

VPLYV ETANOLU A TEPLoty NA RAST KVASINIEK

Ing. ZUZANA CIESAROVÁ, Ing. DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, CSc.

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: etanoltolerancia, termotolerancia, *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinky

ÚVOD

Prítomnosť etanolu a zvýšená teplota spôsobujú zmenu fyzikálnochemických vlastností kultivačného prostredia kvasiniek. Keďže primárnym miestom vplyvu obidvoch faktorov je cytoplazmatická membrána, kvasinky reagujú na zmenené vonkajšie podmienky najmä prestavbou membránových lipidov [1, 2]. Etanol znižuje funkčnosť hydrofóbnej vrstvy membrány ako bariéry a zvyšuje permeabilitu membrány. Efekt tejto zvýšenej permeability membrány bunky čiastočne kompenzujú zvýšením priemernej dĺžky acylových reťazcov membránových fosfolipidov, čím sa zvýši hrúbka hydrofóbnej vrstvy a obnoví sa esenciálna bariérová funkcia membrány [3]. Zvýšená etanoltolerancia a produkcia etanolu býva v kvasinkách často spojená so zvýšenou nenasýtenosťou mastných kyselín a prítomnosťou sterolov v membráne [4, 5].

Etanol ako produkt fermentácie kvasiniek pôsobí na bunku už vo fyziologicky produkovaných koncentráciách, a to v troch hlavných smeroch: ovplyvňuje rast, viabilitu a fermentačnú schopnosť kvasiniek. V bunke zasahuje rôzne štruktúry: hydrofóbne proteíny cytoplazmatickej a mitochondriálnej membrány, hydrofilné rozpustné proteíny, membrány rôznych bunkových partikul — lyzozómov, vakuol, jadra a endoplazmatické retikulum [6]. Jednotlivé enzýmy, zúčastňujúce sa na metabolických procesoch v bunke, ako napr. glykolytické, respiračné, transportné, prípadne lyolytické enzýmy, majú rôznu senzitivitu na etanol [7—11].

Rozsah etanoltolerancie a termotolerancie kvasiniek je daný vonkajšími podmienkami prostredia, najmä zdrojom uhlíka a dusíka, prítomnosťou aditívnych látok, spôsobom vedenia procesu a pod. Za rovnakých podmienok však môžeme zistiť u rôznych kmeňov rôznu etanol- a termotoleranciu, teda tieto vlastnosti sú do určitej miery aj geneticky determinované.

V práci sme testovali toleranciu voči etanolu a teplote za definovaných podmienok u 18 kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* — pekárskych, liehovarníckych a vinárskych. Sledovali sme špecifické rastové rýchlosti a maximálne koncentrácie biomasy pri kombinovanom vplyve etanolu a teploty a fermentačné parametre fermentácie ovplyvnené teplotou v rozsahu 30 až 43 °C.

MATERIÁL A METÓDY

Kmene mikroorganizmov

V experimentoch sme použili 18 kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (zoznam testovaných kmeňov je uvedený v tabuľke 1). Kultúry boli udržiavané na šikmých agaroch so sladovým extraktom (Imuna, Šarišské Michaľany) pri 4 °C.

Tabuľka 1. Maximálne špecifické rastové rýchlosti kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaných 70 h pri 28 °C aeróbne v médiu s prídavkom 0; 3; 6; 9; 12 a 15 % obj. etanolu

