

MARTA PASŁAWSKA

STAN FIZJOLOGICZNY UNIERUCHOMIONYCH KOMÓREK DROŹDŹY W CZASIE FERMENTACJI ETANOLOWEJ

Streszczenie

W pracy określano wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia oraz stężenia inokulum na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V30 w czasie okresowej fermentacji etanolowej. Stwierdzono, że stan fizjologiczny komórek zależy od wszystkich trzech badanych parametrów.

Wstęp

Popularną wśród badaczy techniką unieruchamiania drobnoustrojów jest zamknięcie komórek w matrycy polimeru, a najczęściej stosowanym polimerem jest kwas alginianowy [4, 5]. Porowata struktura żelu alginianowego umożliwia migrację substratów i produktów między biokatalizatorem a środowiskiem reakcyjnym [1, 2]. Ten sposób unieruchamiania w pewnym stopniu chroni komórki przed toksycznym wpływem środowiska [3].

W literaturze brak jest pełnych danych na temat wpływu stężenia alginianu bądź początkowej dawki inokulum na stan fizjologiczny unieruchomionych komórek drożdży. Wynika to najprawdopodobniej z bardzo dużej liczby czynników, które wpływają na żywotność komórek, co zmusza do rozpatrywania tego zagadnienia indywidualnie, tj. w odniesieniu do określonego procesu i warunków jego przebiegu.

Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu rodzaju alginianu, zróżnicowanego stężenia alginianu oraz stężenia inokulum na stan fizjologiczny komórek drożdży w czasie okresowej fermentacji etanolowej.

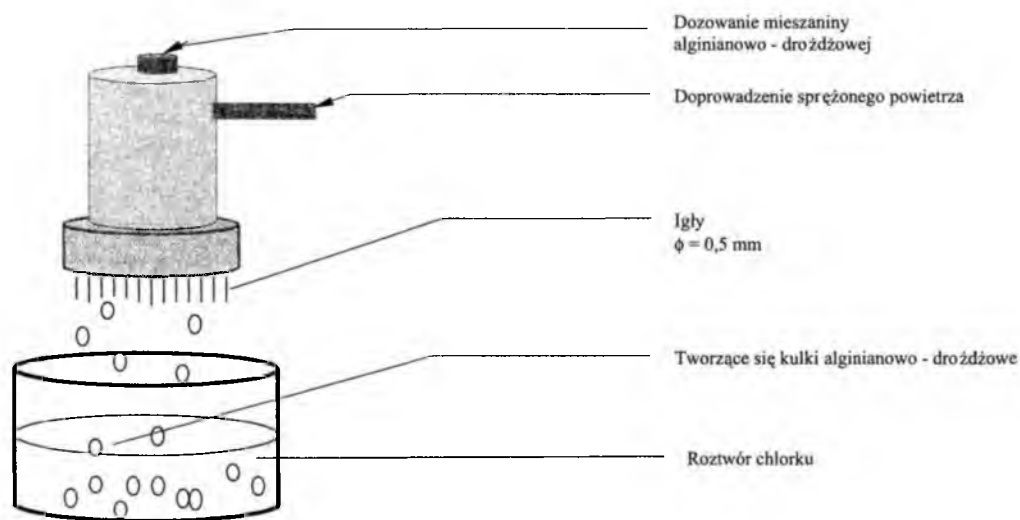
Materiał i metody badań

Surowce i materiały

Materiał biologiczny stanowiły drożdże gorzelnicze *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30 z kolekcji Katedry Technologii Rolnej i Przechowalnictwa AR we Wrocławiu. Do przygotowania zawiesiny drożdży wybrano alginian sodowy firmy Fluka Chemie. Drożdże uaktywniano poprzez prowadzenie hodowli statycznej, a następnie namnażano w hodowli wstrząsanej, stosując podłoże YM (48h, 30°C).

Unieruchamianie komórek drożdży w żelu alginianowym

Drożdże immobilizowano w alginianach: wapnia i glinu, stosując 2%, 3%, 3,75% i 4,5% roztwory alginianów przy inokulum 1, 5, 10 i 15 g_{D100}/dm³ dla każdego stężenia alginianu. Mieszaninę alginianowo-drożdżową wkraplano przy użyciu strzykawki wieloigłowej do 0,2 M roztworu chlorku wapnia oraz 0,2 M chlorku glinu w temperaturze pokojowej, przy mieszaniu chlorku mieszadłem magnetycznym. Tworzące się kulki miały średnicę ok. 2 mm (Rys. 1).



