

KEFIR JAKO ŹRÓDŁO DROŻDŻY TOLERUJĄCYCH DUŻE STĘŻENIA ETANOLU

Iwona Gientka, Ewa Klusek

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Tolerancja na duże stężenia etanolu jest ważną cechą drożdży stosowanych w przemyśle fermentacyjnym. Celem przeprowadzonych badań było określenie tolerancji szczepów drożdży kefirowych na alkohol etylowy oraz ich zdolności do fermentacji różnych źródeł węgla. Największą tolerancję wykazały komórki szczepu *Kluyveromyces lactis* i były zdolne do wytworzenia kolonii w podłożu zawierającym 20% etanolu. Cecha ta oraz zdolność do fermentacji laktozy, potwierdzają duży potencjał szczepu *Kluyveromyces lactis* w produkcji alkoholu etylowego. Mimo iż kefir jest produktem charakteryzującym się małą zawartością etanolu, jest źródłem szczepów drożdży tolerujących wysokie stężenia alkoholu etylowego.

Słowa kluczowe: drożdże kefirowe, etanol

WSTĘP

Jedną z najważniejszych cech drożdży gorzelnicznych, obok prowadzenia wydajnej fermentacji, jest tolerancja na wysokie stężenie (ponad 12% v/v) alkoholu etylowego.

Alkohol etylowy w wysokich stężeniach wykazuje toksyczne działanie na komórki drożdży, co przejawia się m.in. uszkodzeniem błony cytoplazmatycznej (działa jak rozpuszczalnik organiczny w stosunku do fosfolipidów), a także błon różnych organelli komórkowych, denaturacją białek, obniżeniem wydajności systemów transportu, zmianą wrażliwości drożdży na poszczególne temperatury [Hack i in. 1998, Stanley i in. 2011]. Zmniejsza to właściwą szybkość fermentacji i powoduje utratę żywotności komórek. Coraz rzadsze wykorzystywanie w procesach fermentacyjnych niektórych gatunków drożdży spowodowane jest ich niezdolnością do przetrwania w środowiskach o wysokim stężeniu etanolu [Pina i in. 2004].

Istotnym utrudnieniem podczas przekształcania cukrów w etanol przez *Saccharomyces cerevisiae* jest ograniczona liczba wykorzystywanych przez nie węglowodanów (substratów). Dlatego też poszukuje się takich szczepów drożdży, które zdolne są do fermentowania różnych źródeł węgla. W takim przypadku oprócz tradycyjnych surowców gorzelnicznych (kukurydza, ziemniaki, pszenica, jęczmień) można zagospodarować produkty odpadowe przemysłu spożywczego, np. rozcieńczony sok z buraka cukrowego, odpady przemysłu skrobiowego czy mleczarskiego. Do tych ostatnich należy serwatka [Koushki i in. 2012]. Roczna światowa produkcja serwatki jest szacowana na ponad 10^8 ton, co stanowi istotne źródło zanieczyszczenia środowiska. Możliwość zastosowania wymienionych surowców odpadowych do produkcji etanolu daje przynajmniej dwie korzyści: zapewnia tanie surowce i jednocześnie je utylizuje [Ozmiłci i Kargi 2008].

W aspekcie wykorzystania odpadów przemysłu mleczarskiego alternatywą klasycznych gatunków mogą być szczepy charakteryzujące się zdolnością metabolizowania laktozy. Produkty mleczne mogą być źródłem laktozododatnich drożdży.

Fermentowanym napojem mlecznym zawierającym drożdże jest kefir. Charakterystycznymi cechami kefiru są kwaśny smak, lekkie gazowanie oraz niewielka ilość alkoholu etylowego. W produkcji ilość alkoholu może wynosić od 0,01 do 2,5% [Simova i in. 2000, Zajsek i Gorsek 2010].

Celem badań było określenie tolerancji na etanol drożdży pochodzących z kefirów oraz ocena ich zdolności do fermentacji różnych źródeł węgla.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny stanowiły szczepy drożdży pierwotnie wyizolowane z kefirów: *Candida famata*, *Candida guilliermondii* 1, *Candida guilliermondii* 2, *Candida kefyr*, *Candida inconspicua*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* i zdeponowane w Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW.