Kmeň	maximálna špecifická rastová rýchlosť [h ⁻¹]						ID ₅₀ ¹
	koncentrácia etanolu [% obj.]						
	0	3	6	9	12	15	
pekárske a liehovarnícke kmene							
OOSFRH	0,0167	0,0321	0,0156	0,0184	0,0155	0,0008	13,37
CCY 21-4-26	0,0202	0,0523	0,0232	0,023	0,015	0,0008	12,95
Pz 90	0,018	0,0458	0,024	0,0233	0,0104	—0,0002	12,42
Pk 17	0,0174	0,038	0,0195	0,0215	0,0102	0,00005	12,4
Pz 172	0,0173	0,0399	0,0265	0,0218	0,0082	0,0002	11,87
Alltech	0,0164	0,0395	0,0167	0,019	0,0076	0,0002	11,82
OHF	0,022	0,0395	0,0179	0,0214	0,0102	0,0007	11,74
LH 02/2	0,0209	0,0523	0,0266	0,0201	0,0078	0,0007	11,25
Km 22	0,017	0,0365	0,0249	0,0216	0,0043	0,0001	11,2
LHF 2-5	0,0191	0,0405	0,0216	0,02	0,005	0,0001	11,01
CCY 21-4-71	0,0189	0,0492	0,0204	0,0202	0,0018	0,001	10,63
I 120	0,0175	0,0395	0,0248	0,0196	—0,001	0,0003	10,42
vinárske kmene							
RIVE V 10-13-6	0,0193	0,039	0,0188	0,0218	0,0217	0,0002	13,6
RIVE V 10-13-5	0,0193	0,551	0,0196	0,0194	0,0118	0,001	12,54
RIVE V 10-25-10	0,0218	0,0385	0,0211	0,0226	0,0083	0,0004	11,36
RIVE V 10-35-39	0,0195	0,0525	0,0178	0,0214	0,0057	0,0005	11,13
RIVE V 15-1-416	0,0187	0,0438	0,0185	0,0194	0,0043	0,0004	10,9
RIVE V 10-35-8	0,0199	0,0451	0,0191	0,0211	0,0029	0,0007	10,7

¹ koncentrácia etanolu spôsobujúca 50 % inhibíciu maximálnej špecifickej rastovej rýchlosti

Kultivačné médiá

Na inokuláciu, kultiváciu a fermentáciu bolo použité médium so zložením [g/l]: (NH₄)₂SO₄, 5; kvasničný autolyzát, 3; KH₂PO₄, 2; MgSO₄·7H₂O, 1; CaCl₂, 0,1; NaCl, 0,1. Hodnota pH bola upravená na 5,8. Ako zdroj uhlíka bola použitá glukóza v koncentrácii:

- pre inokulačné médium 20 g/l
- pre kultivačné médium 40 g/l
- pre fermentačné médium 125 g/l

Do kultivačného média bol pridaný etanol v koncentrácii 0; 3; 6; 9; 12 a 15 % obj. Fermentačné médium bolo pripravené v tlmivom roztoku s pH 5,8 so zložením 0,2 mol/l Na_2HPO_4 a 0,2 mol/l NaH_2PO_4 .

Kultivačné podmienky

Meranie rastových rýchlostí kvasiniek v prítomnosti etanolu prebiehalo v skúmavkách s Kapselbergovými uzávermi na trepačke pri 28 °C počas 70 h s prídavkom etanolu 0; 3; 6; 9; 12 a 15 % obj. v 10 ml kultivačného média.

Meranie termotolerancie kvasiniek prebiehalo v skúmavkách s Durhamovou skúmavkou staticky pri 35 a 40 °C počas 24, resp. 48 h v 5 ml kultivačného média.

Priebeh fermentácie kvasiniek pri vyššej teplote bol sledovaný vo fľašiach s kvasných uzáverom v 400 ml fermentačného média, staticky pri teplote 30; 33; 37; 40 a 43 °C.

Vo všetkých prípadoch bolo na inokuláciu do kultivačného, resp. fermentačného média použité 10% obj. inokula kultivovaného 48 h aeróbne pri 28 °C.

Analytické metódy

Rast buniek pri meraní rastových rýchlostí bol hodnotený nefelometricky na Langeho kolorimetri. Koncentrácia biomasy počas kultivácie pri zvýšenej teplote bola stanovená po scentrifugovaní sterilne odobratej vzorky a premytí suspenzie buniek vo fyziologickom roztoku meraním nárastu optickej hustoty pri 620 nm [12]. Sušina bunkovej hmoty bola stanovená sušením do konštantnej hmotnosti pri 105 °C. Prírastok biomasy bol vypočítaný ako rozdiel koncentrácie sušiny buniek na začiatku a na konci kultivácie.

