

## Prehľad metód stanovenia etanoltolerancie

ZUZANA CIESAROVÁ - DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

**SÚHRN.** Článok sa zaoberá porovnaním rôznych prístupov k definícii etanoltolerancie a s tým súvisiacim výberom metód merania. Sú uvedené výhody a obmedzenia jednotlivých spôsobov stanovenia etanoltolerancie, ich použiteľnosť a interpretácia.

Priemyselné odvetvia, v ktorých je etanol primárnym produktom fermentácie kvasiniek *Saccharomyces* (napr. pivovarníctvo, vinárstvo, liehovarníctvo), sa vyvíjali niekoľko tisícročí. Všeobecne je známe, že maximálna hladina etanolu produkovaného rôznymi kmeňmi *Saccharomyces* je výsledkom vnútornej schopnosti kvasiniek tolerovať etanol. Napr. saké kvasinky, ktoré produkujú „vína“ s 20 % obj. etanolu, sú oveľa viac etanoltolerantné ako pivovarnícke kvasinky, ktoré obyčajne pracujú v médiách so 4-5 % obj. etanolu. Priemyselne používané kmene *Saccharomyces* sa podľa ich stúpajúcej etanoltolerancie zoradujú nasledovne:

pivovarské < liehovarnícke < vinárske < saké kvasinky

V súčasnosti však mnohé výskumy dokazujú, že etanoltolerancia kvasiniek *Saccharomyces* je determinovaná nielen schopnosťou kvasiniek tolerovať rôznu koncentráciu etanolu. Naopak, tolerancia je vo veľkej miere ovplyvnená vonkajším prostredím a to najmä nutričnými látkami (predovšetkým prítomnosťou nenasýtených lipidov a asimilovateľného dusíka), parametrami prostredia (hlavne teplotou), spôsobom vedenia procesu a prítokovania fermentovateľného substrátu. Každý z týchto faktorov zohráva dôležitú úlohu v dosiahnutí maximálnej koncentrácie etanolu, ktorý môžu kvasinky *Saccharomyces* naprodukovať.

---

Ing. Zuzana Ciesarová, Ing. Daniela Šmogrovičová, CSc. Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Inhibičný účinok etanolu, či už produkovaného počas fermentácie, alebo pridaného k rastúcim bunkám, je pomerne zložitý. Jeho vplyv na bunku sa dá pozorovať v zmene troch rôznych parametrov:

- a) vplyv na špecifickú rastovú rýchlosť populácie kvasiniek [1, 2, 3],
- b) vplyv na viabilitu kvasiniek [4, 5]
- c) vplyv na špecifickú rýchlosť fermentácie [5, 6, 7].

Inhibícia rastu a viability buniek sa prejavuje už pri nízkych koncentráciách etanolu, zatiaľ čo fermentačná kapacita je inhibovaná len jeho vyššou koncentráciou, takže tento parameter je etanolom najmenej ovplyvnený [8].

Z uvedeného komplexného vplyvu etanolu na bunku vyplýva problematika definície a merania etanoltolerancie. Keďže neexistuje univerzálna a všeobecne prijatá definícia a technika merania etanoltolerancie, ktorá by zahŕňala všetky aspekty pôsobenia etanolu na bunku, spomenieme najčastejšie používané metódy spolu s uvedením výhod a nevýhod toho-ktorého merania.

#### Etanoltolerancia definovaná ako vplyv etanolu na rast kultúry

Najrozšírenejšia metóda merania etanoltolerancie je založená na meraní rastu kvasiniek v prítomnosti exogénneho etanolu [9], pričom sa stanoví buď koncentrácia etanolu, ktorá úplne inhibuje rast, alebo najvyššia prípustná koncentrácia etanolu dovoľujúca rast kvasiniek za definovaných podmienok. Pre svoju jednoduchosť je vhodná na rozsiahlejší skríning etanoltolerantných kmeňov. Je však známe, že exogénne pridaný etanol je menej toxický ako endogénny etanol produkovaný kvasinkou [10], teda stanovenie etanoltolerancie pomocou pridania exogénneho etanolu nedáva pravdivý obraz o tolerancii k etanolu za fermentačných podmienok, prípadne o vysokej produkcii etanolu. Navyše, etanoltolerancia je ovplyvnená zložením kultivačného média, takže tieto definície musia zohľadňovať podmienky stanovenia: teplotu, koncentráciu substrátu, spôsob prítokovania substrátu, prípravu inokula, prítomnosť živín, straty etanolu vyparovaním a pod. [22, 23, 24, 25].