Zdolność drożdży do fermentacji badano w podłożu zawierającym wodę peptonową, gdzie wybrane źródło węgla stanowiła glukoza, galaktoza, laktoza, maltoza, sacharoza oraz rafinoza w stężeniu 2%. Inkubację prowadzono w 28°C i w 24., 48. i 72. h inkubacji kontrolowano obecność gazu w rurce Durhama.

Do badania tolerancji na etanol wykorzystano podłoże YPD, zawierające 1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy. Początkową wartość pH ustalano na 5,6. Po sterylizacji oraz ochłodzeniu pożywek do 45°C dodawano odpowiednią objętość alkoholu etylowego 96% (cz.d.a. POCH S.A., Polska), tak aby końcowe stężenie w podłożu wynosiło: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 i 14% v/v. Hodowlę szczepów przeprowadzano w zautomatyzowanym analizatorze wzrostu mikroorganizmów Bioscreen C (Yo AB Ltd., Finlandia) przez 72 h w temperaturze 28°C. Przygotowane podłoże наносzono do mikrostudzienek w ilości 350 μ l i szczepiono inokulum w ilości 5% v/v. Inokulum przygotowywano poprzez zawieszenie pojedynczej kolonii drożdży – otrzymanej po 48 h inkubacji na zastalonym agarem (2%) podłożu YPD (BTL, Polska) w temperaturze 28°C – w jałowym roztworze soli fizjologicznej oraz odpowiednie rozcieńczenie do ustalenia gęstości zawiesiny drobnoustrojów do wartości 0,1° McFarlanda (Densimat). Wzrost szczepów mierzono z wykorzystaniem metody turbidymetrycznej z zastosowaniem filtru

szerokopasmowego (420–580 nm). Absorbancję mierzono co 15 minut przez 72 h hodowli, przy stałym automatycznym wytrząsaniu próbek. Każde doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Badania tolerancji na etanol przeprowadzono także w podłożu YPDA zestalonym 2% agaru. Końcowe stężenie etanolu w podłożu wynosiło: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22%. Materiał biologiczny posiewano powierzchniowo za pomocą sterylnej ezy na ww. podłożu zawierające określone stężenia alkoholu etylowego. Inkubację prowadzono w 28°C oraz dokonywano obserwacji wzrostu kolonii po 24, 48, 72, 96 i 240 h.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zdolność do fermentacji różnych źródeł węgla

Szczepy drożdży należące do rodzajów *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* zdolne były do fermentacji glukozy, przy czym szybkość fermentacji zależała od szczepu (tab. 1). Większość szczepów, poza *C. inconspicua*, fermentowała sacharozę. Oba szczepy *C. guilliermondii* oraz *K. lactis* odfermentowały podłoże zawierające maltozę. Krótkim czasem fermentacji laktozy wyróżniły się drożdże *Candida kefyri* oraz *Kluyveromyces lactis*. Drożdże *C. famata*, *C. guilliermondii* oraz *S. cerevisiae* metabolizowały z wytworzeniem gazu rafinozę. Najmniejszym spektrum zdolności fermentacyjnych charakteryzował się szczep *C. inconspicua*.

Tabela 1. Czas odfermentowania cukrów przez badane szczepy [h]

Table 1. Time of fermentation of sugars by tested strains [h]

