



Wpływ długotrwałej ciągłej fermentacji winiarskiej na morfologię drożdży immobilizowanych na szkłe piankowym

Sylvia Bonin, Wiesław Wzorek

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Influence of long-time continuous wine fermentation on morphological changes of yeast immobilized on foam glass

Summary

The aim of this work was to study the influence of long-time continuous wine fermentation on yeast morphology. The process of fermentation was carried out in medium of high sugar concentration (about 320 g/dm³), for 3,5 months, at 22°C in 4 columns fermentor (4 series). In this experiment, wine yeast *Saccharomyces bayanus* strain S.o./1AD from the Collection of Pure Cultures of the Department of Food Biotechnology and Microbiology of Warsaw Agriculture University was used. Yeast was immobilized on foam glass. In this study, before and after immobilization (after finished fermentation) the cells were examined by light microscopy, scanning electron microscopy and computer image analysis. It was stated that yeast after 3,5 months of continuous fermentation was bigger and showed morphological and intracellular changes in comparison with cells before this process. Before immobilization yeast was ovoid, single or budding cells. Various shapes of cells were observed after immobilization: elongated, in the shape of "pear", very big round and "pseudomycelia". In "pseudomycelium", the cells remained firmly connected by their cell walls and cytoplasm. In some cells, degeneration of cytoplasmic content was observed, too. These cells contained "granularity". The results show that long-time, continuous fermentation in high sugar medium causes negative changes of yeast cells.

Key words:

continuous wine fermentation, yeast morphology, microscopy, image analysis, immobilization, foam glass.

Adres do korespondencji

Sylvia Bonin,
Zakład Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Katedra Biotechnologii,
Mikrobiologii i Oceny
Żywności,
Wydział Technologii
Żywności,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159C,
02-787 Warszawa;
e-mail:
bonin@delta.sggw.waw.pl

1. Wstęp

Metody ciągłej fermentacji winiarskiej rozpowszechniły się w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX w. Wraz z rozwojem technik immobilizacji drobnoustrojów prowadzone są prace nad wykorzystaniem w procesach ciągłych drożdży unieruchomionych. Zalety fermentacji ciągłej w porównaniu z technologią tradycyjną to m.in. wzrost wydajności i produktywności, wyższa odporność na przypadkowe zmiany warunków przebiegu procesu, ograniczenie rozwoju drożdży „dzikich”, możliwość wpływania na skład wina. Ponadto drożdże zawieszane w fermentującym medium są stale zasilane świeżym surowcem, a jednocześnie odbierane są produkty przemiany, stąd żywotność komórek znacznie się wydłuża. Wadą jest konieczność stałego zasilania linii, ponieważ przerwy w zasilaniu zakłócają prawidłowy przebieg fermentacji (19).

W dostępnej literaturze brak jest doniesień o wpływie długotrwałej, ciągłej fermentacji alkoholowej, prowadzonej w warunkach zarówno wysokiego stężenia cukru, jak i etanolu na morfologię komórek drożdży. Najczęściej prace dotyczą wpływu pojedynczych czynników stresowych na skład i aktywność komórek drożdży. Natomiast prace poświęcone zmianom morfologii komórek drożdży są nieliczne (1,2,6, 12,17,18) i zostaną szerzej omówione w dyskusji wyników. Ponadto badania te prowadzone są głównie w warunkach niższych stężeń cukrów i etanolu.

Wiadomo, że zawartość cukrów w zakresie od 200 do 400 g/dm³ zmniejsza zdolność pączkowania, a tym samym, liczbę komórek drożdży zarówno w przypadku fermentacji z komórkami „wolnymi”, jak i pułapkowanymi w żelu (3,15). Ponadto stężenie cukrów powyżej 25% powoduje obniżenie tempa fermentacji w wyniku wysokiego ciśnienia osmotycznego, a także wpływa na powstawanie wyższych ilości produktów ubocznych fermentacji (19).

Wzrastające stężenie etanolu powoduje m.in. wymywanie frakcji lipidowej podczas sekrecji etanolu na zewnątrz komórki oraz zmniejsza uwodnienie fosfolipidów i białek błonowych. Wywołuje to zakłócenia w funkcji błony jako bariery selektywnej i zwiększa jej przepuszczalność, co w efekcie prowadzić może do śmierci komórki (4,16).

Celem pracy było określenie zmian morfologii drożdży immobilizowanych wywołanych pod wpływem długotrwałej, ciągłej fermentacji winiarskiej, prowadzonej w warunkach wysokiego stężenia cukrów w nastawie.

