšil v imobilizovaných a voľných bunkách zastúpenie kyseliny palmitolejovej na úkor kyseliny palmitovej. Charakter zmien zloženia lipidov pri imobilizácii vedie pravdepodobne k mierne zvýšenej odolnosti na stres. Imobilizované bunky sú odolnejšie aj voči pasívnej fluidizácii membrány etanolom.

Grego, J., Šajbidor, J., Malík, F., Krásny, Š.: The Influence of Immobilization on Wine Yeast Lipides Composition during Ethanol Stress. Kvas. prům., **40**, 1994, No. 6, pp. 169 - 171

Comparison of the lipid composition of immobilized and nonimmobilized cells of the wine cell strain *Saccharomyces cerevisiae* 6C subjected to ethanol stress indicates that the whole impact of the ethanol stress on the fatty acids composition is less influenced with immobilized cells as with non-immobilized ones. The ethanol stress raised in immobilized and free cells occurrence of palmitic oil acid to the detriment of palmitic acid. The character of changes in lipid composition during immobilization probably has an impact upon slightly increased stress resistance. The immobilized cells are as well resistive against passive membrane fluidization by ethanol.

Grego, J., Šajbidor, J., Malík, F., Krásny, Š.: Einfluß der Immobilisierung auf die Zusammensetzung der Lipide in Weinhefen während des Äthanol-Stresses. Kvas. prům., **40**, 1994, Nr. 6, S. 169 - 171

Der Vergleich der Zusammensetzung der immobilisierten und nichtimmobilisierten Zellen des Weinhefestammes *Saccharomyces cerevisiae* 6 C, der dem Äthanolstreß ausgesetzt wurde, zeugt davon, daß die Gesamtauswirkung des Äthanolstresses auf die Zusammensetzung der Fettsäuren bei den immobilisierten Hefen einigermaßen niedriger ist als bei den nichtimmobilisierten. Der Äthanolstreß erhöhte in den immobilisierten und freien Zellen die Vertretung der Palmitinsäure auf Kosten der Palmitinsäure. Der Charakter der Veränderungen in der Zusammensetzung der Lipide bei der Immobilisierung führt wahrscheinlich zu einer mäßig erhöhten Streßbeständigkeit. Auch gegenüber der passiven Fluidisierung der Membrane durch Äthanol sind die immobilisierten Zellen beständiger.

Грего, Й. - Шайбидор, Я. - Малик, Ф. - Красны, Ш.: Влияние иммобилизации на состав липидов винных дрожжей в течение этанольного стресса. Квас. прум. **40**, 1994, № 6, стр. 169 - 171

Сопоставление состава иммобилизованных и неиммобилизованных клеток штамма винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 6C подвергнутых этанольному стрессу, свидетельствует о том, что общее влияние этанольного стресса на состав жирных кислот в случае иммобилизованных клеток не несколько меньше чем в случае неиммобилизованных. Этанольный стресс в иммобилизованных и свободных клетках повысил представление палмитиноолеиновой кислоты в ущерб пальмитиновой кислоты. Характер изменений состава липидов при иммобилизации, по всей вероятности, приводит в слегка повышенной устойчивости к стрессу. Иммобилизованные клетки более устойчивые также к пассивной флуидизации мембраны этанолом.