

ZMENY OBSAHU LIPIDOV VÍNNYCH KVASINIEK POČAS FERMENTÁCIE IMOBILIZOVANÝMI BUNKAMI

CHANGES IN LIPID CONTENT OF WINE YEASTS DURING FERMENTATION BY IMMOBILIZED CELLS

Ján Šajbidor, Fedor Malik

ABSTRACT

Comparison of the lipid composition of immobilised and non-immobilised 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 immobilised cells as with non-immobilised ones. The ethanol stress raised in immobilised and free cells occurrence of palmitoleic acid to the detriment of palmitic acid. The character of changes in lipid composition during immobilisation probably has an impact upon slightly increased stress resistance. The immobilised cells are as well resistive against passive membrane fluidisation by ethanol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, immobilisation, lipid

ÚVOD

Je známe, že kvasinky reagujú na etanolový stres reštrukturalizáciou intracelulárnych lipidov. Keďže prvým miestom kontaktu bunky s vonkajším prostredím je cytoplazmatická membrána, registrujeme zmeny v zložení sterolov (Shobayashi et al., 2005), fosfolipidov (Carman a Henry, 1989) a mastných kyselín (You et al., 2002). Uvedené zmeny môžeme považovať za súčasť mechanizmov prispôsobenia a charakter týchto zmien je v súlade s teóriou homeoviskózne adaptácie (Šajbidor, 1997). S určitým zjednodušením sa dá konštatovať, že dôsledky adaptácie smerujú k zachovaniu podobných fyzikálnych podmienok v cytoplazmatickej membráne ako boli pred stresom. 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 alternácii mastných kyselín, je špecifickou vlastnosťou kmeňa a závisí okrem genotypu najmä na intenzite stresového faktora. Víne kvasinky sú počas fermentácie dlhodobo vystavené etanolovému stresu. Imobilizáciou sa dostanú do prostredia, ktorého vplyv na niektoré fyziologické parametre kvasinkovej populácie je predmetom diskusií (Jirku 1999). Najpoužívanejšou 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 fyzikálno-chemicky pôsobí 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 ine rastové charakteristiky a mení sa aj aktivita enzýmov glykolýzy. Zmeny boli zaznamenané aj v zložení cytoplazmatickej membrány a bunkových stien (Rotmann a Rehm, 1990). 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 (You et al., 2002). Vysoký obsah nenasýteným mastných kyselín vo fosfolipidoch a kyseliny palmitovej v esterifikovaných steroloch sú tiež v priamej súvislosti s prežívaním stresovaných buniek (Mishra a Prasad, 1989). Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv imobilizácie kmeňa vínej 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, hlbokoprekvávajúci 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%-ného alginátového gélu sme použili metódu "entrapment". Suspenziu kvasiniek v sóle alginátu sodného sme po kvapkách gélovali v 0,2 M roztoku chloridu vápenatého. Tak sme pripravili preparát imobilizovaných kvasiniek vo forme gélových guľičiek 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%-ného 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 et al. (1954). Pre porovnanie sme podobným spôsobom spracovali aj vzorku imobilizovaných kvasničných buniek po trojdňovej fermentácii ovocného muštu. Získané chloroformové

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

mastné kyseliny (%)						
označenie	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%-tým etanolom, IB-imobilizované bunky po 3h vo fyziologickom roztoku, FE-neimobilizované bunky stresované 3h 10%-ným etanolom.

extrakty sme na rotačnej vákuovej odparke zahustili a gravimetricky stanovili obsah lipidů. Časť sme použili na spektrofotometrické stanovenie sterolov. Vo zvyšku lipidů sme analyzovali profil mastných kyselín plynovou chromatografiou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

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. Je možné predpokladať, že kvasinka po imobilizácii reštrukturalizuje membránové lipidy v relatívne malom rozsahu. Prítomnosť etanolu znížila detegované množstvo celkového lipidů v preparáte imobilizovaných (IE) ale aj voľných (FE) kvasiniek. Pokles je možné vysvetliť permeabilizáciou membrány a čiastočnou extrakciou lipidů 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 súčasnom zvýšení 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 lipidů, 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 významný vplyv.

ZÁVER

Porovnanie zloženia lipidů 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 lipidů pri imobilizácii vedie pravdepodobne k mierne zvýšenej odolnosti na stres. Imobilizované bunky sú odolnejšie aj voči pasívnej fluidizácii membrány etanolom.

LITERATÚRA

- CARMAN, G. M., HENRY, S. A. 1989. Phospholipid Biosynthesis in Yeast. In *An. Rev. Biochem.*, 58, 1989, 635-667
- FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue. In *J. Biol. Chem.*, 225, 1957, 497-509.
- JIRKŮ, V. 1999. Whole cell immobilization as a means of enhancing ethanol tolerance. In *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 1999, 147-151.
- MISHRA, P., PRASAD, R. 1989. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 1989, 294-298.
- ROTMANN, B. H., REHM, H. J. 1991. Relationship between fermentation capability and fatty acid composition of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 1991, 502-508.
- SHOBAYASHI, M., SHIN-ICHIRO MITSUEDA, S., AGO, M., FUJII, T., IWASHITA, K., IEFUJI, H. 2005. Effects of Culture Conditions on Ergosterol Biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. In *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2005, 2381-2388.
- ŠAJBIDOR, J. 1997. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. In *Crit. Rev. Biotechnol.*, 17, 1997, 87-103.
- YOU, K. M., ROSENFELD, C. L., KNIPPLE, D.C. 2003. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. In *Appl. Env. Microbiol.*, 69, 2003, 1499-1503.

Kontaktná adresa:

Ján Šajbidor, prof. Ing. DrSc.
Fedor Malík, prof. Ing. DrSc.
Ústav biotechnológie a potravinárstva FCHPT STU
Radlinského 9
812 37 Bratislava
jan.sajbidor@stuba.sk