

Rola błony plazmatycznej w tolerancji drożdży na etanol

Włodzimierz Grajek
Dorota Walkowiak-Tomczak
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Poznań

1. Wstęp

Proces przemysłowej produkcji etanolu i badania w tym zakresie są prowadzone od dziesięcioleci. Mimo to nie wszystkie mechanizmy regulacyjne tego procesu zostały w pełni wyjaśnione. Jednym z takich zagadnień, rzutujących na efektywność procesu fermentacji, jest ograniczona tolerancja komórek drożdżowych na duże stężenie etanolu i wysokie ciśnienie osmotyczne w brzeczках fermentacyjnych. Cecha ta uniemożliwia w praktyce prowadzenie fermentacji w brzeczках o stężeniu powyżej 25 – 30% cukru, co w dużym stopniu ogranicza produktywność kadzi fermentacyjnych.

Pierwszymi badaczami, którzy zwrócili uwagę na to zagadnienie, byli Hayashida i wsp. (9). Stwierdzili oni, że odporność drożdży na wysokie stężenie etanolu może wzrosnąć, jeżeli w fazie rozwoju kultury wprowadza się do pożywki specjalne dodatki. Wskazali, że dodając do pożywki proteolipid wyizolowany z grzyba *Aspergillus oryzae*, możliwe jest osiągnięcie 20% (v/v) stężenia etanolu w brzeczках odfermentowanych przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, *S. uvarum* (carlsbergensis) i szczepy drożdży stosowane w produkcji sake. Od tego czasu znacznie wzrosło zainteresowanie tą problematyką i ukazało się szereg interesujących publikacji.

2. Wpływ etanolu na komórki drożdżowe

Gromadzenie się w pożywce etanolu będącego produktem metabolizmu drożdży uznać należy za czynnik stresowy. Niekorzystne działanie etanolu na komórkę drożdżową objawia się przede wszystkim ograniczeniem wzrostu i przeżywalności komórek oraz obniżeniem szybkości fermentacji w miarę wzrostu stężenia etanolu. Dla szczepów gorzelnicznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* silne hamowanie wzrostu występuje przy 8% stężeniu etanolu. D'Amore (3) podaje, że śmierć 50% komórek w populacji drożdży piwnych typu *lager* występuje przy stężeniu 11% (w/v) etanolu, podczas gdy dla droż-

dży typu *ale* podobny efekt występuje dopiero przy 13% (w/v) stężeniu etanolu. Przy 15% (w/v) stężeniu obserwowano śmierć wszystkich komórek obu typów drożdży. Szybkość fermentacji jest hamowana w mniejszym stopniu niż wzrost komórek i jej wyraźne zwolnienie zaznacza się dopiero przy znacznym stężeniu etanolu. U drożdży sake wykazano zupełne zahamowanie wzrostu przy stężeniu 12% (w/v), podczas gdy szybkość fermentacji wynosiła jeszcze 25% szybkości stwierdzanej w fermentacji kontrolnej. Obserwowano również, że etanol przyspiesza śmierć termiczną drożdży.

Etanol wykazuje działanie inhibujące zarówno wówczas, gdy jest produkowany przez komórkę, jak i wtedy, gdy jest dodawany z zewnątrz. Niekorzystny wpływ etanolu przejawia się m.in. inhibicją niektórych enzymów związanych z glikolizą i produkcją etanolu, hamowaniem transportu cukrów i aminokwasów, zakłóceniem przepływu protonów oraz zmianami w budowie i płynności błon, co powoduje zakłócenia w wymianie masy z otoczeniem. Szczególnie istotne są zakłócenia w funkcjonowaniu „pompy protonowej” (18). Ta ostatnia jest motorem transportu wielu substancji do komórki i pełni ważną rolę w wymianie masy związanej z fermentacją etanolową. Wysokie stężenie etanolu silnie osłabia gradient protonów po obu stronach błony, co wywołuje niespecyficzny wzrost przepuszczalności błony i inhibicję aktywności ATP-azy regulującej przepływ protonów. Rosa i Sa-Correia (22) stwierdziły, że aktywność tej ATP-azy zależy w dużej mierze od stężenia etanolu i w określonym zakresie stężeń może być aktywowana lub inhibowana. Enzymy biorące udział w reakcjach glikolizy i tworzenia etanolu są stosunkowo odporne na jego działanie. Ich denaturacja pod wpływem etanolu występuje przy stężeniach znacznie przewyższających stężenia tego związku występujące w brzezkach odfermentowanych.