Rys. 1. Unieruchamianie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V30 w żelu alginianowym.

Fig. 1. Immobilization of yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* V30 on alginate gel.

W celu dokładnego i powtarzalnego dozowania ściśle określonej ilości drożdży każdorazowo prowadzono standaryzację inokulum, korzystając z krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność ekstynkcji od zawartości suchej masy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30 wyrażonej w [g/dm³].

Sposób prowadzenia fermentacji

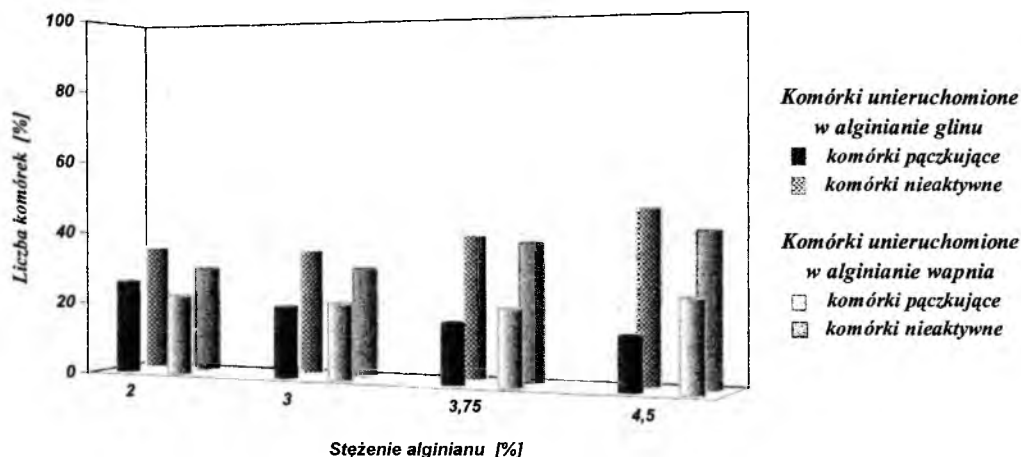
Fermentację prowadzono w temperaturze 30°C do momentu zakończenia procesu, przyjmując jako wyznacznik ilość wydzielającego się dwutlenku węgla, kontrolowaną poprzez ważenie próby tak długo, aż dwa kolejne pomiary nie różniły się więcej niż o 0,1 g. Stosowano podłoże pół-syntetyczne o wyjściowym stężeniu glukozy 10 % z dodatkiem soli: $MgSO_4$ - 0,5 g/dm³, KH_2PO_4 - 1,6g/dm³, $(NH_4)_2SO_4$ - 5g/dm³ oraz ekstraktu drożdżowego - 5 g/dm³.

Oznaczenia i obliczenia

Po zakończonej fermentacji oznaczano i porównano metodą mikroskopową stan fizjologiczny komórek, określany jako procentowy udział komórek pączkujących i nieaktywnych (komórki nieaktywne barwią się błękitem metylenowym (1:10000) na niebiesko) w ogólnej liczbie komórek.