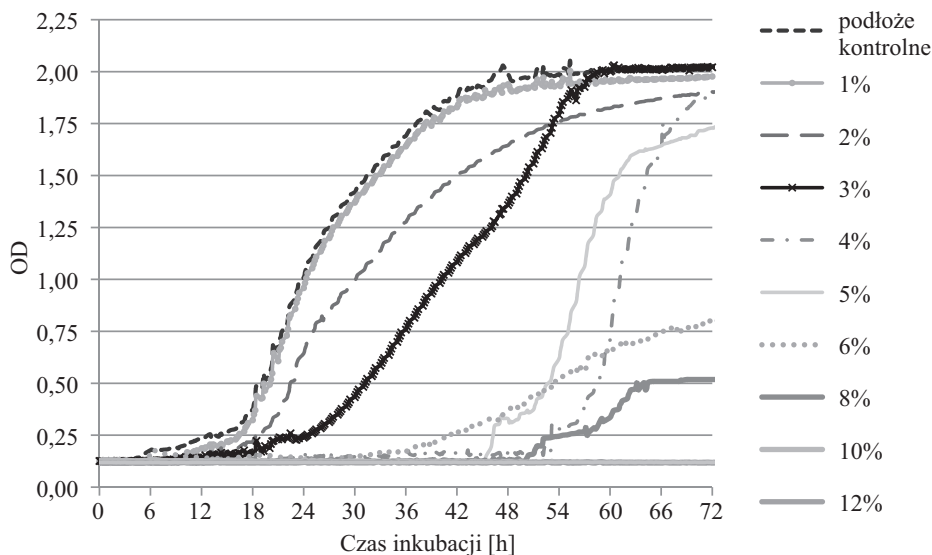
Szczep – Strain	Glukoza Glucose	Galaktoza Galctose	Sacharoza Saccharose	Laktoza Lactose	Maltoza Maltose	Rafinoza Raffinose
<i>Candida famata</i>	48	–	48	–	–	48
<i>Candida kefyri</i>	48	72	72	24	–	–
<i>Candida inconspicua</i>	24	–	–	–	–	–
<i>Candida guilliermondii</i> 1	48	72	24	–	24	48
<i>Candida guilliermondii</i> 2	48	72	24	–	48	48
<i>Kluyveromyces lactis</i>	24	24	96	24	48	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24	24	48	–	–	96

Według doniesień, drożdże z rodzaju *Kluyveromyces* są najczęściej stosowanymi szczepami wykorzystywanymi do produkcji etanolu na drodze fermentacji laktozy [Ozmihci i Kargi 2008]. Do tej pory opisano realizację procesu m.in. w warunkach fermentacji typu fed-batch [Lukondeh i in. 2005], użycia szczepów termotolerancyjnych, niewrażliwych na temperaturę 45°C [Banat i in. 2002] oraz immobilizowanych komórek na nośnikach celulozowych [Kourkoutas i in. 2006]. *Kluyveromyces lactis* jest organizmem modelowym do badań unikalnych cech Crabtree-ujemnych gatunków drożdży, w których regulacja metabolizmu węgla i energii kontrastuje z klasycznym modelem znanym u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [Pina i in. 2004]. *Kluyveromyces marxianus* (forma anamorficzna to *Candida kefyri*) wydajnie fermentują serwatkę, jak i nastawy

na bazie serwatki w proszku ze zwiększoną zawartością laktozy – co jest obiecującym rozwiązaniem ze względów technologicznych i ekonomicznych, m.in. dzięki zmniejszeniu kosztów związanych z destylacją [Ozmiłci i Kargi 2008]. Podobny proces może być prowadzony przez drożdże z gatunku *Kluyveromyces fragilis* [Dragone i in.2011].

Tolerancja na etanol

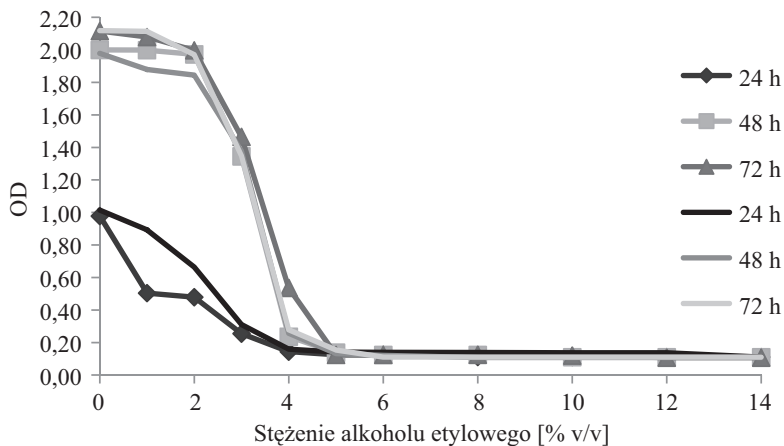
Podczas hodowli prowadzonych w warunkach aparatu Bioscreen przebieg krzywych wzrostu (zależność wartości gęstości optycznej od czasu) zmieniał się. Zobrazowano te zmiany na przykładzie hodowli szczepu *Candida famata* (rys. 1). Wraz ze wzrostem stężenia etanolu w podłożu obserwowano wydłużanie fazy adaptacyjnej, wydłużenie fazy wzrostu logarytmicznego i zmniejszenie szybkości podziałów. Stwierdzano także istotne zmniejszenie się maksymalnej gęstości optycznej hodowli. Przebieg tych zmian zależał od szczepu oraz od stężenia etanolu w podłożu.