Różnorodność technik pomiarowych utrudnia sformułowanie ścisłej definicji tolerancji drożdży na etanol. Najlepsza aktualnie metoda określa odporność komórek na etanol na podstawie ilości etanolu wytworzonego podczas fermentacji cukrów, ponieważ hamowanie zdolności fermentacyjnych jest najdokładniejszym i najbardziej kompleksowym wskaźnikiem tolerancji na etanol (4).

3. Mechanizm tolerancji drożdży na etanol

Jedną z najszerzej udokumentowanych hipotez tolerancji drożdży na etanol jest teoria niszczenia błony plazmatycznej. Według tej teorii pod wpływem etanolu zachodzi niszczenie organizacji molekularnej i zmiany w przepuszczalności błon. Zakłada się występowanie trzech rodzajów oddziaływań etanolu na komórki: (1) bezpośrednich interakcji etanolu ze składnikami błony, (2) interakcji z wodą i (3) efektu dielektrycznego (12).

Wprowadzenie polarnej cząsteczki etanolu do hydrofobowej warstwy błony podwyższa średnią polarność całego regionu. W ten sposób ułatwiona zostaje penetracja w głąb błony kolejnych cząstek polarnych, tj. wody i etanolu. Przy dużej koncentracji etanolu w komórce i jego szybkiej sekrecji następuje

wymywanie frakcji lipidowej z błony plazmatycznej. Wymywanie lipidów jest tym większe, im krótsze są łańcuchy kwasów tłuszczowych we frakcji i im wyższy jest stopień ich nasylenia. Jednocześnie etanol łącząc się z wodą zmniejsza uwodnienie fosfolipidów i białek błonowych. W ten sposób zostają osłabione oddziaływania hydrofobowe w obrębie środkowej warstwy błony, co w efekcie zakłóca funkcję błony jako selektywnej bariery w transporcie masy na linii komórka–środowisko zewnętrzne. Pierwszym widocznym efektem wysokiego stężenia etanolu jest zmniejszanie grubości błon, zaś końcowym autoliza komórek.

Obok transportu etanolu poprzez obszary hydrofobowe błony plazmatycznej możliwa jest także sekrecja etanolu przez obszary hydrofilne. Wynika to z amfipatycznej budowy cząsteczki etanolu, która zawiera alifatyczną grupę hydrofobową oraz hydrofilową grupę hydroksylową. Dzięki obecności grupy OH^- w cząsteczce etanol może przenikać też przez kanaliki hydrofilowe w obrębie białek błonowych oraz przez warstwy fosfolipidowe w miejscach występowania nienasyconych kwasów tłuszczowych. Występowanie dużej ilości nienasyconych wiązań zwiększa polarność błony i znacznie ułatwia przemieszczanie się etanolu. Odbywa się to w takim przypadku przy znacznie mniejszych zaburzeniach w naturalnej strukturze błony. Można zatem stwierdzić, że obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych i steroli stabilizuje strukturę błon biologicznych i chroni ją przed niszczącym działaniem etanolu (4, 12, 15). Prace publikowane w ostatnich latach wskazują jednoznacznie na kluczową rolę błon biologicznych w tolerancji komórek na etanol (1, 4). Odporność komórek na etanol wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz ze wzrostem udziału steroli i nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej.

4. Budowa błon biologicznych i rola frakcji fosfolipidowej

Podstawową strukturę błon plazmatycznych stanowi układ lipidowo-białkowo-wodny, ze znaczną ilością węglowodanów związanych z cząsteczkami białek (glikoproteidy) i lipidów (glikolipidy) (14, 21).