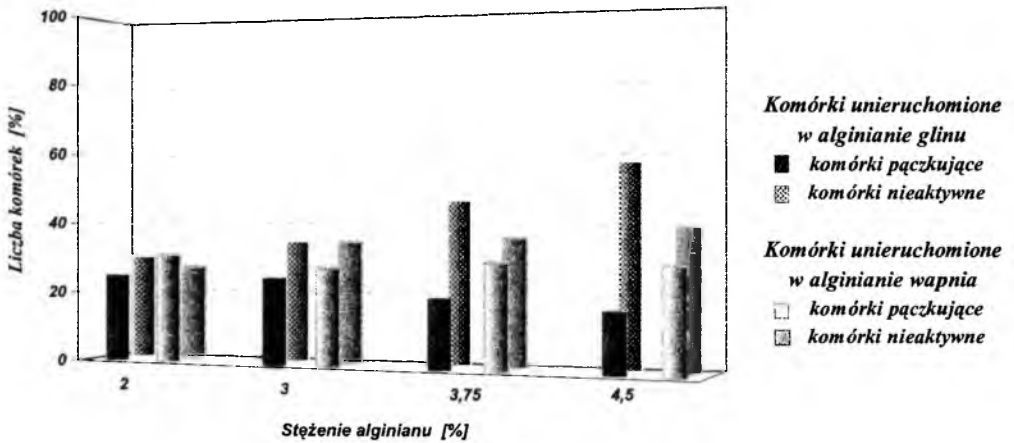
Omówienie wyników

Stan fizjologiczny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V30 oznaczony po rozpuszczeniu kulek alginianowo-drożdżowych w cytrynianie sodu przedstawiono na rysunkach 2, 3, 4 i 5.



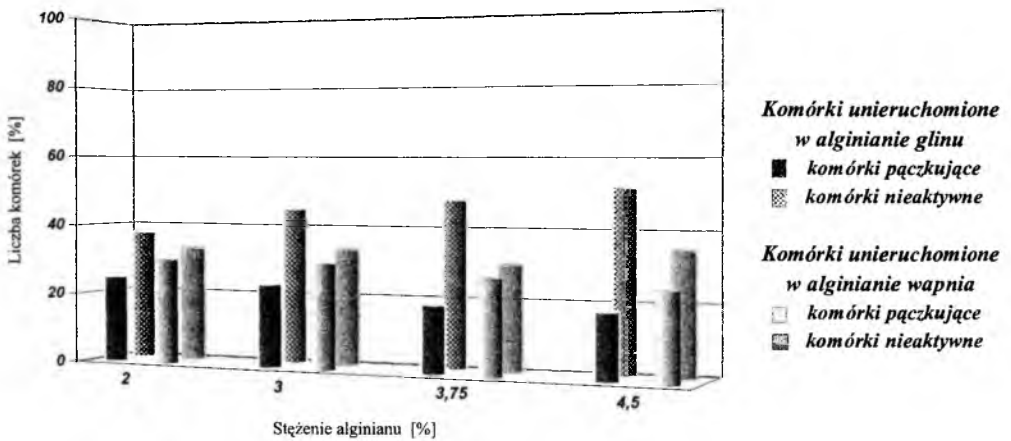
Rys. 2. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum 1 g_{D100}/dm³.

Fig. 2. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose 1 g_{D100}/dm³.



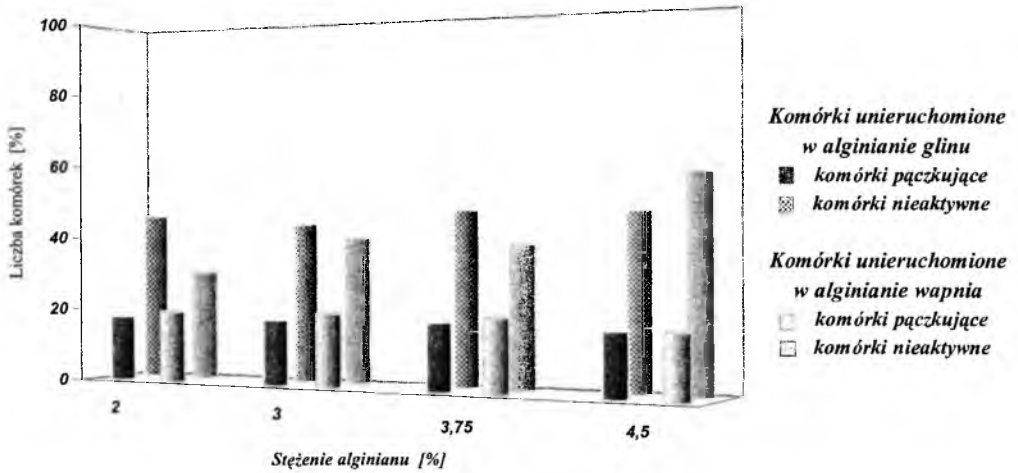
Rys. 3. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum 5 g_{D100}/dm³.

Fig. 3. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose 5 g_{D100}/dm³.



Rys. 4. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum 10 g_{D100}/dm³.

Fig. 4. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose 10 g_{D100}/dm³.



Rys. 5. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum 15 g_{D100}/dm³.

Fig. 5. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose 15 g_{D100}/dm³.