Viabilita buniek bola stanovená po vitálnom farbení buniek metylénovou modrou a vyjadrená ako % živých buniek z celkového počtu zisteného počítaním v Bürkerovej komôrke.

Etanol bol stanovený plynovou chromatografiou. Glukóza bola stanovená spektrofotometricky pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny.

Výpočet maximálnej špecifickej rastovej rýchlosti

Maximálna špecifická rastová rýchlosť (μ_{\max}) bola vypočítaná fitovaním lineárnej časti rastovej krivky zistenej meraním optickej hustoty kultúry počas kultivácie [13].

Výpočet hodnôt ID_{50}

Koncentrácia etanolu spôsobujúca 50% inhibíciu μ_{\max} oproti μ_{\max} vo vzorke bez prítomnosti etanolu bola stanovená z krivky toxicity, ktorá predstavuje závislosť μ_{\max} od logaritmu koncentrácie pridaného etanolu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

1. Vplyv etanolu na rastovú rýchlosť kvasiniek

Posúdenie rastu kvasiniek v prítomnosti rôznej

Tabuľka 2. Prírastok biomasy kvasiniek kultivovaných anaeróbne pri 35 °C 24 h a pri 40 °C 48 h s prídavkom etanolu 0; 6 a 10 % obj.

Testované kmene <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PRÍRASTOK BIOMASY [g/l]			
	bez prídavku etanolu		s prídavkom etanolu	
	35 °C	40 °C	35 °C/ 6% obj	40 °C/ 10%obj
CCY 21-4-71	1,250	0,443	0,986	-0,122
CCY 21-4-26	1,096	0,716	0,840	-0,138
Pz 172	1,334	0,531	0,754	-0,036
Pz 90	1,160	0,572	0,709	-0,190
Pk 17	1,105	0,476	0,599	-0,164
Km 22	0,937	0,466	0,669	-0,151
OOSFRH	1,022	0,324	0,547	-0,137
I 120	1,001	0,480	0,508	-0,152
LH 02/2	1,114	0,404	0,695	-0,124
OHF	1,105	0,390	0,565	-0,173
Alltech	1,090	0,432	0,452	-0,185
LHF 2-5	1,069	0,329	0,525	-0,147
RIVE V 10-35-39	1,052	0,446	0,826	-0,144
RIVE V 10-13-5	1,031	0,351	1,028	-0,108
RIVE V 10-35-8	0,917	0,382	0,597	-0,119
RIVE V 10-13-6	0,810	0,358	0,731	-0,102
RIVE V 10-25-10	0,672	0,133	0,403	0
RIVE V 15-1-416	0,484	0,103	0,394	-0,073

koncentrácie externe pridaného etanolu patrí medzi najjednoduchšie a najviac používané metódy stanovenia etanoltolerancie. Túto metódu sme použili pri skriningu 18 kmeňov kvasiniek a z nameraných rastových kriviek sme vypočítali maximálnu rastovú rýchlosť μ_{\max} a hodnotu ID_{50} . Výsledky sú uvedené v tabuľke 1, pričom kvasinky sú v nej zoradené podľa klesajúcich hodnôt ID_{50} . Medzi kvasinky s najväčšou etanoltoleranciou, teda s hodnotou ID_{50} nad 12,4 % obj. etanolu, z nášho súboru kvasiniek patrili 3 pekárské a liehovarnícke kmene, 1 zbierkový kmeň a 2 vinárske kmene. Stimulačný účinok etanolu na rastovú rýchlosť bol pozorovaný do koncentrácie 6 % obj. etanolu, u dobre etanoltolerantných kmeňov až do 9 % obj. (tab. 1).

2. Vplyv teploty na rast kvasiniek

V snahe zohľadniť požiadavku praxe na etanolovú fermentáciu pri vyššej teplote sme sa v ďalšom štúdiu zaoberali vplyvom teploty na etanoltoleranciu nášho súboru kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Zvýšenie teploty má podstatný vplyv na všetky životné funkcie buniek. Pre štádium produkcie etanolu sú obvyčajne optimálne teploty o 5 až 10 °C vyššie ako pre štádium rastu buniek [10]. Lee a kol. [14] uvádzajú, že mezofilné kmene *Saccharomyces cerevisiae* majú optimálnu teplotu pre rast 35 °C a pre fermentáciu 40 °C. Samotné zvýšenie teploty z 35 na 40 °C sa u nami testovaných kvasiniek prejavilo na raste poklesom prírastku sušiny biomasy v priemere o 60 % (tab. 2). V prítomnosti etanolu sa optimálna teplota rastu znižuje.