Jednym z najlepszych modeli struktury błony jest tzw. model płynnej mozaiki. Zgodnie z nim zasadniczą część błony stanowi podwójna warstwa lipidów, których cząsteczki hydrofobowe są zwrócone do środka błony, a hydrofilowe do wnętrza i na zewnątrz komórki. W warstwie lipidów tkwią białka poprzeczne tzw. tunelowe oraz ektobiałka, na zewnątrz zaadsorbowane są białka powierzchniowe, a od strony wewnętrznej komórki znajdują się endobiałka. Pomędzy tymi drobinami zlokalizowane są łańcuchy oligosacharydowe. Struktura warstwy białkowo-lipidowej nie jest regularna; zarówno białka, jak i fosfolipidy mogą zmieniać swe położenie w obrębie błony (14, 21). Obszary hydrofobowe błon biologicznych są zbudowane z fosfolipidów, sfingolipidów i steroli. Różnorodność acylogliceroli wynika z ogromnej liczby kwasów tłuszczowych wchodzących w ich skład. Różnią się one długością łańcucha węglowodorowego, rozmieszczeniem, liczbą i izomerią podwójnych wiązań.

Fosfolipidy odgrywają szczególną rolę w strukturze błon biologicznych, a pod względem ilościowym są głównym składnikiem, stanowiąc około 60% frakcji lipidowej. Podstawowe miejsca zajmują fosfatydylocholino i fosfatydyloetanoloaminy. Lokalizacja fosfolipidów w błonie jest ściśle określona. W warstwie wewnętrznej występują fosfolipidy aminowe, a w zewnętrznej — cholinowe. Łańcuchy alifatyczne fosfolipidów aminowych są bardziej nasycone niż cholinowych, a ich grupy polarne są naładowane ujemnie. Zapewnia to asymetrię układu molekularnego błony komórkowej, zarówno we frakcji lipidowej jak i białkowej. Lokalizacja amfipatycznych cząsteczek glikolipidów wyłącznie w zewnętrznej warstwie błony pogłębia tę asymetrię.

Zawartość lipidów w błonach, ich skład, lokalizacja oraz stosunek lipidów nasyconych do nienasyconych są różne w zależności od komórki, rodzaju błony i warunków zewnętrznych. U *Saccharomyces cerevisiae* wyróżniono 33 różne kwasy tłuszczowe (8 – 26 atomów C). Najważniejszym wśród nich kwasem nienasyconym jest kwas oleinowy.

Płynna struktura błony jest wynikiem przechodzenia lipidów ze stanu płynnego w stały czyli krystaliczny. Zachodzi to w określonej temperaturze tzw. przejścia fazowego. Biorąc pod uwagę fakt, że frakcja lipidowa składa się z mieszaniny wielu rodzajów lipidów o różnej temperaturze przejścia fazowego, co zapewnia równowagę fazową w błonie, gdyż jedne cząsteczki lipidowe mogą być w stanie przejścia fazowego, inne zaś nie. Błona stanowi zatem mieszaninę obszarów płynnych i stałych. Ruchy łańcuchów węglowodorowych zależą od ich długości, ilości wiązań nienasyconych oraz rodzaju cząstek polarnych. Im więcej jest wiązań nienasyconych, tym łańcuchy kwasów tłuszczowych są bardziej ruchliwe i mniej upakowane. Stosunek ilościowy wiązań nasyconych do nienasyconych lipidów błonowych w różnych organizmach zależy od warunków termicznych i pochodzenia genetycznego. Utrzymanie stanu właściwej płynności błon biologicznych jest konieczne dla funkcjonowania każdego organizmu. Tylko odpowiednia płynność błony zapewnia prawidłowość wszystkich procesów dyfuzyjnych, zachodzących w jej obrębie.

Na płynność frakcji lipidowej wpływa skład jakościowy fosfolipidów oraz obecność cholesterolu i niektórych kationów, a także warunki środowiskowe, jak temperatura, pH i siła jonowa. Cholesterol i zymosterol stabilizują płynność frakcji lipidowej błony biologicznej. Jest cząsteczką amfipatyczną, która usztywnia górne rejony hydrofobowe fosfolipidów przez swą część steroidową, rozluźnia natomiast dolne strefy hydrofobowe dzięki obecności bocznego, bardziej ruchliwego łańcucha węglowodorowego. Del Castillo Agudo (6) badając rasy drożdży *S.cerevisiae* wykazujące różną tolerancję na obecność etanolu w pożywce stwierdził, że rasy wytrzymujące stężenie etanolu do 12% (v/v) zawierają znacznie więcej ergosterolu niż rasy wytrzymujące do 4 – 8% (v/v) etanolu.