#### Etanoltolerancia definovaná ako vplyv etanolu na viabilitu kvasiniek

Rýchlosť straty viability sa často využíva ako indikátor vplyvu živín a prostredia na etanoltoleranciu [11].

Bolo zistené, že kvasinky s vysokou etanoltoleranciou, stanovenou meraním rastu, vykazujú nižšiu stratu viability ako menej tolerantné kmene. Avšak kvasinky schopné produkovať vyššiu koncentráciu etanolu mali na konci fermentácie oveľa nižšiu viabilitu [12]. Zvýšenie prežívania buniek v prítomnosti

etanolu možno dosiahnuť zmenou nutričného zloženia rastového média, napr. pridávaním ergosterolu a kyseliny linolénovej, olejovej, pantotenátu, alebo oxygenáciou počas aktívneho rastu [20, 21]. Takisto sa zistili zmeny v rezistencii na etanol v závislosti od fázy rastu. V skorej stacionárnej fáze boli bunky viac rezistentné voči letálnemu vplyvu etanolu ako v strede exponenciálnej fázy [11].

Selekčné metódy založené na viabilite buniek v prítomnosti etanolu umožňujú identifikovať mutanty so zvýšenou etanoltoleranciou ako pôvodné kmene.

### Etanoltolerancia

definovaná ako vplyv etanolu na fermentačnú schopnosť

Ďalší spôsob definície etanoltolerancie je stanovený ako pomer fermentačnej aktivity kvasiniek v médiu bez etanolu k aktivite v tom istom médiu obsahujúcom známu koncentráciu etanolu [13]. Avšak prídavok etanolu nezodpovedá skutočným fermentačným podmienkam a etanoltolerancia nie je vyjadrená absolútnou hodnotou koncentrácie etanolu.

Iná definícia etanoltolerancie zohľadňujúca túto skutočnosť je stanovenie koncentrácie etanolu, ktorá úplne zastaví fermentačnú aktivitu. Predpokladom je však nelimitovaná dostupnosť substrátu [14].

Ďalšia používaná definícia je stanovenie hodnoty ID<sub>50</sub>, teda koncentrácie etanolu, ktorá spôsobí 50%-nú inhibíciu fermentačnej aktivity [11]. Fermentačnú aktivitu kvasiniek je možné sledovať aj meraním objemu CO<sub>2</sub> uvoľneného pri produkcii etanolu [15, 20].

Často používané meranie etanoltolerancie je založené na definícii etanoltolerancie ako maximálnej koncentrácie produkovaného etanolu za stanovených podmienok [16]. Produkciu etanolu však významne ovplyvňuje zloženie kultivačného média a možno povedať, že za vhodných podmienok fermentácie sú ktorékoľvek priemyselné kmene kvasiniek schopné produkovať vysoké koncentrácie etanolu [11].

### Etanoltolerancia

definovaná ako vplyv etanolu na acidifikačnú schopnosť kvasiniek

Metóda založená na extracelulárnej acidifikácii kvasiniek v prítomnosti etanolu je vhodná predovšetkým na rýchle testovanie a porovnávanie etanoltolerancie kvasiniek. Táto metóda využíva jav, že etanol spôsobuje urýchlenie pasívneho prestupu protónov do bunky [17,18]. Etanoltolerantné kvasinky, ktorých membrána je odolnejšia voči narušeniu etanolom, majú teda nižšie extracelulárne pH ako netolerantné kvasinky.

Ďalšia metóda [19] stanovenia etanoltolerancie je založená na vzťahu medzi určitou koncentráciou etanolu a kolapsom protónového gradientu

spolu s inhibíciou rastu v prítomnosti etanolu. Etanoltolerancia je v tomto prípade definovaná ako prahová koncentrácia etanolu, nad ktorou bunky nie sú schopné udržať protónový gradient cez membránu. Pri tejto metóde sa však tiež pridáva etanol exogénne, pričom o nevýhodách takéhoto postupu sme sa zmienili vyššie.

