



Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej

Włodzimierz Grajek, Daria Szymanowska

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

The influence of environmental stresses on *Saccharomyces cerevisiae* yeast in ethanol fermentation

Summary

The development of ethanol fermentation process brings numerous environmental stresses influenced by the survival and metabolism of industrial microorganisms. *Saccharomyces cerevisiae* strains have evolved to survive constant fluctuation in their external surroundings by special adaptation systems. These adaptation mechanisms involve reorganization of genomic expression by activation of transcriptional factors under stress conditions and production of suitable metabolites increased by cell survival. This review is focused on the metabolism and genetic response of cells to diverse environmental changes, especially to heat, osmotic, ethanol, oxidative, toxic and other physico-chemical stresses.

Key words:

yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, osmotic stress, heat stress, oxidative stress, ethanol stress, cell response, ethanol, fermentation.

Adres do korespondencji

Włodzimierz Grajek,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań;
e-mail:
grajek@up.poznan.pl

1. Wstęp

Rozwój technologii produkcji bioetanolu, jaki nastąpił w ostatnich latach, doprowadził do znacznej intensyfikacji procesów hydrolizy surowców węglowodanowych oraz fermentacji etanolowej. Zmiany te wpłynęły na pogorszenie warunków środowiskowych, w których przebiega wzrost i metabolizm komórek drożdżowych. Do najistotniejszych zmian determinujących funkcjonowanie drobnoustrojów w fermentacjach przemysłowych należą:

1) podwyższenie temperatury zacierów poddawanych fermentacji w związku z prowadzeniem jednoczesnej hydrolizy polisacharydów skrobiowych i fermentacji etanolowej, czego skutkiem jest stres temperaturowy,

2) zwiększenie ciśnienia osmotycznego w wyniku stosowania gęstych zacierów, często powyżej 25% wag./obj. suchej substancji, oraz recyrkulacji frakcji ciekłej wywaru, co prowadzi do kumulacji zawartych w niej soli mineralnych, a to, obok wysokiego stężenia cukrów w zacierze, generuje stres osmotyczny,

3) zwiększenia stężenia etanolu, nawet do 15% obj., wskutek stosowania gęstych zacierów, co pogłębia stres osmotyczny i dodatkowo nakłada się na stres wywołany obecnością inhibitorów wzrostu komórek,

4) zwiększenie stężenia toksycznych związków chemicznych, będących inhibitorami wzrostu komórek drożdżowych, w wyniku ich kumulacji w recyrkulowanym wywarze,

5) zwiększenie stężenia metabolitów wykazujących działanie utleniające, co generuje stres tlenowy,

6) możliwość wystąpienia stresu spowodowanego niedoborem niektórych składników pokarmowych, wskutek prowadzenia intensywnej fermentacji przy podwyższonej gęstości populacji komórek drożdżowych w fermentowanym zacierze,

7) zagrożenie komórek uszkodzeniami mechanicznymi wskutek narażenia na bezpośredni kontakt z ruchomymi elementami urządzeń technologicznych, jak mieszadła, pompy i wirówki, generującymi duże siły ścinania i tym samym wywołującymi silny stres mechaniczny.

Wymienione utrudnienia prowadzą w praktyce do wystąpienia stresu wieloczynnikowego, w którym nakładają się na siebie jednocześnie wszystkie stresy jednoczynnikowe. Może to mieć bardzo negatywny wpływ na wyniki fermentacji i bez wątpienia komórki drożdżowe są najbardziej wrażliwym ogniwem w całym procesie przemysłowej produkcji bioetanolu.

Większość czynników stresowych jest pochodzenia egzogenego, tzn. działa z zewnątrz komórki, jak stres cieplny, częściowo stres osmotyczny, stres ciśnieniowy, stres mechaniczny i stres pH. Pewna część z tych stresów działa bezpośrednio z dużą intensywnością na powierzchnię komórki, jak stres mechaniczny i ciśnieniowy, natomiast część z nich działa w sposób złożony, jak stres osmotyczny, powodowany akumulacją metabolitów komórkowych, ponadto stres powodowany obecnością inhibitorów, a nawet częściowo stres osmotyczny, wynikający z dużego stężenia metabolitów wewnątrzkomórkowych.

Poznanie mechanizmów odpowiedzi komórki na wystąpienie poszczególnych stresów i ich interakcje krzyżowe może ułatwić takie kierowanie przebiegiem fermentacji, aby zredukować do minimum negatywne skutki stresów i tym samym usprawnić przebieg procesu fermentacji. Zwykle reakcja komórki na wystąpienie czynników stresowych jest wielokierunkowa i objawia się istotnymi zmianami metabolicznymi (tab.).

Odpowiedź metaboliczna komórek drożdżowych na stres środowiskowy

Stres	Odpowiedź metaboliczna
termiczny	synteza białek szoku cieplnego Hsp104 i Hsp70, synteza trehalozy, zwiększenie stopnia nienasycenia kwasów tłuszczowych w błonach, uaktywnienie H ⁺ -ATPazy
osmotyczny	synteza glicerolu i trehalozy
oksydacyjny	synteza glutationu, tioredoksyny i glutaredoksyny, synteza manganozależnej dysmutazy nadtlenkowej i katalazy
etanolowy	synteza białek szoku cieplnego (Hsp104, Hsp70, Hsp 30, Hsp26)
toksyczny	syntaza γ -glutamyllo-cysteinowa, dysmutaza ponadtlenkowa

Drożdże *S. cerevisiae* ciągle należą do głównych drobnoustrojów wykorzystywanych na całym świecie do przemysłowej produkcji bioetanolu zarówno z surowców skrobiowych, jak i surowców celulozowych. Mikroorganizmy te są także przedmiotem modyfikacji genetycznych rozszerzających ich zdolności do fermentacji pentoz i hydrolizy polimerów roślinnych.

W ostatnich latach zwraca się coraz większą uwagę na dobór drobnoustrojów przemysłowych wykazujących dużą odporność na niekorzystne warunki środowiskowe. Jest to jedno z głównych zagadnień biotechnologii przemysłowej, które musi być szybko rozwiązane. W bieżącej literaturze naukowej można znaleźć wiele publikacji poświęconych wyjaśnianiu metabolicznych i molekularnych podstaw odpowiedzi komórek na wystąpienie poszczególnych stresów środowiskowych. Większość tego typu badań odnosi się do stresów wywołanych w warunkach laboratoryjnych, natomiast do rzadkości należą prace dotyczące procesów fermentacji prowadzonych w warunkach przemysłowych. Zrozumienie zależności między realnymi warunkami fermentacji przemysłowej a funkcjonowaniem drobnoustrojów, jest kluczem do właściwego doboru odpowiednich szczepów i sprawnego kierowania przebiegiem procesu fermentacji.