Wysokie stężenie etanolu w środowisku wywołuje u drożdży mechanizmy adaptacyjne polegające między innymi na zmianach składu chemicznego błony plazmatycznej poprzez zwiększenie stosunku kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych.

Ilość nienasyconych wiązań i płynność błon są w znacznym zakresie warunkowane genetycznie. Z drugiej strony cechy te zależą wyraźnie od warunków hodowli drożdży.

5. Czynniki środowiskowe wpływające na tolerancję drożdży na etanol

5.1. Temperatura

Wraz ze wzrostem temperatury brzeczki, ale tylko do temperatury optymalnej dla fermentacji, rośnie szybkość produkcji etanolu, czego konsekwencją jest wzrost stężenia etanolu wewnątrz komórek drożdży. Jednocześnie w wyższej temperaturze obserwuje się zjawisko zwiększania zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej, kosztem kwasów nienasyconych. Towarzyszy temu zmniejszenie udziału fosfolipidów we frakcji lipidowej błony. Zmiany w zawartości nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych mają na celu regulację średniej temperatury krzepnięcia lipidów, co w efekcie prowadzi do utrzymania płynności i integralności błon komórkowych. Im większy stopień nasycenia kwasów tłuszczowych, tym mniejsza jest płynność błony plazmatycznej. W ten sposób komórka reguluje optymalną dla siebie płynność błon w zależności od temperatury i wilgotności otoczenia. Ponadto u drożdży wraz ze wzrostem temperatury hodowli obserwuje się syntezę białek szoku termicznego, co zwiększa ogólną termotolerancję komórek. Podwyższenie temperatury fermentacji wywołuje zatem dwa przeciwstawne efekty; z jednej strony przyspiesza szybkość fermentacji, z drugiej zaś osłabia odporność błon na wysokie stężenia etanolu. Szkodliwe działanie wysokiej temperatury fermentacji może być złagodzone poprzez stosowanie bardzo bogatych pożywek.

5.2. Skład chemiczny pożywki

Odporność drożdży na etanol można regulować poprzez stosowanie różnych dodatków do pożywek. Taki korzystny wpływ wywierają dodane do podłoża kwasy tłuszczowe, sterole, białka i witaminy. Dodatek kwasów tłuszczowych o wysokim udziale podwójnych wiązań wywołuje zwiększenie płynności błon i działa korzystnie na przeżywalność drożdży. Wbudowanie tych składników w błonę rekompensuje straty lipidów wypłukiwanych podczas wydzielania etanolu.

Dodając w warunkach beztlenowych nienasycone kwasy tłuszczowe, wprowadzamy do hodowli egzogeny materiał budulcowy do syntezy błony. Drożdże są zdolne do syntezy tych kwasów tylko w warunkach tlenowych, natomiast przy niedostatecznej ilości tlenu synteza ta jest znikoma. Korzystne jest więc dodawanie odpowiednich lipidów podczas beztlenowej fermentacji etanolowej, ponieważ umożliwia to komórce zwiększenie powierzchni błon i jednocześnie podnosi odporność drożdży na wysokie stężenie etanolu poprzez regulowanie składu kwasów tłuszczowych (19, 24).

5.3. Ciśnienie osmotyczne

Wysokie ciśnienie osmotyczne, będące wynikiem dużego stężenia niskocząsteczkowych substancji w pożywce, hamuje wzrost drożdży. Minimalna aktywność wody dla wzrostu komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wynosi 0,83.