## Záver

Na záver môžeme konštatovať, že etanol ovplyvňuje viaceré parametre kultivácie kvasiniek a má na bunku komplexný vplyv. Z toho vyplývajú aj ťažkosti univerzálnej definície a výberu metódy stanovenia etanoltolerancie. V zásade sa však výber metódy riadi rozsahom a účelom experimentu a tiež snahou čo najviac priblížiť podmienky stanovenia etanoltolerancie nasledovnému použitiu kvasiniek pre žiadané účely. Z toho dôvodu nie je možné jednoznačne odporučiť jedinú zo spomínaných metód bez zohľadnenia uvedených skutočností.

## Literatúra

1. THOMAS, D.S - ROSE, A.H.: Arch. Microbiol., 122, 1979, s. 49.
2. BEAVEN, M.J. - CHARPENTIER, C. - ROSE, A.H.: J. Gen. Microbiol., 128, s. 1447.
3. WALKER-CAPRIOGLIO, H.M. - RODRIGUEZ, R.J. - PARKS, L.W.: Appl. Environ. Microbiol., 50, 1985, s. 685.
4. PORTER, L.H. - OUGH, C.S.: Am. J. Enol. Vitic., 33, 1982, s. 222.
5. OLIVER, S.G.: Chem. Ind., 12, 1984, s. 425.
6. LUONG, J.H.T.: Biotechnol. Bioeng., 27, 1985, s. 280.
7. AGUILERA, A. - BENITEZ, T.: Arch. Microbiol., 142, 1985, s. 389.
8. BROWN, S.W. - OLIVER, S.G. - HARRISON, D.E.F. - RIGHELATO, R.C.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 1981, s. 151.
9. ROSE, A.H.: Soc. Appl. Bacteriol., 9, 1980, s. 103.
10. LOUREIRO, V. - FERREIRA, H.G.: Biotechnol. Bioeng., 25, 1983, s. 2263.
11. KALMOKOFF, M. - INGLEDEW, W.M.: J. Am. Soc. Brew. Chem., 43, 1985, s. 189.
12. DAY, A. - ANDERSON, E. - MARTIN, P.A.: Proc. 15th Conv. Eur. Brew. Cong., IRL Press, Oxford, 1975, s. 377.
13. D'AMORE, T. - PANCHAL, CH.J. - RUSSEL, I. - STEWART, G.G.: Crit. Rev. Biotechnol., 9, 1990, s. 287.
14. CURTAIN, C.C. - ATWELL, J.L. - LORNEY, F.D. - ZAJAC-CADE, A.: Proc. 18th Conv. Inst. Brew., Sydney, 1984, s. 236.
15. NABAIS, R.C. - SA-CORREIA, I. - VIEGAS, C.A. - NOVAIS, J.M.: Appl. Environ. Microbiol., 54, 1988, s. 2439.
16. CASEY, G.P. - MAGNUS, C.A. - INGLEDEW, W.M.: Appl. Environ. Microbiol., 48, 1984, s. 639.
17. JIMENEZ, J. - VAN UDEN, N.: Biotechnol. Bioeng., 25, 1985, s. 1596.
18. CARTWRIGHT, C.P. - JUROSZEK, J.R. - BEAVEN, M.J. - RUBY, F.M.S. - De MORAIS, S.M.F. - ROSE, A.H.: J. Gen. Microbiol., 132, 1986, s. 369.
19. JUROSZEK, J.R. - FEUILLAT, M. - CHARPENTIER, C.: Can. J. Microbiol., 33, 1987, s. 93.

20. CARLSEN, H.N. - DEGN, H. - LLOYD, D.: *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1991, s. 2879.
21. KURIYAMA, H. - KOBAYASHI, H.: *J. Ferm. Bioeng.*, 75, 1993, s. 364.
22. LLOYD, D. - MORRELL, S. - CARLSEN, H.N. - DEGN, H. - JAMES, P.E. - ROWLANDS, C.C.: *Yeast*, 9, 1993, s. 825.
23. BARBOSA, M.F.S. - LEE, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1991, s. 1880.
24. ROSA, M.F. - SA-CORREIA, I.: *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 1992, s. 23.
25. JONES, A.M. - INGLEDEW, W.M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1994, s. 1048.

Do redakcie došlo 24.7.1995.

### **Ethanol tolerance: definition and measurement**

ZUZANA CIESAROVÁ - DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

**SUMMARY.** A paper deals with a comparison of different accesses to ethanol tolerance definition associating with assays choice. Advantages and limitations, application and interpretation of separate measurement assays are described.