Rys. 1. Zmiany gęstości optycznej hodowli *Candida famata* podczas inkubacji w podłożach zawierających różne ilości alkoholu etylowego

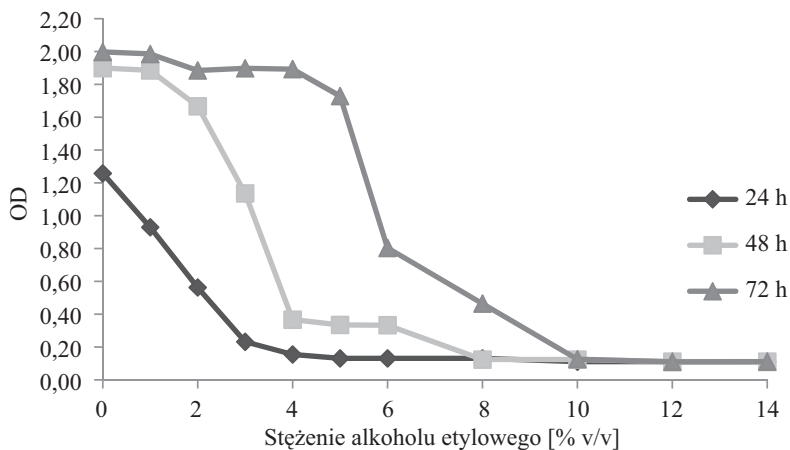
Fig. 1. Changes in optical density of the culture of *Candida famata* during incubation in media containing various amounts of ethanol

Dwa szczepy *Candida guilliermondii* wykazały podobną charakterystykę tolerancji na etanol (rys. 2). Stężenie etanolu, które zahamowało wzrost tych szczepów w czasie 72 h wynosiło 5%. W przypadku drożdży *Candida famata* (rys. 3) ustalono, iż zawartość 4% etanolu w podłożu hodowlanym hamowała wzrost szczepu do 24 h. Stężenie 8% etanolu nie pozwoliło na wzrost szczepu do 48 h. Jednak w następnej dobie obserwowano przyrost komórek (ΔOD) i dopiero 10-procentowe stężenie etanolu toksycznie wpłynęło na komórki. Należy przypuszczać, iż możliwa jest adaptacja szczepu do większych



Rys. 2. Wpływ stężenia alkoholu etylowego w podłożu na gęstość optyczną hodowli *Candida guilliermondii* 1 (krzywe ze znacznikiem) oraz *Candida guilliermondii* 2 (krzywe bez znacznika)

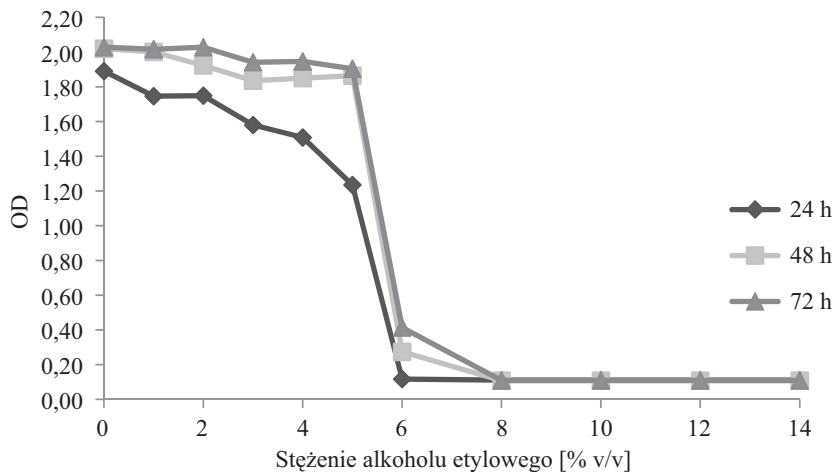
Fig. 2. Effect of ethanol concentration in the medium on the optical density of the culture *Candida guilliermondii* 1 (curves with the tag) and *Candida guilliermondii* 2 (curves without tag)