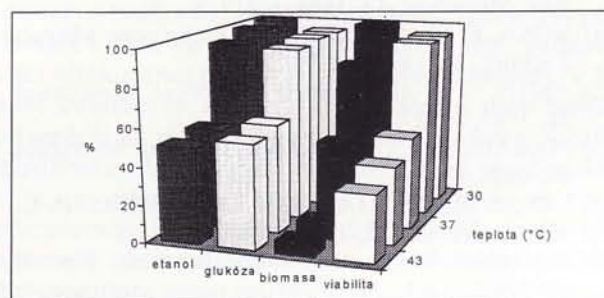
je [15], čo potvrdili aj naše výsledky. Pridanie etanolu v koncentrácii 6 % obj. pri teplote 35 °C malo za následok asi 35 % pokles prírastku biomasy oproti kultivácii bez prídavku etanolu pri 35 °C (tab. 2). Pri kultivačnej teplote 28 °C pôsobil etanol v koncentrácii 6 % obj. stimulačne na rast kvasiniek, ako to bolo vyššie uvedené (podľa tab. 1). Porovnaním kultivácií pri 28 °C a 35 °C s rôznymi koncentráciami externe pridaného etanolu (tab. 1 a 2) sme zistili, že pri vyššej teplote je inhibičný účinok etanolu na rast kvasiniek výraznejší. Napríklad u kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* LH 02/2 zvýšenie teploty z 28 na 35 °C posunulo hranicu tolerancie k etanolu pri 35 %-nom znížení koncentrácie biomasy z približne 10 % obj. etanolu na 6 % obj. Kombinácia extrémnych podmienok 40 °C a 10 % obj. etanolu spôsobila pokles koncentrácie biomasy u všetkých kvasiniek. Samostatné pôsobenie oboch stresových faktorov ovplyvnilo rast v podstatne menšej miere. Napr. pre spomínaný kmeň *Saccharomyces cerevisiae* LH 02/2 bola inhibícia rastu teplotou 40 °C v porovnaní s teplotou 35 °C v oboch prípadoch bez etanolu 63 %-ná a inhibícia rastu prídanim 10 % obj. etanolu oproti rastu bez etanolu pri kultivačnej teplote 28 °C bola 20 %.

3. Vplyv teploty na fermentáciu kvasiniek

Zvýšenie fermentačnej teploty pôsobí na jednotlivé fermentačné parametre v rôznom rozsahu. Sledovaním priebehu fermentácie glukózy kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* LH 02/2 pri teplotách 30; 33; 37; 40 a 43 °C sme zistili, že vplyvom zvýšenej fermentačnej teploty dochádza k predčasnému ukončeniu fermentačnej aktivity, čo vedie k neúplnej fermentácii substrátu a v konečnom dôsledku k nižším výťažkom etanolu (tab. 3). So vzrastom teploty nastáva aj pokles viability buniek, najmä v neskorších štádiách fermentácie. Strata viability súvisí predovšetkým s kombinovaným vplyvom vyššej teploty a toxických efektov etanolu v dôsledku väčšej akumulácie intracelulárneho etanolu pri vyšších teplotách [10].

Ak si všimneme ovplyvnenie jednotlivých fer-

Obrázok 1. Vplyv teploty na fermentačné parametre po 74 h anaeróbnej kultivácii *Saccharomyces cerevisiae* LH 02/2 pri 30; 33; 37; 40 a 43 °C.