2. Stres cieplny

Postęp technologiczny w przemysłowej produkcji bioetanolu wymusił prowadzenie procesu fermentacji w maksymalnie wysokiej temperaturze, tylko nieznacznie niższej od temperatury subletalnej. Wynika to z wymagań, jakie stawia proces jednoczesnej hydrolizy enzymatycznej skrobi i fermentacji, prowadzonych w jednym zbiorniku. Jak dotąd brak jest handlowych preparatów enzymów amylolitycznych, których optima temperaturowe są zbliżone do wymagań temperaturowych drożdży. Większość enzymów stosowanych w gorzelnictwie ma optima w granicach 55-95°C, a zatem na poziomie całkowicie letalnym dla wszystkich stosowanych ras

drożdży gorzelnicznych. W tej sytuacji próbuje się znaleźć szczepy drożdży odznaczających się możliwie wysoką termotolerancją tak, aby temperatura fermentacji zbliżała się do zakresu efektywnego działania enzymów. Jak dotąd udało się przesunąć temperaturę fermentacji z 30-32°C do temperatury 35-37°C. Przykładowo, takie warunki temperaturowe wytrzymują niektóre rasy drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae*, jak Ethanol Red i Red Star francuskiej firmy Lesaffre, czy polskie rasy: D2 lub As4. Według źródeł literaturowych drożdże z *S. cerevisiae* wytrzymują temperaturę do ok. 41°C, natomiast w temperaturze 42°C następuje zatrzymanie ich rozmnażania, a w temperaturze 43°C ich śmierć (35). Stosowanie temperatury zacierów powyżej 35°C oznacza, że przez cały czas procesu przemysłowej fermentacji komórki drożdży są narażone na permanentny stres temperaturowy.

W przypadku wystąpienia gwałtownej zmiany temperatury dochodzi do szoku temperaturowego. W takich warunkach ustają podziały komórek, a cykl komórkowy zatrzymuje się w fazie G1, na etapie regulatorowym Start, co objawia się nagromadzeniem w pożywce komórek niepączkujących. W takich warunkach dochodzi do gwałtownego, krótkotrwałego wzrostu poziomu mRNA w komórkach, który potem ulega szybko degradacji, a także zmiany płynności błon, zmian w profilu i ilości syntetyzowanych białek oraz zmian ultrastrukturalnych (33).

2.1. Zmiany w błonach

Stres cieplny nie ma silnego wpływu na kształt komórki, a zmiany dotyczą głównie właściwości mechanicznych błony (31). Ogólnie wraz ze wzrostem temperatury rośnie płynność membran. Może to prowadzić do dezintegracji dwuwarstwy fosfolipidowej i w konsekwencji do śmierci komórki. W przypadku chłodzenia komórek widoczny jest z kolei wzrost sztywności błon komórkowych (21). Ponadto na plastyczność ściany komórkowej pewien wpływ mają Hsp12p, tworzone w szoku cieplnym. Karreman i in. wykazali, że białko to usztywnia ścianę *S. cerevisiae* (24).

Pod wpływem stresu termicznego, a także stresu etanolowego, wyraźnie zmienia się skład kwasów tłuszczowych w błonach biologicznych. Objawia się to przede wszystkim zwiększeniem stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych i steroli błonowych. W ten sposób mikroorganizm ogranicza nadmierną płynność błon i zapobiega ich rozrywaniu (51). U *S. cerevisiae* zwiększeniu nasycenia lipidów błonowych towarzyszy wzrost syntezy białek szoku termicznego (6). W badaniach prowadzonych przez Swana i Watsona wykazano, że drożdże pozbawione genów syntezy ergosterolu (*erg1*) były znacznie bardziej wrażliwe na stresy (52). Indukcja syntezy ergosterolu i białek szoku termicznego w odpowiedzi na stres cieplny wyraźnie zwiększyła tolerancję komórek na ten czynnik. Wykazano także, że dodatek ergosterolu do pożywki zwiększa poziom sterolu w komórkach i zwiększa ich tolerancję na oba rodzaje szoków.

2.2. Trehaloza

Jednym z głównych metabolitów drożdży gromadzonych w komórce w sytuacjach stresowych jest trehaloza. Jest to cukier zbudowany z dwóch cząsteczek glukozy (1- α -D-glukopiranozylo-1,1- α -D-glukopiranozyd), o właściwościach nieredukujących. Trehaloza jest kumulowana w komórkach eksponowanych na stres związany z szokiem termicznym, zamrażaniem, odwadnianiem i kontaktem komórek z etanolem. W trakcie fermentacji etanolowej jej ilość w komórce może nawet przekraczać 100 mg/g s.m. i jest dodatnio skorelowana z tolerancją danego szczepu na etanol (34). W jej syntezie bierze udział syntaza trehalozo-6-fosforanowa oraz fosfataza trehalozo-6-fosforanowa, kodowana przez cztery geny. Pierwszy z tych enzymów jest regulowany przez mechanizm aktywacji i represji katabolicznej. W obecności glukozy trehaloza nie jest syntetyzowana, jednak jej synteza uruchamia się przy wysokim ciśnieniu osmotycznym w pożywce. W metabolizm trehalozy zaangażowane są z kolei dwa enzymy: cytozolowa neutralna trehalaza, kodowana przez gen *NTH1*, i kwaśna trehalaza, gromadzona w wakuolach, kodowana przez gen *ATH1*. Duży wpływ na stężenie wewnątrzkomórkowej trehalozy ma aktywność neutralnej trehalazy, enzymu rozkładającego ten disacharyd. Na podstawie wielu danych wskazuje się, że komórki drożdży dążąc do zachowania wysokiego poziomu trehalozy, niezbędego do utrzymania termotolerancji, zmniejszają aktywność trehalazy (54).

Produkcja trehalozy nasila się już w temperaturze 30°C i rośnie wraz ze wzrostem temperatury. W szczegółowych badaniach wykazano, że synteza trehalozy oscyluje w rytmie zmian temperatury i jednocześnie w rytmie presji oksydacyjnej (56). Przy wzroście temperatury od 30 do 42°C zawartość trehalozy w komórce wzrasta kilkadziesiąt razy, choć przy wydłużeniu czasu inkubacji komórek w tej temperaturze zawartość tego disacharydu zmniejsza się. Wykazano, że poziom tego cukru jest szczepozależny (54), co sugeruje, że produkcja trehalozy może być użyta jako kryterium selekcyjne przy wyborze stresoodpornych szczepów przemysłowych. Warto jednak podkreślić, że wysoka akumulacja trehalozy nie jest wystarczająca, aby zapewnić dobrą tolerancję na wysoką temperaturę. Warunkiem koniecznym, obok kumulacji trehalozy, jest, jak się wydaje, kumulacja białek szoku cieplnego (2). Istnieją także dane wskazujące, że geny, które kodują dwie podjednostki syntazy trehalozo-6-fosforanowej, należą do białek szoku cieplnego.

Główna rola trehalozy, jak się wydaje, polega na ochronie stabilności uwodnionych związków chemicznych oraz na uszczelnianiu błon, co zapobiega utracie elektrolitów i rozpuszczalnych składników komórkowych. Trehaloza chroni także lipidy przed utlenianiem. Przez długie lata była uważana za substancję zapasową. We współcześnie prowadzonych badaniach wykazano jednak, że jest to jedna z głównych substancji ochronnych w sytuacjach stresu środowiskowego. Cukier ten odgrywa ważną rolę nie tylko w utrzymaniu odpowiedniej struktury błon biologicznych, ale pełni także ochronną rolę w stosunku do białek, stabilizując wiązania wodorowe

przy wzroście temperatury, stąd trehaloza jest zaliczana do tzw. zgodnych (kompatybilnych) cząsteczek (ang. *compatible solutes*).

Synteza trehalozy ulega wyraźnej intensyfikacji pod wpływem stresu cieplnego oraz w nieco mniejszym zakresie, przy rosnącym ciśnieniu osmotycznym w pożywce. Komórki drożdżowe dysponują także dwoma systemami transportowymi do przemieszczania cząsteczki trehalozy przez błonę cytoplazmatyczną, w tym H⁺-symportem kontrolowanym przez geny *MAL* (50).