Podczas badania wpływu ciśnienia osmotycznego na produkcję etanolu przez drożdże *S. carlsbergensis* stwierdzono, że ze wzrostem ciśnienia osmotycznego w pożywce maleje przeżywalność komórek i słabnie ich aktywność fermentacyjna (3, 17). D'Amore i in. (5) obserwowali zwolnienie przyrostu biomasy komórkowej, zmniejszenie przeżywalności komórek i spadek wydajności fermentacji. Autorzy wykazali przy tym jednoznacznie, że nie jest to spowodowane ani represją kataboliczną, ani tzw. „efektem glukozowym”, lecz wyłącznie efektem związanym ze wzrostem ciśnienia osmotycznego.

Reakcją komórki na rosnące ciśnienie osmotyczne w ośrodku zewnętrznym jest gromadzenie niskocząsteczkowych związków polarnych, przede wszystkim etanolu i glicerolu, dzięki czemu wzrasta ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórki (17). Jednak, gdy zewnętrzne ciśnienie osmotyczne jest bardzo wysokie, zakumulowana ilość etanolu wewnątrzkomórkowego może być zabójcza dla komórki.

Wyniki badań Guerzoni i in. (8) wskazują, że wzrost ciśnienia osmotycznego w środowisku hodowlanym wywołuje u drożdży tendencję do zwiększania stosunku nasyconych kwasów tłuszczowych do nienasyconych. Hilge-Rotmann i Rehm (11) stwierdzili, że komórki immobilizowane, rosnące w tym samym podłożu co komórki wolne, mają od nich znacznie wyższą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych. Autorzy ci tłumaczą ten fakt specyficznymi warunkami panującymi w kulkach nośnika, przede wszystkim podwyższonym ciśnieniem osmotycznym.

Z punktu technologicznego osłabienie odporności komórek na etanol pod wpływem wysokiego ciśnienia osmotycznego należy uznać za czynnik niekorzystny. Środkiem zaradczym może być zastosowanie bardzo bogatych pożywek, szczególnie w organiczne źródła azotu, jak pepton, czy ekstrakt drożdżowy. Korzystne działanie ma także dodatek jonów magnezowych i wapniowych.

5.4. Tlen

Drożdże *S. cerevisiae* zaliczane są do względnych beztlenowców. Obecność rozpuszczonego tlenu w pożywce jest niezbędna do syntezy wielu składników komórkowych, w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych i ergosterolu. Brak tlenu w pożywce prowadzi do zmniejszenia udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych i spadku produkcji etanolu. Silne natlenienie i bogaty skład pożywek są niezbędne dla prawidłowej syntezy kwasów tłuszczowych.

Ograniczone natlenianie brzeczek fermentacyjnych jest prowadzone głównie w fazie namnażania komórek (zafermentowanie). Źródłem rozpuszczonego tlenu jest także świeża brzeczek fermentacyjna. W procesach fermentacji okre-

sowej, które są szeroko stosowane w praktyce, natlenieniu poddaje się kulturę inokulacyjną. W procesach ciągłych ograniczone napowietrzanie brzeczek fermentacyjnych wpływa korzystnie na przebieg fermentacji i podnosi odporność komórek na szkodliwe działanie etanolu (23).

Gil i in. (7) stwierdzili, że obecność tlenu w brzeczce powoduje duże zmiany w składzie podstawowych lipidów błony cytoplazmatycznej, w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych i steroli. Zdaniem autorów zmiany we frakcji tłuszczowej mogą pełnić rolę regulującą dla układu NAD/NADH w czasie intensywnej produkcji etanolu poprzez zmiany stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych i ergosterolu do dihydroergosterolu. Interesujące jest to, że zmiany te są obserwowane tylko w komórkach rosnących w zawiesinie. W komórkach immobilizowanych tlen ma znacznie mniejszy wpływ na skład frakcji lipidowej błon.

6. Metody zwiększania odporności drożdży na etanol

Główną metodą poprawiania odporności drożdży na szkodliwe działanie etanolu jest zwiększenie zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych i steroli w błonie plazmatycznej komórek. Można to osiągnąć dwoma sposobami:

- poprzez prowadzenie etapu zafermentowania brzeczek cukrowych przy ich napowietrzaniu, oraz
- poprzez egzogenny dodatek źródła nienasyconych kwasów tłuszczowych do brzeczki fermentacyjnej.