Rys. 3. Wpływ stężenia alkoholu etylowego w podłożu na gęstość optyczną hodowli *Candida famata*

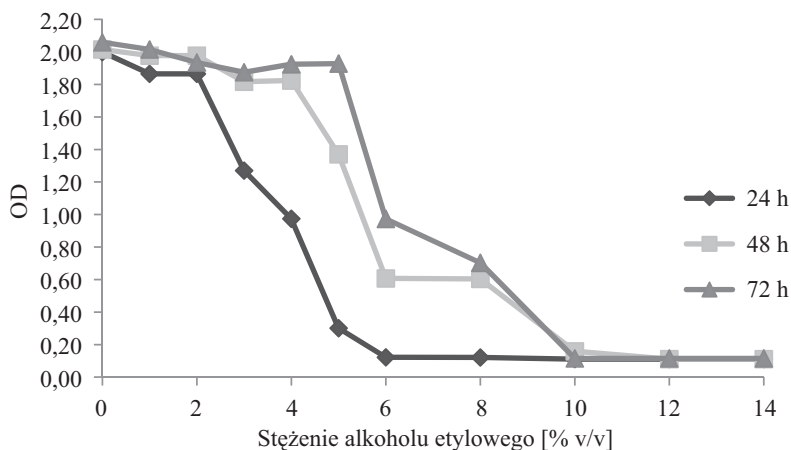
Fig. 3. Effect of ethanol concentration in the medium on the optical density of the growth of *Candida famata*

dawk etanolu, jednak będzie ona długotrwała i przekroczy czas 72 h. Szczep *Candida inconspicua* zareagował wzrostem w podłożu zawierającym alkohol etylowy w stężeniu 5% etanolu (rys. 4). Następna badana dawka tej substancji wpłynęła niekorzystnie na drożdże, a gęstość optyczna zmniejszyła się z ok. 1,8 do 0,27 w 48 h. Wzrost *K. lactis* wyrażony zmianami OD także zależał od zawartości etanolu w podłożu i był zmienny w czasie (rys. 5). Stężenie alkoholu etylowego w podłożu, które całkowicie zahamowało



Rys. 4. Wpływ stężenia alkoholu etylowego w podłożu na gęstość optyczną hodowli *Candida inconspicua*

Fig. 4. Effect of ethyl alcohol concentration in the substrate on the optical density of the growth of *Candida inconspicua*

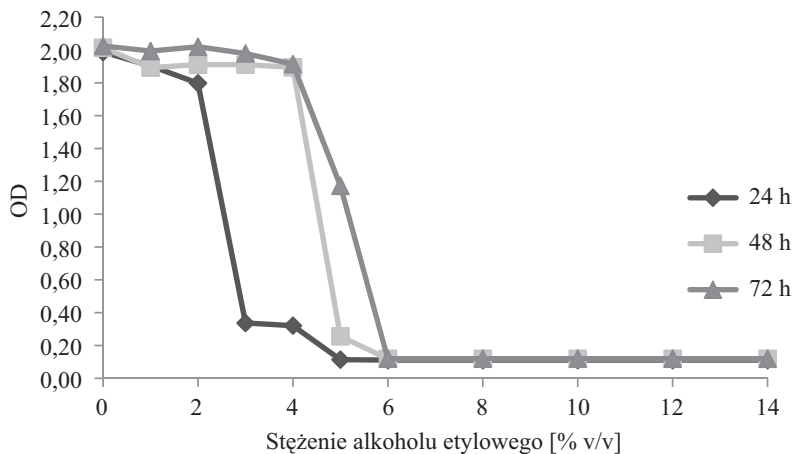


Rys. 5. Wpływ stężenia alkoholu etylowego w podłożu na gęstość optyczną hodowli *Kluyveromyces lactis*