Obok trehalozy w komórkach *S. cerevisiae* gromadzi się też glicerol i w niewielkich ilościach ergosterol, a także glikogen, stanowiący substancję zapasową komórek.

2.3. Białka szoku cieplnego

Jedną z najlepiej poznanych reakcji komórek na wystąpienie szoku cieplnego jest synteza tzw. białek szoku cieplnego (hsp, ang. *heat-shock protein*), znanych także pod nazwą chaperonów, czyli białek opiekuńczych. Zostały one odkryte w trakcie studiów nad reakcją komórek na gwałtowną zmianę temperatury hodowli różnych organizmów żywych, w tym u drożdży. Okazało się, że białka te są produkowane również w innych rodzajach stresów. Białka szoku cieplnego są ewolucyjnie konserwatywne, o wysokiej homologii sekwencji aminokwasowych. Odgrywają one ważną rolę w formowaniu i stabilizowaniu struktury innych białek komórkowych. W czasie translacji wiążą się one z tworzoną peptydem tworząc kompleks chaperon-polipeptyd. W sensie biochemicznym funkcjonują one jako powolne ATP-azy. Utrzymują one kompleks z polipeptydem w miejscu katalitycznym tak długo, aż ADP, znajdujący się w tym miejscu, nie zostanie zamieniony na ATP. W tym momencie następuje uwolnienie polipeptydu. Dzięki wysokiemu powinowactwu ADP-chaperonów do niesfałdowanych łańcuchów polipeptydowych unika się płątania łańcuchów i ich wzajemnych, niekontrolowanych interakcji. Następnie chaperony pomagają polipeptydom w odpowiednim pofałdowaniu struktury trzeciorzędowej, zgodnie z regułami termodynamiki, zapewniając maksymalną stabilność nowym cząsteczkom białkowym. Po zakończeniu formowania natywnych białek rozpoczyna się ich opiekuńcza rola polegająca na zapobieganiu denaturacji i wtórnej agregacji białek pod wpływem warunków stresowych. Wykazano, że w komórkach wraz ze wzrostem temperatury hodowli rośnie stężenie białek szoku cieplnego. Zjawisko to występuje we wszystkich rodzajach organizmów prokariotycznych i eukariotycznych.

U drożdży występuje kilka klas białek szoku cieplnego, w tym najbardziej znane Hsp70 i Hsp104 oraz Hsp 82, Hsp78, Hsp 30 i Hsp26. Część z tych białek jest syntetyzowana zawsze, niezależnie od warunków środowiskowych, a niektóre z nich tylko pod wpływem stresu. Z termotolerancją drożdży jest związane głównie białko Hsp104, oraz w mniejszym zakresie Hsp70 (13,33). Jednakże Hsp70 działa, jak się wydaje, przede wszystkim przy umiarkowanym nasileniu stresu temperaturowego,

podczas gdy Hsp104 jest niezbędne do naprawy uszkodzeń białek wynikających z działania wyższych temperatur, a szczególnie przy dezagregacji białek. Po dezagregacji oba typy hsp, tj. Hsp70 i Hsp104, mogą prowadzić dalej proces kontrolowanego fałdowania białek.

Wiele wskazuje, że białko Hsp104 jest głównym chaperonem w systemie obronnym komórek drożdżowych. Odpowiada ono za blokowanie, dezagregację i rozpuszczanie białek, prawidłowe fałdowanie białek i reaktywację splicingu mRNA po inaktywacji cieplnej. Należy zaznaczyć, że białko Hsp104 jest niezbędne, a jednocześnie wystarczające, do zapewnienia przeżywalności komórek eksponowanych na temperatury subletalne (29,47). Brak tego białka powoduje utratę tolerancji etanolowej, tolerancji cieplnej i tolerancji na etanol indukowanej przez szok temperatury (33). W temperaturze 40°C syntetyzowane są zarówno Hsp104, jak i Hsp70. Komórki zawierające te białka przeżywały nawet temperaturę letalną 52°C, choć żywotność komórek uległa obniżeniu (54).

Gwałtowny wzrost temperatury hodowli, z wyjątkiem białek szoku cieplnego, hamuje całkowicie syntezę większości białek komórkowych. Utrudnia to przejście komórek z fazy G1 cyklu komórkowego do fazy S i tym samym hamuje rozmnażanie komórek. W początkowych etapach procesu fermentacji, gdy gęstość populacji komórek jest niska, odbija się to wyraźnie na szybkości i wydajności produkcji etanolu, jednak przy dużej koncentracji komórek drożdżowych nie ma to tak destrukcyjnego znaczenia. Należy jednak podkreślić, że w przypadku fermentacji etanolowej mamy do czynienia z permanentnym stresem cieplnym, a nie z szokiem termicznym.

3. Stres osmotyczny

Intensyfikacja procesu fermentacji wymaga stosowania gęstych zacierów gorzelniczych. W ostatniej dekadzie rozwinięto technologię znaną pod nazwą VHG (ang. *Very High Gravity*), w której stosuje się zacierzy zawierające nawet do 30-40% suchej substancji (12,45,56). Takie postępowanie przynosi szereg korzyści. Po pierwsze, znacznie zmniejsza zużycie wody technologicznej, a po drugie wskutek uzyskania wyższych stężeń etanolu, nawet powyżej 15% w/v, możliwa jest redukcja kosztów destylacji etanolu. Niestety, stosowanie wysokiego stężenia substratu pociąga za sobą wystąpienie wysokiego ciśnienia osmotycznego w zacierach (12,20). W celu zmniejszenia stresu osmotycznego wprowadzono nowe rozwiązania technologiczne. Polegają one na stosowaniu dwustopniowej hydrolizy skrobi lub na stosowaniu procesu jednoczesnej hydrolizy skrobi i fermentacji etanolowej. W ten sposób w trakcie procesu fermentacji stężenie glukozy i maltozy utrzymywane jest na relatywnie niskim poziomie, rzędu 1-5%, gdyż uwalniane cukry są natychmiast wykorzystywane przez drożdże, co eliminuje inhibicję przez substrat. W tych warunkach głównym czynnikiem generującym stres osmotyczny jest etanol, kumulujący się

w zacierze odfermentowanym. Należy pamiętać, że etanol, mający niższą masę cząsteczkową od glukozy i maltozy, silniej zwiększa ciśnienie osmotyczne niż wymienione cukry. Prowadzone są próby zmniejszenia ciśnienia osmotycznego generowanego przez etanol. Opierają się one głównie na ciągłym usuwaniu etanolu z fermentującego zacieru w trakcie procesu fermentacji. W tym kontekście można wskazać próby wprowadzania nowych rozwiązań technologicznych, jak fermentację w warunkach destylacji próżniowej, czy ciągłą perwaporację etanolu, jednak są to technologie drogie i, jak dotąd, nie znalazły one masowego zastosowania w przemyśle.

Trzecim istotnym czynnikiem generującym stres osmotyczny, obok cukrów i etanolu, są sole mineralne. Wprowadzenie do praktyki produkcyjnej recykulacji frakcji ciekłej wywaru gorzelniczego oznacza w praktyce ciągłą kumulację w zacierach soli mineralnych oraz niskocząsteczkowych, nielotnych metabolitów drożdżowych. Biorąc pod uwagę fakt, że wywar może być recykulowany wielokrotnie, czynnik ten należy traktować bardzo poważnie. Próby demineralizacji recykulowanych wywarów nie wyszły dotąd poza badania pilotażowe.