2. Materiały i metody badań

2.1. Metodyka technologiczna

Proces fermentacji prowadzono nieprzerwanie przez 3,5 miesiąca w 4-kolumnowym fermentorze, w temp. 22°C. Wykonano 4 serie doświadczeń. Nastaw przygotowywano na bazie soku jabłkowego (udział soku 70%), dosładzano sacharozą do stę-

żenia cukrów ogółem ok. 320 g/dm³, wzbogacano w pożywkę azotową w postaci (NH₄)₂HPO₄ w ilości 0,5 g/dm³ oraz sulfutowano do zawartości SO₂ około 80 mg/dm³, stosując dodatek K₂S₂O₅. W doświadczeniu wykorzystano drożdże *Saccharomyces bayanus* szczep S.o./1AD, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW, które unieruchamiano na powierzchni szkła piankowego. Czas przepływu przez fermentor wynosił 5,5 dnia, czyli tyle trwała faktyczna fermentacja wina. W otrzymanym winie oznaczano podstawowe jego składniki, stosując powszechnie przyjętą metodykę.

2.2. Określanie zmian morfologii komórek

W celu określenia zmian morfologii komórek drożdży w wyniku długotrwałego, procesu ciągłej fermentacji przeprowadzono obserwacje komórek drożdży z „matki drożdżowej” oraz wyizolowanych z nośnika pochodzącego z poszczególnych kolumn fermentora po zakończeniu jego pracy. W celu wyizolowania komórek z nośnika kostki szkła piankowego wytrząsano przez 2 h w roztworze soli fizjologicznej (160 obr/min).

2.2.1. Mikroskop świetlny

Obserwacje i zdjęcia wykonywano w mikroskopie AXIOSCOP 70 firmy Olympus sprzężonym z komputerem i wyposażonym w nasadkę fotograficzną.

2.2.2. Analiza obrazu

Stosowano system analizy obrazu z programem analySIS-Provis, Soft-Imaging. Metoda ta umożliwiła pomiar długości, szerokości, powierzchni i średnicy komórek oraz częściową obserwację struktury wewnątrzkomórkowej. Wyniki pomiarów poddano obróbce statystycznej w programie Statgraphics Plus. Określano wartości największe, najmniejsze i średnie oraz miary rozproszenia, wyliczono także częstości skumulowane i względne jako udziały procentowe i liczbowe komórek dla poszczególnych klas wymiarów. Określono najmniejszą istotną różnicę (NIR) stosując wieloczynnikową analizę wariancji przy PI = 0,05 oraz test Tukeya.

2.2.3. Mikroskop elektronowo-skaningowy

W celu dokładniejszego określenia różnic kształtu przeprowadzono obserwacje komórek techniką mikroskopii elektronowo-skaningowej. Drożdże utrwalano w buforze fosforanowym o pH 7,4 z 2,5% aldehydem glutarowym, odwadniano w etanolu

i acetonie, suszono w punkcie krytycznym w CO₂ i napyłano węglem, a następnie srebrem. Obserwacje prowadzono w mikroskopie typu JSM-35 firmy JEOL.

3. Wyniki i ich dyskusja

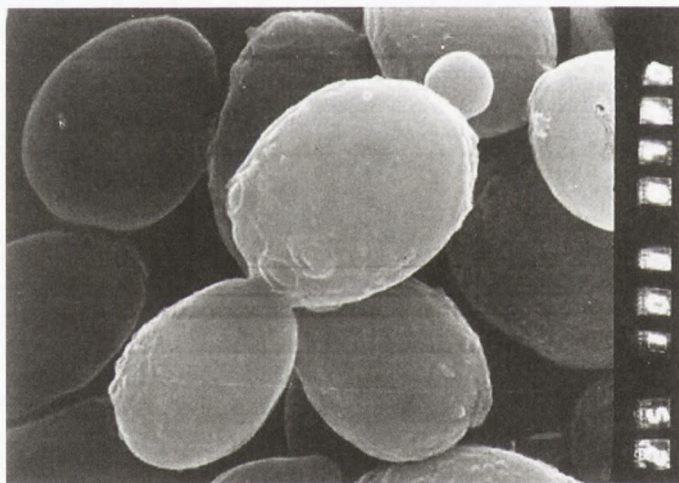
Otrzymywane wino zawierało w zależności od czasu pracy fermentora ok. 15-16% obj. alkoholu i 70-100 g/dm³ cukrów ogółem (tab. 1). Pozostające w winie cukry miały przeciwdziałać obumieraniu komórek w wyniku braku substancji odżywczych. Warunki fermentacji były bardzo trudne, o czym świadczą wyliczone współczynniki Dellego, wynoszące 75,5-80,0. Delle (cyt. 14) opisał wzorem hamującą wpływ wysokiego stężenia alkoholu i cukrów w winie, stwierdzając znacznie większy wpływ etanolu niż cukrów. Według Dellego fermentacja zostaje całkowicie zahamowana przy współczynniku wynoszącym co najmniej 80.