Pierwsza z wymienionych metod prowadzi jednak do nadmiernego namnażania komórek drożdżowych, co powoduje straty cukrów na tworzenie biomasy komórkowej i może pogorszyć wyniki ekonomiczne zakładu. Stosowana jednak pod ścisłą kontrolą może być wykorzystana szczególnie w gorzelnianach stosujących technikę dwupotokową, polegającą na hodowli drożdży i prowadzeniu procesu fermentacji w dwóch oddzielnych strumieniach brzeczki. W literaturze jest mało doniesień na temat wpływu natleniania pożywek na tolerancję komórek na etanol. W większości prac autorzy zajmują się natlenianiem brzeczek fermentacyjnych i biorą pod uwagę przede wszystkim proces namnażania biomasy komórkowej i wpływ tlenu na aktywność fermentacyjną drożdży.

W ostatnich latach zwracano uwagę przede wszystkim na możliwość polepszania tolerancji etanolowej drożdży przez bezpośredni dodatek substancji lipidowych do brzeczek fermentacyjnych. Wśród dodawanych substancji należy wymienić kwas oleinowy i linolenowy, Tween 80, będący źródłem kwasu oleinowego, monooleinę, ergosterol, kompleksy proteinowo-fosfolipidowe, mąkę sojową i albuminę. Dodatki te można wprowadzać pojedynczo lub w postaci mieszanin.

Do najciekawszych prac w tym zakresie należy zaliczyć badania prowadzone przez Hayashidę i in. (9,10,16) nad fermentacją etanolową typu *sake*

przy użyciu drożdży *S. cerevisiae* i *S. uvarum*. Badacze ci wykazali, że wprowadzenie do brzeczki cukrowej kompleksu zawierającego Tween 80, ergosterol i albuminę powoduje zwiększenie końcowego stężenia etanolu z 17,2% do 19% (w/v), przy jednoczesnym skróceniu czasu fermentacji z 30 do 25 dni. Wzrost termotolerancji uzyskano też przy dodatku monooleinianu glicerolu oraz lipoprotein wyizolowanych z grzybni *Aspergillus oryzae*. Lipoproteiny zawierały duże ilości fosfolipidów i steroli.

Korzystny wpływ dodatku substancji lipidowych na przebieg fermentacji laktozy przez drożdże *Kluyveromyces fragilis* został stwierdzony przez Jansenasa i in. (13). Autorzy ci wprowadzili do pożywki mieszaninę ergosterolu, Tweenu 80 i kwasu linolowego, uzyskując 30% skrócenie czasu fermentacji.

Wzrost końcowego stężenia etanolu w odfermentowanej brzeczce osiągnięto w wyniku dodatku mąki sojowej. Viegas i in. (25) poprzez wprowadzenie 2% dodatku mąki sojowej do brzeczki cukrowej stwierdzili podwyższenie końcowego stężenia etanolu po 48 godzinach fermentacji z 8% do ok. 12,5% (v/v). Podobny efekt obserwowali Damiano i Wang (2) w fermentacji ciągłej z recyrkulacją drożdży. Dodatek 2% mąki sojowej zwiększył szybkość fermentacji alkoholowej i pozwolił na ok. 20% wzrost produktywności fermentora.

Stosowanie dodatku substancji tłuszczowych dla polepszenia przebiegu procesu fermentacji etanolowej znane jest też w tradycyjnym polskim gorzelnictwie rolniczym. Polegało ono na częściowym zastępowaniu słodu jęczmiennego słodem owsianym, bogatym w substancje tłuszczowe. Głównym celem takiego postępowania było wzbogacanie pożywki oraz zapobieganie występowania pianistości zacieru, bez uświadamiania sobie roli jaką wprowadzone substancje odgrywają przy zwiększaniu stabilności struktur komórkowych drożdży w obecności etanolu.

7. Wnioski

Odporność drożdży na wysokie stężenia etanolu jest związana z jakością lipidów błonowych. Wzrost zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych i steroli we frakcji lipidowej polepsza tolerancję komórek na etanol. Do czynników osłabiających odporność drożdży na etanol należy zaliczyć wysoką temperaturę fermentacji i wysokie ciśnienie osmotyczne w pożywce, sprzyjające zwiększaniu stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych.