3.1. Zmiany w strukturze komórki

Błona cytoplazmatyczna jest pierwszą powierzchnią kontaktu komórki ze środowiskiem zewnętrznym, stąd w obecności czynnika stresującego można zaobserwować szereg zmian w jej strukturze. Większość stresów związanych z fermentacją etanolową prowadzi do wzrostu przepuszczalności błony cytoplazmatycznej i powoduje zmiany w składzie lipidów i białek błonowych (4). Wynikiem tych zmian są zakłócenia w funkcjonowaniu błony. Jedną z głównych funkcji błon biologicznych jest kontrola transportu składników odżywczych do komórki i wyprowadzaniu z nich wytworzonych metabolitów. Uszkodzenia w strukturze dwuwarstwowej błony fosfolipidowej oraz częściowa denaturacja białek błonowych są szczególnie widoczne w trakcie wystąpienia długotrwałego szoku termicznego. Wynikiem tego jest utrata, przynajmniej częściowa, kontroli nad wymianą masy i wyciek elektrolitów. Dobrym miernikiem zmian w obrębie błony cytoplazmatycznej drożdży mogą być modyfikacje w strukturze frakcji lipidowej plazmalemy (49).

W większości przypadków komórka ogranicza działanie stresu przez zmniejszenie powierzchni, na jaką ten stres oddziałuje. Reakcja ta jest najbardziej widoczna w stresie osmotycznym, gdy w pierwszej fazie odpowiedzi komórkowej zachodzi pasywna osmoregulacja przez wyrzucenie wody w celu zagęszczenia składników cytoplazmy. Szybkość redukcji objętości komórki i jej zakres mogą mieć negatywny wpływ na żywotność komórek (11). W wyniku szoku osmotycznego komórka umieszczona w roztworze sorbitolu o ciśnieniu 5,6 MPa redukuje swoją objętość o 55-65% już po jednej minucie inkubacji (49). Zakres redukcji objętości komórek zależy w dużym stopniu od fazy wzrostu kultury drożdży i jest większy w fazie logarytmicznej, niż w fazie stacjonarnej. Wielu autorów sugeruje ścisły związek między

śmiercią komórek a zbyt daleko posuniętym zmniejszeniem objętości komórek (49,55).

Pod wpływem stresu osmotycznego, obok zmniejszenia powierzchni komórki, mogą wystąpić także uszkodzenia błony cytoplazmatycznej. Dotyczy to szczególnie zmian w białkach błonowych, które, przy silnym odwodnieniu wywołanym przez wiązanie wody przez zewnątrzkomórkową substancję osmogenną, ulegają denaturacji lub agregacji. Zmiany te można obserwować stosując spektroskopię transformacji Fouriera w podczerwieni (31,44). Warto odnotować, że substancje osmogenne, a szczególnie cukry i alkohole, wykazują działanie ochronne, stabilizujące cząsteczki białek. Innym efektem zmian w ciśnieniu osmotycznym są poprzeczne przemieszczenia kwasów tłuszczowych w dwuwarstwie fosfolipidowej.

3.2. Synteza glicerolu

Obok zmniejszenia objętości komórki w celu zagęszczenia cytoplazmy, drugą najistotniejszą odpowiedzią drożdży jest natychmiastowa synteza związków o charakterze osmogennym, przede wszystkim glicerolu. Jego synteza i częściowa akumulacja jest związana z podnoszeniem wewnątrzkomórkowego ciśnienia osmotycznego (turgoru komórki), w odpowiedzi na wysokie ciśnienie zewnętrzne wywołane obecnością soli mineralnych i cukrów (28,41). Synteza glicerolu nasila się w trakcie długotrwałego stresu osmotycznego, podczas gdy synteza trehalozy jest odpowiedzią głównie na gwałtowny stres cieplny. Carvalheiro i in. wykazali, że maksimum stężenia trehalozy i glicerolu występuje przy inkubacji komórek w 0,75 M roztworze NaCl i w temperaturze 44°C (7). Redukcja stężenia chlorku sodu do 0,25M, przy utrzymaniu temperatury 44°C, zmniejsza stężenie trehalozy o 73%, a glicerolu o 51%.

3.3. Białka szoku cieplnego

W literaturze naukowej istnieją także sugestie, że pod wpływem szoku osmotycznego syntetyzowane są niektóre białka szoku cieplnego. Przykładem może być Hsp12p, które jest gromadzone w ścianie komórkowej w celu jej usztywnienia (23). Hsp12 jest także produkowane w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, przekraczającego 100 MPa (14).

4. Stres etanolowy

Przebieg procesu fermentacji odznacza się tym, że namnażanie drożdży zachodzi głównie w pierwszej dobie fermentacji, po czym ilość drożdży ulega stabilizacji, natomiast stężenie etanolu nadal się zwiększa. Właściwa szybkość wzrostu drożdży

i właściwa szybkość produkcji etanolu są zatem odwrotnie skorelowane, co można uznać za zjawisko korzystne. Stosowanie technologii opartych na fermentacji gęstych zacierów powoduje nie tylko szok osmotyczny, jak już wspomniano, ale ponadto stwarza zagrożenie dla integralności komórek drożdżowych przez wysokie stężenie etanolu, które może sięgać skrajnie nawet 18%. Etanol działa w tym przypadku jak rozpuszczalnik organiczny dla fosfolipidów stanowiących główny składnik błon komórkowych, co prowadzi do szybkiej dezintegracji struktury komórek drożdżowych. Należy przy tym pamiętać, że wewnątrzkomórkowe stężenie etanolu jest większe niż stężenie etanolu mierzone w zacierze. Oznacza to, że jako jedno z najważniejszych kryteriów przy doborze odpowiednich ras drożdży gorzelniczych musi być brana pod uwagę ich tolerancja na wysokie stężenia etanolu (10). Przykładowo, przy fermentacji typu VHG dobrze sprawdzają się drożdże rasy Red Star.

Od dawna wiadomo, że etanol wykazuje działanie toksyczne na komórki drożdżowe, co objawia się nie tylko uszkodzeniami błony cytoplazmatycznej i wewnętrznych struktur komórkowych, ale także denaturacją białek i odwodnieniem wielu polimerów komórkowych. Skutkiem tego jest zakłócenie funkcji enzymów wewnątrzkomórkowych, co silnie rzutuje na metabolizm drożdży. Stres etanolowy w dużej części jest spowodowany stresem wodnym, gdyż znaczna część wody zawartej w komórce wchodzi w interakcje z etanolem, co prowadzi do silnej redukcji aktywności wody (a_w) w komórce (19). Drożdże *S. cerevisiae* rosną w relatywnie wąskim przedziale a_w , między 0,9 a 1, z optimum przy 0,975-0,999. Ich wzrost jest hamowany już od $a_w = 0,94$, a całkowicie zatrzymany przy 0,92.

Etanol silnie oddziałuje z cząsteczkami wody, odciągając je od białek, kwasów nukleinowych i polisacharydów i tym samym zakłócając ich aktywność fizjologiczną. Roztwór wodny etanolu o stężeniu 10-15% ma a_w w granicach 0,95-0,92, a zatem na poziomie co najmniej silnie hamującym rozwój drożdży. Przy tak wysokim stężeniu etanolu aktywność enzymów związanych z glikolizą zmniejsza się o połowę. Pojawiały się także sugestie, że w wyniku fermentacji etanolowej w cytoplazmie gromadzą się jony wodorowe, powodując jej zakwaszenie. Jednakże, hipoteza ta, jak się wydaje, nie znajduje potwierdzenia w wynikach badań (46).