100% etanol, resp. biomasa = koncentrácia etanolu, resp. biomasy pri 30 °C,
100% glukóza = úplná spotreba glukózy

mentačných parametrov teplotou v percentuálnom vyjadrení na obr. 1, zistíme, že fermentačná aktivita sa aj pri 43 °C udržala na zhruba 50 % úrovni, podobne ako spotreba glukózy. Väčší pokles spôsobený teplotou bol pozorovaný na viabilite kvasiniek — pri teplote 43 °C bola viabilita 35 %. Najviac bol teplotou inhibovaný rast kvasiniek, už pri teplote 37 °C dosahoval iba 43 % z prírastku pri kultivačnej teplote 30 °C, pri vyšších teplotách to bolo iba 6—8 %.

Dôležitosť týchto poznatkov pre priemyselnú fermentáciu je zrejmá. Pri väčšine procesných teplot v čase inokulácie, keď ešte etanol nie je prítomný, rýchlosť rastu kvasiniek mnohonásobne prevyšuje rýchlosť ich odumierania. Avšak s postupnou akumuláciou etanolu sa znižuje optimálna a maximálna teplota pre rast a rozdiel medzi rýchlosťou rastu a odumierania sa znižuje. Nakoniec môže nahromadené množstvo etanolu spôsobiť, že rýchlosť odumierania prevýši rastovú rýchlosť a fermentácia sa zastaví. Fermentácia je teda závislá na teplotnom režime, ktorý sa odlišuje jednak podľa kmeňa aj podľa akumulácie etanolu.

LITERATÚRA

- [1] D'AMORE, T., PANCHAL, C. J., RUSSELL, I., STEWART, G. G.: Crit. Rev. Biotech. **9**, 1990, s. 287.
- [2] ŠAJBIDOR, J., GREGO, J.: FEMS Microbiol. Lett. **93**, 1992, s. 13.
- [3] INGRAM, L. O.: Crit. Rev. Biotechnol. **9**, 1990, s. 305.
- [4] KOUKOU, A. I., TSOUKATOS, D., DRAINAS, C.: J. Gen. Microbiol. **136**, 1990, s. 1271.
- [5] HAYASHIDA, S., OHTA, K.: Agric. Biol. Chem. **42**, 1978, s. 1139.
- [6] D'AMORE, T., STEWART, G. G.: Enzyme Microb. Technol., **9**, 1987, s. 322.
- [7] NAVARRO, J. M.: Cell. Mol. Biol. **26**, 1980, s. 241.
- [8] MOULIN, G., BOZE, H., GALZY, P.: Biotechnol. Bioeng. **22**, 1980, s. 2375.

Tabuľka 3. Fermentačné parametre po 74 h anaeróbnej kultivácii *Saccharomyces cerevisiae* LH 02/2 pri 30; 33; 37; 40 a 43 °C.

teplota [°C]	etanol [g/l] ¹	Y _{P/S} [%] ²	glukóza [g/l] ³	biomasa [g/l] ⁴	viabilita [%]
30	38,9	32,95	6,36	2,09	95
33	38,43	31,1	6,77	1,7	95
37	36,66	30,41	8,53	0,91	49
40	20,65	16,95	51,35	0,17	41
43	19,7	16,17	54,8	0,14	35

¹ koncentrácia naprodukovaneho etanolu [g/l]

² výťažok etanolu na glukózu

³ koncentrácia zostatkovej glukózy [g/l]

⁴ prírastok sušiny biomasy [g/l]

- [9] LEAO, C., VAN UDEN, N.: Biochim. Biophys. Acta **43**, 1984, s. 774.
 [10] CASEY, G. P., INGLEDEW, W. M.: CRC Crit. Rev. Microbiol. **13**, 1986, s. 219.
 [11] ROSA, F. M., SÁ-CORREIA, I.: Enzyme Microb. Technol. **16**, 1994, s. 808.
 [12] AMIN, S. et al.: Applied Microbiol. Biotechnol. **22**, 1985, s. 237.
 [13] NABAIS, R. C., et al.: Appl. Environ. Microbiol. **54**, 1988, s. 2439.
 [14] LEE, J. H., WILLIAMSON, D., ROGERS, P. L.: Biotechnol. Lett. **2**, 1980, s. 141.
 [15] THOMAS, K. C., et al.: Appl. Biochem. Biotech. **43**, 1993, s. 211.