Naturalna tolerancja drożdży na etanol może być poprawiona metodami technologicznymi poprzez prowadzenie procesu fermentacji w warunkach korzystnych dla zwiększania udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji lipidowej błon. Osiąga się to przez dodatek substancji tłuszczowych zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe. Alternatywnym rozwiązaniem może być stymulacja naturalnej syntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych przez drożdże poprzez umiarkowane natlenianie pożywki.

Literatura

1. Casey G. P., Ingledew W. M., (1986), *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 13, 219 – 280.
2. Damiano D., Wang S. S., (1985), *Biotechnol. Lett.*, 7, 135 – 140.
3. D'Amore T., (1992), *J. Inst. Brew.*, 98, 375 – 382.
4. D'Amore T., Stewart G. G., (1987), *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 322 – 330.
5. D'Amore T., Panchal C. J., Russell I., Stewart G. G., (1988), *J. Ind. Microbiol.*, 2, 365 – 367.
6. Del Castillo Agudo L., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 647 – 651.
7. Gil G. H., Jones W. J., Tornabene T. G., (1990), *Biochem. Cell. Biol.*, 68, 661 – 668.
8. Guerzoni M. E., Gardini F., Sinigaglia M., (1989), *Seventh International Symposium on Yeast*, S415, John Wiley & Sons Ltd.
9. Hayashida S., Feng D. D., Hongo M. A., (1974), *Agricult. Biol. Chem.*, 38, 2001 – 2006.
10. Hayashida S., Ohta K., (1981), *J. Inst. Brew.*, (1981), 87, 42 – 44.
11. Hilge-Rotmann B., Rehm H.-J., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 502 – 508.
12. Ingram L. O., (1986), *Trends Biotechnol.*, 4, 40 – 44.
13. Janssens J. H., Burris N., Woodward A., Bailey R. B., (1983), *Appl. Environm. Microbiol.*, 45, 598 – 602.
14. Lassota Z., (1987), *Biologia molekularna, cz. I*, PWN, Warszawa, 47 – 80.
15. Novotny C., Flieger M., Panos J., Karst F., (1992), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15, 314 – 320.
16. Ohta K., Hayashida S., (1983), *Appl. Environm. Microbiol.*, 46, 821 – 825.
17. Panchal C. J., Stewart G. G., (1980), *J. Inst. Brew.*, 86, 207 – 210.
18. Pascual C., Alonso A., Garcia I., Roman C., Kotyk A., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 374 – 378.
19. Pilkington B. J., Rose A. H., (1991), *Yeast*, 7, 489 – 495.
20. Plesset J., Palm C., McLaughlin C. S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108, 1340 – 1345.
21. Przystalski S., (1983), *Błony biologiczne*, WP, Warszawa.
22. Rosa M. F., Sa-Correia I., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 23 – 27.
23. Ryu D. D. Y., Kim Y. J., Kim J. H., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 12 – 16.
24. Thomas D. S., Rose A. H., (1979), *Arch. Microbiol.*, 122, 49 – 55.
25. Viegas C. A., Sa-Correia I., Novais J. M., (1985), *Biotechnol. Lett.*, 7, 515 – 520.

Role of plasma membrane in ethanol tolerance of yeasts

Summary

Tolerance of yeast to high ethanol concentration depends on cell membrane lipid composition. High contents of unsaturated fatty acids and sterols increase the cell structure stability and viability as well as the fermentation activity of yeasts. The cultivation of microorganisms at elevated temperatures and high osmotic pressure increase the lipid saturation degree and as a consequence the cell sensibility to stress.

Natural tolerance of yeasts to ethanol can be improved by technological means. It can be done by supplementation of fermentation broth with a source of unsaturated lipids, and, alternatively, by medium aeration to stimulate lipid biosynthesis.

key words:

ethanol tolerance, plasma membrane, yeast, fermentation.

Adres do korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60 – 623 Poznań.