Liczne obserwacje wskazują, że biosynteza trehalozy jest także indukowana przez etanol obecny w pożywce (19). W badaniach przeprowadzonych na drożdżach gorzelniczych wykazano, że maksimum stężenia trehalozy w komórkach występuje przy 10-15% stężeniu etanolu. Dalszy wzrost stężenia etanolu do 20% prowadzi u zdecydowanej większości szczepów do wyraźnej redukcji zawartości trehalozy w komórce, choć są szczepy, u których maksymalne stężenie trehalozy stwierdzano po 30-minutowej inkubacji w 20% roztworze etanolu.

W wegetatywnych formach komórek drożdżowych w obecności etanolu zachodzi także indukcja syntezy białek szoku cieplnego. Wykazano, że Hsp104, Hsp70 i Hsp26 są syntetyzowane już przy stężeniu etanolu na poziomie 4% i ich ilość rośnie wraz ze wzrostem stężenia etanolu do 10%. W odróżnieniu od nich, Hsp82 i występujące w błonach Hsp30 wykazują maksimum stężenia przy 6% stężeniu

etanolu (43). To ostatnie białko spełnia rolę negatywnego regulatora błonowej H^+ -ATP-azy.

5. Stres oksydacyjny

Drożdże są fizjologicznie przystosowane do wzrostu i rozmnażania zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. W zasadzie w warunkach fermentacji etanolowej wzrost drożdży przebiega całkowicie beztlenowo, a tlen pozyskiwany jest z cząsteczek cukrów. W procesie redukcji tlenu w łańcuchu tlenowym w mitochondriach pewna część tlenu z jego ogólnej puli, szacowana na ok. 2% wykorzystywanego tlenu, nie jest redukowana, lecz ulega przekształceniu w rodniki hydroksylowe ($OH\bullet$), ponadtlenkowe ($O_2\cdot^-$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2). Ilość tych rodników gwałtownie wzrasta w obecności tlenu gazowego. Ponadto produkcję reaktywnych form (RFT) tlenu wzmagają szok cieplny oraz obecność etanolu i metali ciężkich. Wszystkie te czynniki powodują uszkodzenia w białkach mitochondrialnych, szczególnie w cytochromie *bc₁*, co zakłóca prawidłowy przebieg reakcji związanych z redukcją tlenu.

Komórki drożdżowe zostały wyposażone w szereg zabezpieczeń przed niszczącym działaniem reaktywnych form tlenu. Należy do nich system oparty na produkcji wewnątrzkomórkowych przeciwutleniaczy, jak cysteina i glutation, oraz enzymów antyoksydacyjnych, jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, oksydaza ksantynowa i dehydrogenaza ksantynowa. W warunkach tlenowych aktywność wymienionych enzymów wzrasta kilkakrotnie (44). Gwałtownie wzrasta też biosynteza cysteiny i glutationu.

5.1. Enzymy antyoksydacyjne i antyoksydanty

Odpowiedzią komórek na pojawienie się reaktywnych form tlenu jest ich neutralizacja na drodze enzymatycznej i biochemicznej. Wśród enzymów antyoksydacyjnych najważniejszą rolę odgrywają mitochondrialna, manganozależna dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD-1), cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa miedzi i cynkozależna (Cu,ZnSOD-2) i cytoplazmatyczna katalaza (CT). W ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym, jednak w mniejszym zakresie, włączona jest także peroksydaza tioredoksyny (39). W badaniach z użyciem mutantów pozbawionych określonych genów wykazano, że brak tych enzymów znacznie zmniejsza tolerancję komórek na wysoką temperaturę i obecność etanolu (9,37).

W niektórych doniesieniach wykazuje się, że w obecności etanolu dochodzi do indukcji cytochromu P_{450} . Rola tego enzymu nie jest jednak w pełni wyjaśniona. Prawdopodobnie bierze on udział w usuwaniu etanolu z komórek drożdżowych w procesach jego utleniania w reticulum endoplazmatycznym (36).

Poziom aktywności enzymów oksydacyjnych zależy od wieku populacji komórkowej. W czasie długotrwałego utrzymywania kultury stacjonarnej *S. cerevisiae* obserwowano zmniejszenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i wzrost aktywności katalazy. Zjawisko to wynika prawdopodobnie z inaktywacji dysmutazy ponadtlenkowej przez rodniki tlenowe, podczas gdy katalaza i peroksydaza glutationowa są aktywowane przez nadtlenek wodoru (22).

5.2. Glutation

Do czynników biochemicznych biorących udział w likwidacji stresu oksydacyjnego należy zaliczyć glutation, tioredoksynę, glutaredoksynę i cysteinę. Synteza wszystkich wymienionych czynników antyoksydacyjnych jest indukowana przez obecność nadtlenu wodoru.

Glutation, tiolowy tripeptyd (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glicyna), jest najważniejszym związkiem antyoksydacyjnym spośród wymienionych. Występuje on w dużych ilościach w komórkach większości żywych organizmów (42). Jego aktywność wynika z obecności reszty cysteinowej, zawierającej grupę sulfhydrylową. Zawartość glutationu w komórkach drożdży *S. cerevisiae* może dochodzić do 1% ich suchej substancji. Związek ten ma silne właściwości przeciwutleniające i chroni grupy -SH przed utlenieniem. W formie zredukowanej jest wykorzystywany do redukcji nadtlenu, w tym nadtlenu wodoru.

6. Stres spowodowany deficytem pokarmowym

Stres spowodowany deficytem pokarmowym rzadko dotyczy braku źródła węgla, natomiast częściej braku źródła azotu, fosforu lub niektórych soli mineralnych. W procesach przemysłowej fermentacji etanolowej źródłem węgla są zwykle hydrolizaty skrobi lub celulozy oraz disacharydy, jak sacharoza lub laktoza. Wszystkie wymienione węglowodany, bądź pod wpływem enzymów endogennych, bądź pod wpływem enzymów tworzonych przez drożdże, są rozkładane do glukozy. Przy dużym stężeniu tego cukru i odcięciu dostępu tlenu w fermentującym zacierze przebiega wyłącznie proces fermentacji etanolowej, przy minimalnym oddychaniu. W praktyce biosynteza enzymów związanych z fermentacją innych cukrów niż glukoza oraz systemy transportu innych cukrów są w komórkach całkowicie zablokowane przez mechanizm represji katabolicznej. Odpowiedzialna za to zjawisko jest akumulacja w komórkach cAMP, w czym pośredniczą białka Gpr1 i Gpa2, związane z systemem receptorowym dla glukozy oraz cykloazy adenylozowej. Obok kontroli za pomocą cAMP w komórkach drożdżowych rosnących na pełnych pożywkach (glukoza plus pozostałe niezbędne składniki) występuje równoległy szlak kontrolowany przez kinazę białkową Sch9 (53). Jednakże pod koniec procesu fermentacji dochodzi zwykle do

wyczerpania glukozy. Wówczas następuje zasadnicza zmiana właściwości fizjologicznych komórki i kontrolę nad szlakiem przemian przejmuje kinaza białkowa A (PKA), odpowiedzialna za fosforylację białek (53). Wymagane jest jednak, aby pożywka w której rosną komórki zawierała komplet pozostałych niezbędnych dla komórki składników. Przy braku któregoś ze składników, a to się w gorzelnictwie często zdarza, komórki zatrzymują się w fazie G0 cyklu komórkowego, co oznacza zablokowanie ich rozmnażania. W praktyce gorzelniczej do deficytowych składników należy zwykle azot. Aby rozszerzyć jego pulę do zacieru dodaje się enzymy proteolityczne, które uwalniają z białek aminokwasy. Dużo jednak zależy od jakości surowca używanego w gorzelnicy i od właściwej kontroli składu pożywki.