Lektorovala Ing. Ida Hollerová

Ciesarová, Z.—Šmogrovičová, D.: Vplyv etanolu a teploty na rast kvasiniek. Kvas. prům., **42**, 1996, č. 4, s. 129—132.

V práci boli sledované zmeny rastových rýchlostí 18 kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* po pridaní extracelulárneho etanolu, resp. zmeny rastu kvasiniek počas fermentácie pri zvýšenej teplote. Kombinovaný vplyv etanolu (6 % obj.) a teploty (35 °C) má za následok asi 60% zníženie prírastku biomasy. Naproti tomu samotný etanol v koncentrácii 6—9 % obj. pri teplote 28 °C má na rastovú rýchlosť kvasiniek stimulačný efekt, taktiež aj mierne zvýšenie teploty (na 33 až 35 °C) v počiatočných štádiách fermentácie pozitívne ovplyvňuje rýchlosť rastu a produkcie etanolu.

Ciesarová, Z. — Šmogrovičová, D.: The Influence of Ethanol and Temperature on Yeast Growth. Kvas. prům., **42**, 1996, No. 4, pp. 129—132.

Changes of growth rate of 18 *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains after extracellular ethanol addition and after fermentation under increased temperature respectively were studied. Combined effect of ethanol (6 % v/v) and temperature (35 °C) resulted in 60 % decrease of biomass acquisition. On the other hand, ethanol only in concentration 6—9 % v/v at 28 °C stimulated yeast growth rate. Small increase of temperature (from

28 °C to 33—35 °C) in earlier growth phases positively affected growth rate and ethanol production.

Ciesarová, Z. — Šmogrovičová, D.: Einfluss des Äthanol und der Temperatur auf das Hefewachstum. Kvas. prům. **42**, 1996, Nr. 4, S. 129—132.

In der Arbeit wurden die Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeiten bei 18 Stämmen der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* nach Zugabe von extrazellulärem Äthanol, bzw. die Änderungen des Hefewachstums während der Fermentation bei erhöhter Temperatur verfolgt. Der Kombinierte Einfluss von Äthanol (6 Vol. %) und Temperatur (35 °C) hat zur Folge eine cca 60 % Senkung des Hefemassezuwachses. Äthanol selber hat dagegen in der Konzentration 6—9 Vol. % bei der Temperatur von 28 °C einen Stimulationsseffekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefen, sowie auch eine mässige Temperaturerhöhung (auf 33 bis 35 °C) in den Anfangsstadien der Fermentation einen positiven Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Äthanolproduktion aufweist.

Циесарова, З. — Шмогровицова, Д.: Влияние этанола и температуры на рост дрожжей. Квас. prům., **42**, 1996, № 4, стр. 129—132.

В работе исследовались изменения скоростей роста 18 штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* после прибавления экстрацеллюлярного этанола, или же изменения роста дрожжей в течение ферментации при повышенной температуре. Комбинированное влияние этанола (6 % объем.) и температуры (35 °C) вызывает около 60 % понижение прироста биомассы. Наоборот сам этанол в концентрации 6—9 % объем. при температуре 28 °C на скорость роста оказывает стимуляционный эффект, также и умеренное повышение температуры (до 33—35 °C) в начальных стадиях ферментации положительно влияет на скорость роста и продукции этанола.

Náš rozhovor

DOZVUKY Z BRAU NÜRNBERG

Kooperace jako pomoc k přežití

Interview „Kvasného průmyslu“ s prezidentem kooperační společnosti soukromých pivovarů „Brau Ring“ panem Manfredem Gebhardt-Eulerem (ve stánku společnosti na výstavě)

● Pane prezidente, náš časopis vychází v zemi, která má právě tak starou a silnou pivovarskou tradici jako Německo; malé a střední pivovary stejně tak jako u Vás se snaží obstát v tvrdé konkurenci, ale protože k privatizaci pivovarů došlo poměrně nedávno, myšlenka kooperace dosud nezapustila tak pevné kořeny jako u Vás. Proto chceme našim čtenářům přinést interview právě s Vámi. I když