Fig. 5. Effect of ethanol concentration in the medium on the optical density of the culture *Kluyveromyces lactis*

wzrost *K. lactis* do 24 h, wynosiło 6%, podczas gdy w dalszych dwóch dobach 10%. Dawką hamującą wzrost i dzielenie komórek *S. cerevisiae* do 3. doby hodowli było 6% etanolu (rys. 6).

Wydłużona do kilkudziesięciu godzin faza adaptacji podczas inkubacji drożdży w podłożach zawierających największe badane dawki etanolu wymagała przedłużenia



Rys. 6. Wpływ stężenia alkoholu etylowego w podłożu na gęstość optyczną hodowli *Saccharomyces cerevisiae*

Fig. 6. Effect of ethanol concentration in the medium on the optical density of the culture *Saccharomyces cerevisiae*

czasu hodowli. W tym celu zastosowano hodowlę powierzchniową na zestalonych agarem podłożach. Zaobserwowano zdolność do wytworzenia kolonii w podłożu zawierającym powyżej 12% v/v (tab. 2). Do szczepów, które wytworzyły kolonie już w 3. dobie należały *Candida inconspicua*, *Saccharomyces cerevisiae* (16% etanolu) oraz *Kluyveromyces lactis* (18% etanolu). Szczep *Candida famata* wykazał wzrost w stałym podłożu zawierającym 16% v/v etanolu, jednak kolonie pojawiły się dopiero po 4. dobie inkubacji.

W podłożu zawierającym 20% etanolu stwierdzono obecność kolonii szczepu *Kluyveromyces lactis*.

Tolerancja na duże stężenia etanolu zależy m.in. od zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, a w szczególności kwasu oleinowego ($\Delta^9Z-C_{18:1}$) w komórce [You i in. 2003]. *K. lactis* charakteryzuje się zdolnością do wytworzenia kolonii w podłożu

Tabela 2. Maksymalne stężenia etanolu w podłożu YPDA, przy których widoczne były kolonie po 3. i 10. dobie inkubacji [%]

Table 2. Maximum concentration of ethanol in YPDA medium at which the colonies were visible after 3. and 10. days of incubation [%]

Szczep – Strain	72 h	240 h
<i>Candida kefyri</i>	1	8
<i>Candida guilliermondii</i> 1	6	10
<i>Candida famata</i>	6	16
<i>Candida guilliermondii</i> 2	8	10
<i>Candida inconspicua</i>	16	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	16
<i>Kluyveromyces lactis</i>	18	20

zawierającym nawet 20% etanolu, w porównaniu z *S. cerevisiae* i *S. pombe* wykazuje bardziej złożony skład kwasów tłuszczowych. Zawiera wielonienasycone kwasy tłuszczowe C_{18:2} (kwas linolowy) i C_{18:3} (linolenowy) [Jones i in. 1987, Alexandre i in. 1999]. W odróżnieniu od mechanizmów oporności zbadanych dla drożdży *Saccharomyces* i *Schizosaccharomyces*, komórki *K. lactis* w obecności etanolu zmniejszają płynność swoich lipidów. Odbywa się to przez obniżenie indeksu (UI) nienasylenia kwasów tłuszczowych tworzących lipidy błon. Z badań Heipiepera i in. [2000] wynika, że produkt genu *KIADH2* (jeden z czterech genów kodujący cytoplazmatyczną dehydrogenazę alkoholową) może odgrywać ważną rolę w reakcjach adaptacji/detoksykacji *K. lactis* na wysokie stężenie etanolu [Heipieper i in. 2000].