Zaragoza i Gancedo stwierdzili, że przy braku azotu diploidalne drożdże *S. cerevisiae*, z deficytem fosfodiesterazy (*pde2*), wykazują wzrost w formie podobnej do grzybni (58). Tego typu wzrost jest stymulowany przez dodatek zewnętrznego cAMP. Podobne zachowanie komórek występuje w pożywce zawierającej wystarczającą ilość azotu, ale gdy źródłem węgla był etanol lub mleczan. Wzrost w formie pseudogrzybni nie wystąpił jednak w obecności glukozy w pożywce. Było to spowodowane represją kataboliczną syntezy enzymów potrzebnych do metabolizmu mleczanów i etanolu. Jednakże wprowadzenie łagodnego stresu cieplnego (37°C) lub osmotycznego powodowało wzrost pseudohyfalny, mimo obecności glukozy. Tworzenie pseudogrzybni i inwazyjny wzrost obserwowano również na pożywce zawierającej czynniki zakłócające strukturę błony lipidowej, jak metanol, n-propanol i izopropanol, ale tylko przy dodatku zewnętrznego cAMP. We wszystkich obserwacjach potwierdzono, że w warunkach stresowych odpowiedź komórki jest koordynowana przez kaskadę MAP-kinaz i cAMP.

7. Stres wywołany obecnością toksyn i inhibitorów

W ostatnich latach obserwuje się tendencję do wprowadzania nowych surowców do produkcji etanolu oraz nowych technologii opartych m.in. na recyrkulacji wywarów. Konsekwencją tych zmian jest pojawienie się nowych czynników stresowych związanych z kumulowaniem się w pożywce substancji toksycznych. W przypadku fermentacji surowców celulozowych w trakcie wstępnej obróbki substratów powstaje furfural, hydroksymetylofurfural, a w trakcie fermentacji tworzony jest kwas octowy i uwalniane są fenole (18). Koncentracja furfuralu może sięgać nawet kilku procent. Wymienione związki chemiczne są dla drożdży silnie toksyczne. Drożdże *S. cerevisiae* są zdolne do detoksyfikacji małych stężeń furfuralu i hydroksymetylofurfuralu w obecności tlenu, przemieniając te związki w alkohole (30), niemniej jednak w warunkach beztlenowych obecność tych toksyn hamuje szybkość fermentacji, niekiedy nawet o połowę. Garay-Arroyo i in. wykazali, że furfural w stężeniu 2 g/l działa hamująco na rozmnażanie komórek (16). Należy jednak podkreślić, że efekty działania tej toksyny zależą od stosowanego szczepu drożdży i zakres hamowania wzrostu może się wahać od 15 do 76%.

Drugą przyczyną gromadzenia się toksyn jest recyrkulacja frakcji ciekłej wywaru, co powoduje kumulację soli mineralnych i metali ciężkich w zacierze. Hamowanie wzrostu drożdży i fermentacji etanolowej może być także spowodowane przez kwasy organiczne produkowane przez bakterie mlekowe i octowe zakażające zacier.

W literaturze naukowej zwraca się także uwagę na negatywny wpływ niektórych metali na fermentację etanolową. Obecność jonów kadmu, żelaza i miedzi wzmacnia stres oksydacyjny poprzez uczestnictwo tych jonów w reakcjach Fentona, powodując zwiększoną produkcję rodników tlenowych (5,48). Zjawisko to jest szczególnie widoczne w hodowlach tlenowych drożdży, natomiast w warunkach beztlenowych jego rola jest mniejsza. W wyniku stresu tlenowego generowanego przez obecność jonów metali dochodzi do utleniania lipidów w błonach biologicznych, białek i aminokwasów oraz zrywanie wiązań peptydowych. W wyniku tych zmian dochodzi do tworzenia wiązań karbonylowych.

Silne działanie toksyczne na drożdże wykazuje kwas octowy i mlekowy. Narendranath i in. wykazali, że hamowanie wzrostu drożdży następuje już przy 0,5% kwasu octowego i 2,5% kwasu mlekowego (38). Inhibujące działanie obu kwasów ma charakter synergistyczny. Kwas octowy jest znany ze swej fungostatycznej i fungicydowej aktywności, co wykorzystywane jest przy konserwacji żywności. Szkodliwe działanie słabych kwasów wynika nie tylko ze wzrostu stężenia jonów wodorowych wokół komórki, ale także wskutek wnikania tych kwasów do wnętrza komórki i ich wewnątrzkomórkowej dysocjacji. Uwalniane na tej drodze jony wodorowe muszą być szybko usunięte z wnętrza komórki przez pompy protonowe, co wymaga dużych ilości energii. Komórki inkubowane w pożywce o niskim pH tracą swoją odporność na stres temperaturowy. W obecności glukozy niekorzystne działanie kwasów organicznych nasila się. Przy stężeniu kwasu octowego na poziomie 80 mM może nawet dojść do zaprogramowanej śmierci komórek (17,32). Widoczna jest w takiej sytuacji kondensacja chromatyny i ekspozycja fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni plazmalemmy. Przy wzroście drożdży przy niskim pH obserwowana jest wyraźna aktywacja katalazy cytozolowej i dysmutazy ponadtlenkowej.

Niewielkie stężenie kwasu octowego w zacierze może hamować produkcję etanolu, ale dzieje się tak nie u wszystkich szczepów. Zahamowanie fermentacji etanolowej przez kwas octowy można wiązać ze spadkiem ATP, zużywanego w celu utrzymania odpowiedniego poziomu pH wewnątrz komórek. Należy jednak podkreślić, że przemysłowe rasy drożdży gorzelniczych znacznie lepiej znoszą stres wywołany obecnością inhibitorów, niż rasy stosowane w warunkach laboratoryjnych (16).

W generowaniu stresu toksycznego mogą także brać udział związki stosowane do dezynfekcji. Badacze japońscy wykazali, że obecność tetrachloroizoftalonytrylu (TPN) kaptanu i tiuramu w stężeniach subletalnych wywołuje indukcję syntezy białka Hsp104 (15).

Jedną z silnych toksyn jest etanol, szczególnie w stężeniach powyżej 5%. Działa on odwadniająco na dwuwarstwą fosfolipidową błonę cytoplazmatyczną, białka

membranowe, białka cytoplazmatyczne i kwasy nukleinowe. Zakłóca to funkcję białek enzymatycznych i obniża żywotność komórek. Obok etanolu drugą toksyną komórkową, tworzoną na szlaku fermentacji etanolowej, jest acetaldehyd. Dzięki małej masie cząsteczkowej i dużej polarności oddziałuje on z wodą i redukuje a_w . Wewnątrzkomórkowe stężenie acetaldehydu nie przekracza 0,1% w/v, jednak należy zaznaczyć, że dyfunduje on przez błonę cytoplazmatyczną znacznie wolniej niż etanol.