Zaobserwowano, że w miarę zwiększania stężenia alginianu glinu stan fizjologiczny komórek się pogarszał. Liczba komórek pączkujących obniżała się od wartości 26% (liczonej jako % całkowitej liczby komórek) przy zastosowaniu do unieruchamiania 2% roztworu alginianu glinu i dawce inokulum 1 g_{D100}/dm³, do wartości 15% dla 4,5% alginianu glinu, przy inokulum 1 g_{D100}/dm³. Ilość komórek nieaktywnych była wyższa przy wyższych z zastosowanych stężeń alginianu glinu (58% komórek nieaktywnych dla 4,5% alginianu glinu i 5 g_{D100}/dm³) niż przy stężeniach niższych (30% komórek nieaktywnych dla 2% alginianu glinu i 5 g_{D100}/dm³).

W przypadku wszystkich stosowanych stężeń alginianu wapnia liczba komórek pączkujących była dość wysoka i wynosiła od 17,5% dla 4,5% alginianu wapnia i 15 g_{D100}/dm³ do 31% komórek pączkujących dla 2% alginianu wapnia i 2 g_{D100}/dm³. Liczba komórek nieaktywnych zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia alginianu wapnia (od 29% przy zastosowaniu 2% żelu i 1 g_{D100}/dm³ do 58% dla stężenia alginianu 4,5% i dawki inokulum 15 g_{D100}/dm³).

Przy zastosowaniu dawek inokulum 1 g_{D100}/dm³ i 5 g_{D100}/dm³ proces fermentacji zachodził wolniej, ale stan fizjologiczny komórek po fermentacji był lepszy niż przy wyższych początkowych stężeniach biomasy. W przypadku stężenia drożdży 5 g_{D100}/dm³ i 2% alginianu wapnia liczba komórek pączkujących wynosiła 31% a nieaktywnych 27%, przy stężeniu 10 g_{D100}/dm³ i roztworze alginianu wapnia 3% liczba komórek pączkujących wynosiła 30% a nieaktywnych 33,5%, natomiast w próbach, w których początkowa zawartość biomasy wynosiła 15 g_{D100}/dm³ przy 4,5% alginianie

wapnia, stwierdzono obecność 17,5% komórek pączkujących a nieaktywnych 58% w stosunku do całkowitej ilości komórek.

Wnioski

1. Stężenie użytych do unieruchamiania alginianów : wapnia i glinu oraz dawka inokulum wpływały na stan fizjologiczny drożdży.
2. W miarę zwiększania stężenia alginianu glinu od 2% do 4,5% stan fizjologiczny biomasy pogarszał się.
3. Zwiększanie stężenia alginianu wapnia od 2% do 4,5% nie powodowało proporcjonalnego obniżania się liczby komórek pączkujących.
4. Przy niższych z zastosowanych początkowych stężeń unieruchamianych drożdży stan fizjologiczny komórek po fermentacji był lepszy niż przy stężeniach wyższych.

LITERATURA

- [1] Bednarski W.: Zastosowanie unieruchomionych komórek drożdży w procesach fermentacyjnych, *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, **11-12**, 1987, 4-6.
- [2] Bryjak J., Noworyta A.: Charakterystyka aktywności katalitycznej acylazy penicylinowej w formie wolnej i stabilizowanej, *Mat. V Ogólnokrajowej Sesji Nauk. Postępy Inżynierii Bioreaktorowej*, Łódź 1993, 57-74.
- [3] Gilson C., Thomas A., Hawkes F.: Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilized yeasts, *Proc. Biochem. Internat.*, **6**, 1990, 104-108.
- [4] Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.: Alginate as immobilization matrix for cells, *TibTech*, **8**, 1990, 71-78.
- [5] Sroka W., Rzędowski W.: Metody unieruchamiania drobnoustrojów wykorzystywane w procesach fermentacji etanolowej, *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, **11**, 1991, 5-7.

THE PHYSIOLOGICAL STATE OF IMMOBILIZED YEAST CELLS IN ETHANOL FERMENTATION

S u m m a r y

The influence of different alginate concentration and initial yeast concentration on the physiological state of cells in ethanol fermentation were investigated. Concentration of Al-alginate, Ca-alginate and initial cell population had influence on viability of cells. ☒