WNIOSKI

Alkohol etylowy obecny w pożywce w stężeniu 12% zahamował wzrost hodowli wszystkich badanych szczepów do 72 h. Najmniej opornymi na etanol szczepami były *C. guilliermondii* 1 oraz 2, w przypadku których dawka 5% etanolu była wystarczająca do całkowitego zahamowania wzrostu. Ze zwiększającym się stężeniem etanolu zmieniał się przebieg krzywej wzrostu, a największa zmiana dotyczyła wydłużenia fazy adaptacyjnej. Po przedłużeniu czasu hodowli ponad 3 doby zaobserwowano zdolność do wytworzenia kolonii w podłożach zawierających powyżej 12% etanolu. W takich warunkach największą opornością na etanol (20%) wykazały się komórki szczepu *Kluyveromyces lactis*. Cecha ta oraz zdolność do fermentacji laktozy potwierdzają możliwość wykorzystania potencjału etanolotwórczego wyizolowanego z kefiru szczepu *Kluyveromyces lactis*. Należy stwierdzić, że kefir, mimo iż jest produktem charakteryzującym się małą zawartością etanolu, to jest źródłem szczepów drożdży tolerujących wysokie stężenia alkoholu etylowego.

LITERATURA

- Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*, FEMS Microbiol. Lett. 124, 17–22.
- Banat I.M., Nigam P., Marchant R., 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World J. Microb. Biotech. 8 (3), 259–263.
- Dragone G., Mussatto S.I., Silva J.B.A., Teixeira J.A., 2011. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. Biomass Bioener. 35 (5), 1977–1982.
- Grajek W., Szymanowska D., 2008. Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. Biotechnologia 3, 46–63.
- Guimarães P.M., Teixeira J.A., Domingues L., 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. Biotechnol Adv. 28 (3), 375–384.
- Hack C.J., Marchant R., 1998. Ethanol adaptation in a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. J. Ind. Microbiol. Biotechn. 20 (3–4), 227–231.

- Heipiepera H.J., Iskenb S., Saliolac M., 2000. Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in adh multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. Res. Microbiol. 151, 777–784.
- Jones R.P., Greenfield P.F., 1987. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. Yeast 3, 223–232.
- Kourkoutas Y., Dimitropoulou S., Marchant R., Nigam P., Banat I.M., Koutinas A.A., 2002. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. Biores. Technol. 82 (2), 177–181.
- Koushki M., Jafari M., Mohammadhosein A., 2012. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. J. Food Sci. Technol. 49 (5), 614–619.
- Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., Singh A., Percival Zhang Y-H., 2011. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. Renew. Sustain. Energ. Rev. 15 (9), 4950–4962.
- Lukondeh T., Ashbolt N.J., Rogers P.L., 2005. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. J. Ind. Microbiol. Biotech. 32 (7), 284–288.
- Ozmihci S., Kargi F., 2008. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. Biochem Eng J. 42 (2), 180–185.
- Pina C., Santos C., Couto J.A., Hogg T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. Food Microbiol. 21 (4), 439–447.
- Schaffrath R., Breunig K.D., 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Fungal Gen. Biol. 30 (3), 173–190.
- Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova T., Frengova G., Spasov Z., 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28, 1–6.
- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanly G.A., 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl. Microb. 109, 13–24.
- You K.M., Rosenfield C.-L., Knipple D.C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. Applied Envir. Microb. 69, 1499–1503.
- Zajsek K., Gorsek A., 2010. Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. Food Bioprod Process 88, 55–60.

KEFIR AS A SOURCE OF YEAST STRAINS WITH HIGH ETHANOL TOLERANCE

Summary. A high tolerance to ethanol is an important feature of yeast strains used in the fermentation industry. The aim of this study was to determine that tolerance of yeast strains from and their ability to ferment various carbon sources. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida inconspicua* strains showed great resistance to ethanol. The highest ethanol-tolerant was *Kluyveromyces lactis* strain and produced colonies in the YPD medium containing 20% v/v ethanol. This feature and the ability to ferment lactose confirm the high potential of *Kluyveromyces lactis* strain. Although containing a low concentration of ethanol, kefir is the source of yeast strains tolerant high concentrations of ethanol.

Key words: yeasts, kefir, ethanol tolerance