8. Stres mechaniczny

Rozwój przemysłowej produkcji etanolu na cele paliwowe spowodował znaczne powiększenie skali jego produkcji. Wyrazem tego może być kilkukrotne zwiększenie objętości kadzi fermentacyjnych. Operowanie dużymi naczyniami produkcyjnymi spowodowało konieczność intensywnego mieszania zacierów oraz ich transport. W wyniku tych zmian pojawił się nowy czynnik stresogenny – stres mechaniczny wywołany siłami ścinającymi. Jest on generowany w czasie długotrwałego mieszania, pompowania oraz wirowania zacieru.

Przy szybkim mieszaniu pożywki występuje zmniejszenie poziomu ATP, spowolnienie pobierania tlenu i zwolnienie szybkości wzrostu (8). Według niektórych autorów silny stres mechaniczny może prowadzić do rozerwania ścian komórkowych, a w konsekwencji nawet do śmierci komórek (1).

Jedną z przyczyn stresu mechanicznego mogą być siły odśrodkowe występujące w czasie wirowania drożdży. Proces wirowania jest stosowany przy separacji frakcji komórkowej i jej zawracaniu w fermentacjach z recyrkulacją komórek. W badaniach Yoshida i in. wykazano jednak, że komórki drożdżowe są bardzo odporne na uszkodzenia nawet przy stosowaniu wirowania przy 450 000 x g (57).

W literaturze naukowej przedstawiono także szereg badań związanych z działaniem ciśnienia hydrostatycznego na komórki drożdżowe, jednakże zakres ciśnień stosowanych w tych badaniach, sięgający setek MPa, nie ma żadnego związku z ciśnieniami panującymi w aparaturze technologicznej związanej z produkcją etanolu. W praktyce największe ciśnienia generują pompy, jednak ciśnienie występujące w tych urządzeniach nie przekracza kilku MPa i działa przez bardzo krótki czas. Przy długotrwałym działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego lub barycznego może dojść do uszkodzenia błony cytoplazmatycznej. Ponadto może dojść do odwracalnych przejść fazowych i uszkodzeń białek (25). Zakres tych zmian zależy od wielkości ciśnienia i czasu jego działania. Przy stosowaniu ciśnień powyżej 200 MPa można obserwować w komórkach zmiany w ultrastrukturze komórek, które mijają po powrocie do normalnego ciśnienia atmosferycznego (26). Jedną z najbardziej widocznych zmian w warunkach wysokiego ciśnienia jest zmniejszenie rozmiarów komórek. Belo i in. którzy stosowali mniejsze ciśnienia, w granicach 0,1-1,5 MPa, również obserwowali zmniejszanie się rozmiarów komórek i ich przyspieszone starzenie (3).

9. Synergia czynników stresowych – stres wieloczynnikowy

Komórki drożdżowe wystawione na stres występujący w umiarkowanym nasileniu, nabywają odporności nie tylko na większą dawkę tego stresu, ale także uodparniają się na inne stresy. Wskazuje to na występowanie synergizmu między stresami generowanymi w czasie wzrostu drobnoustrojów. Taka krzyżowa odporność stanowi dowód na istnienie zintegrowanego mechanizmu odpowiedzi komórkowej na stresy środowiskowe. Jednym z takich przykładów jest synergizm między stresem termicznym i stresem etanolowym, w wyniku, którego komórki drożdży gorzej tolerują duże stężenie etanolu w podwyższonej temperaturze. Wynika to z wyższego powinowactwa etanolu do hydrofobowej warstwy tłuszczowej błony cytoplazmatycznej, co prowadzi do jej rozpuszczenia i dezintegracji komórek. Etanol powoduje też denaturację białek komórkowych, co zakłóca metabolizm komórkowy i przyspiesza śmierć komórek. Wykazano również, że w akumulacji trehalozy bierze interaktywny udział zarówno stężenie NaCl, jak i podwyższona temperatura. Wystąpienie jednocześnie obu czynników stresowych prowadzi do wytworzenia znacznie większej ilości trehalozy niż to ma miejsce w obecności pojedynczego czynnika (7). Podobne zjawisko wystąpiło w syntezie glicerolu, gdzie oba czynniki działały synergistycznie, choć nieco silniej w obecność chlorku sodowego.

Vianna i in. badając działanie szoku termicznego i etanolowego na poziom i aktywność trehalazy stwierdzili, że żaden z tych stresów nie wpływał w sposób jednoznaczny na ten enzym, gdy był stosowany w pojedynkę (54). Wprowadzając łącznie stres etanolowy obserwowano, że u części szczepów korelacja między akumulacją trehalozy a jej aktywnością jest negatywna, u części pozytywna, a u części nie ma jej w ogóle. Tymczasem przy połączeniu stresu cieplnego i etanolowego korelacja ta jest zdecydowanie pozytywna (54).

Lewis i in. badali wrażliwość drożdży na umiarkowany stres cieplny, ostry stres cieplny, stres etanolowy, oksydacyjny, odporność na wolne i szybkie zamrażanie, zasolenie i kwas octowy (27). Autorzy ci wykazali, że poszczególne szczepy znacznie się różnią między sobą w odporności na poszczególne stresy, a różnice między nimi mogą być nawet 1000-krotne. Wszystkie czternaście badanych przez nich szczepów odznaczało się dobrą odpornością na stres oksydacyjny (H_2O_2). Jednocześnie wykazali, że istnieje dodatnia korelacja między odpornością na stres oksydacyjny a innymi rodzajami stresów, z wyjątkiem stresu etanolowego. Było to podstawą do wyciągnięcia wniosku, że stres oksydacyjny występuje łącznie z innymi stresami. Odporność na stres oksydacyjny może być zatem dobrym miernikiem ogólnej odporności na stresy. Jednocześnie stwierdzili, że kumulacja trehalozy towarzyszy wszystkim stresom, z wyjątkiem stresu wywołanego przez kwas octowy. Współczynnik korelacji między zawartością trehalozy, a stresami jest jednak znacznie mniejszy, niż to ma miejsce przy odporności na nadtlenek wodoru.

Efekty synergii widoczne są także przy poddaniu komórek drożdży działaniu umiarkowanego ciśnienia, rzędu 50 MPa. Wstępnie „ściskanie” drożdży zwiększa

tolerancję komórek na szok cieplny, szok wysokiego ciśnienia i szok niskich temperatur. W tym sensie reakcja komórki na wysokie ciśnienie wpisuje się w ogólną odpowiedź drożdży na stresy środowiskowe.

10. Podsumowanie

Większość procesów technologicznych z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przebiega w warunkach, które generują różnorodne stresy środowiskowe wpływające negatywnie na wzrost i metabolizm komórek. W drodze ewolucji drożdże wytworzyły odpowiednie systemy obronne, minimalizujące działanie szkodliwych czynników zewnętrznych. Na podstawie analizy danych literaturowych wskazuje się, że odporność poszczególnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* jest bardzo zróżnicowana, a odpowiedź na czynnik stresowy może się różnić swoim natężeniem między poszczególnymi szczepami nawet 1000-krotnie. Podkreśla to znaczenie określenia właściwych kryteriów do wyboru odpornych szczepów, przydatnych w warunkach przemysłowych. Dotychczasowy stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczne wytypowanie jednego, czy kilku niezawodnych kryteriów pozwalających na wybór odpornych szczepów.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2010 jako projekt badawczo-rozwojowy.

Literatura

1. Adya A. K., Canetta E., Walker G. M., (2006), *FEMS Yeast Res.*, 6, 120-128.
2. Argüelles J. C., (1994), *FEBS Lett.*, 350, 266-270.
3. Belo I., Pinheiro R., Mota M., (2005), *J. Biotechnol.*, 115, 397-404.
4. Bishof J. C., Padanilam J., Holmes W. H., Ezzell R. M., Lee R. C., Tompkins R. G., Yarmush M. L., Toner M., (1995), *Biophys. J.*, 68, 2608-2614.
5. Brennan R. J., Schiestl R. H., (1996), *Mutat. Res.*, 356, 171-178.
6. Carratu L., Franceschelli S. L., Pardini C. L., Kobayashi G. S., Horvath I., Vigh L., Maresca B., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 3870-3875.
7. Carvalheiro F., Roseiro J. C., Girio F. M., (1999), *Food Microbiol.*, 16, 543-550.
8. Converti A., del Borghi M., Ferrailo G., Sommariva C., (1996), *Chem. Eng. J.*, 62, 155-167.
9. Costa V., Reis E., Quinatanilha A., Moradas-Ferreira P., (1993), *Arch. Biochem. Biophys.*, 300, 608-614.
10. D'Amore T., Panchal C. J., Stewart G. G., (1987), *J. Inst. Brew.*, 93, 472-476.
11. Martinez de Marañon I. M., Marechal P.-A., Gervais P., (1996), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227, 519-523.
12. Devantier R., Pedersen S., Olsson L., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 622-629.
13. de Virgilio C., Piper P., Boller T., Wiemken A., (1991), *FEBS Lett.*, 288, 86-90.
14. Domitrovic T., Fernandes C. M., Boy-Marcotte E., Kurtenbach E., (2006), *FEBS Lett.*, 580, 6033-6038.
15. Fujita K., Iwahashi H., Kawai R., Komatsu Y., (1998), *Water Sci. Tech.*, 38, 237-243.
16. Garay-Arroyo A., Covarrubias A. A., Clark I., Niño I., Gosset G., Martinez A., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 734-741.
17. Giannattasio S., Guaragnella N., Corte-Real M., Passarella S., Marra E., (2005), *Gene* 354, 93-98.

18. Gorisch S. W., Dien B. S., Nichols N. N., Slininger P. J., Liu Z. L., Skory C. D., (2006), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 339-349.
19. Hallsworth J. E., (1998), *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 125-137.
20. Hounsa C. G., (1998), *Microbiol.*, 144, 671-680.
21. Inaba M., Suzuki I., Szalonati B., Kanesaki Y., Los D. A., Hayashi H., Murata N., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 12191-12198.
22. Jakubowski W., Biliński T., Bartosz G., (2000), *Free Rad. Biol. Med.*, 28, 659-664.
23. Karreman R. J., Brandt W. F., Lindsey G. G., (2005), *Carbohydrate Polymers*, 60, 193-198.
24. Karreman R. J., Dague E., Gaboriaud F., Quiles F., Duval J. F. L., Lindsey G. G., (2007), *Biochim. Biophys. Acta*, 1774, 131-137.
25. Kato M., Hayashi R., Tsuda T., Taniguchi K., (2002), *Eur. J. Biochem.*, 269, 110-118.
26. Kobori H., Sato M., Tameike A., Hamada K., Shimada S., Osumi M., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 132, 253-258.
27. Lewis J. G., Learmonth R. P., Attfield P. V., Watson K., (1997), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 30-36.
28. Lewis J. G., Learmonth R. P., Watson K., (1995), *Microbiology*, 141, 687-694.
29. Lindquist S. L., Kim G., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 5301-5306.
30. Liu Z. L., (2006), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 27-36.
31. Los D. A., Murata N., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1666, 142-157.
32. Ludovico P., Sousa M. J., Silva M. T., Leao C., Corte-Real M., (2001), *Microbiology*, 147, 2409-2415.
33. Mager W. H., Morodas-Ferreira P., (1993). *Biochem. J.*, 290, 1-13.
34. Mansure J. J., Souza R. C., Panek A. D., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 1201-1203.
35. Mensonides F. I. C., Schuurmans J. M., Teixeira de Mattos M. J., Hellingwerf K. J., Brul S., (2002), *Mol. Biol. Rep.*, 29, 103-106.
36. Mishra P., (1993), *Tolerance of fungi to ethanol*, in: *Stress tolerance of fungi*, Ed. Jennings D. H., 189-208, Marcel Dekker, New York, NY.
37. Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W., (1996), *Mol. Microbiol.*, 19, 651-658.
38. Narendranath N. V., Thomas K. C., Ingledew W. M., (2001), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 171-177.
39. Nguyễn-nhu N. T., Knoop B., (2002), *Toxicol. Lett.*, 135, 219-228.
40. Ohmori S., Nawata Y., Kiyono K., Murata H., Tsuboi S., Ikeda M., Akagi R., Morohashi K-I., Ono B-I., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1472, 587-594.
41. Ölz R., Larsson K., Adler L., Gustafsson L., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 2205-2213.
42. Penninckx M., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 737-742.
43. Piper P. W., Talreja K., Panaretou B., Moradas-Ferreira P., Byme K., Praekelt U. M., Meacock P., Regnaq M., Boucherie H., (1994), *Microbiology*, 140, 3031-3038.
44. Prestrelski S. J., Tedschi N., Arakowa T., Carpenter J. F., (1993), *Biophys. J.*, 65, 661-671.
45. Reddy L. V. A., Reddy O. V. S., (2006), *Process Biochem.*, 41, 726-729.
46. Rosa M. F., Sa-Correia I., (1996), *FEMS Microbiol. Lett.*, 135, 271-274.
47. Sanchez Y., Lindquist S. L., (1990), *Science*, 248, 1112-1115.
48. Shanmuganathan A., Avery S. V., Willetts S. A., Houghton J. E., (2004), *FEBS Lett.*, 556, 253-259.
49. Simonin H., Beney L., Gervais P., (2007), *J. Membrane Biol.*, 216, 37-47.
50. Stambuk B. U., Panek A. D., Crowe J. H., Crowe L. M., de Araujo P. S., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1379, 118-128.
51. Steels E. L., Learmonth R. P., Watson K., (1994), *Microbiology*, 140, 569-576.
52. Swan T. M., Watson K., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 169, 191-197.
53. Thevelein J. M., Cauwenberg L., Colombo S., de Winde J. H., Donatien M., Dumortier F., Kraakman L., Lemaire K., Ma P., Nauwelaers D., Rolland F., Teunissen A., van Dijck P., Versele M., Wera S., Winderickx J., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 819-825.
54. Vianna C. R., Silva C. L. C., Neves M. J., Rosa C. A., (2008), *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, 205-217.
55. Videlov J., Arneborg N., (2002), *Yeast*, 19, 429-439.
56. Wang J., Liu W., Uno T., Tonozuka H., Mitsui K., Tsurugi K., (2000), *FEMS Microbiol. Lett.*, 189, 9-13.
57. Yoshida N., Minamimura T., Yoshida T., Ogawa K., (1999), *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 342-344.
58. Zaragoza O., Gancedo J. M., (2000), *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 187-194.