Tabela 1

Zawartość alkoholu i cukrów w winie w czasie pracy fermentora (średnia z 3 serii)

Dzień pracy fermentora	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100
alkohol (% obj.)	15,3	16,6	15,9	15,6	15,6	15,4	15,1	14,7	14,5	14,5
cukry ogółem (g/dm ³)	79,9	54,0	67,0	82,0	81,8	84,6	89,9	103,4	102,1	101,3
współczynnik Dellego	76,8	80,0	78,3	78,4	78,4	77,8	77,0	76,5	75,5	75,4

Komórki przed procesem unieruchomienia (z „matki drożdżowej”) nie wykazywały różnic morfologicznych. Miały kształt owalny, występowały pojedynczo lub jako komórki pączkujące i charakteryzowały się dużą liczbą blizn (rys. 1).



Rys. 1. Komórki pączkujące i z bliznami pochodzące z „matki drożdżowej”, mikroskop elektronowo-skaningowy, powiększenie $\times 10\,000$.

Większość komórek (66%) miała długość 2-3 μm , szerokość 1,5-2,5 μm (83%) (tab. 2). Na podstawie wymiarów wszystkich komórek, wyliczono, że drożdże przed procesem immobilizacji miały średnio 2,6 μm długości, 2 μm szerokości, 9,1 μm obwodu oraz 4,3 μm^2 powierzchni (tab. 3). W tabeli przedstawiono także minimalne i maksymalne wartości wymiarów komórek.

Tabela 2

Udział komórek o określonych wymiarach w „matce drożdżowej” (%). Średnia ze 100 pomiarów

Parametr	Wymiary (μm)					
	1,0-1,5	1,5-2,0	2,0-2,5	2,5-3,0	3,0-3,5	3,5-4,0
długość	0	9	35	31	21	4
szerokość	9	42	41	8	0	0

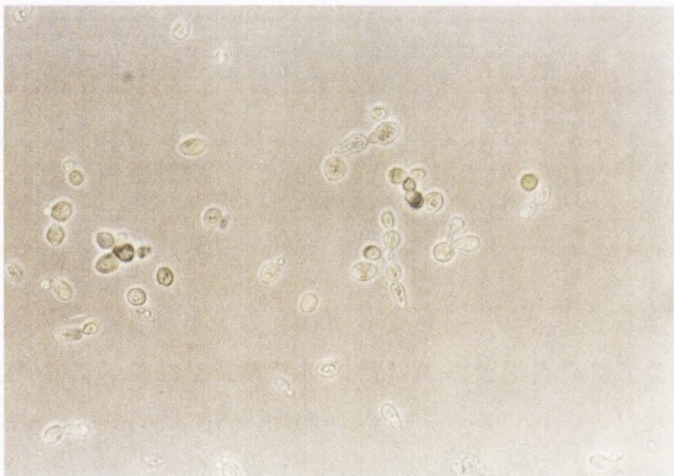
Tabela 3

Wymiary komórek w „matce drożdżowej”. Średnia ze 100 pomiarów

Parametr (μm)	Średnio	Minimalnie	Maksymalnie	Wariancja	Odchylenie standardowe
szerokość	2,00	1,43	2,82	0,13	0,36
długość	2,63	1,85	3,73	0,24	0,49
powierzchnia*	4,31	2,15	8,17	2, 53	1,59
obwód	9,08	6,45	12,62	2,72	1,65

* w μm^2

Komórki po procesie fermentacji ciągłej (pochodzące z nośnika) charakteryzowały się różnorodnością kształtów i były większe w porównaniu do komórek „matki drożdżowej” (rys. 2).



Rys. 2. Zróżnicowane kształty komórek wyizolowanych z nośnika, mikroskop świetlny, powiększenie $\times 1000$.

Zaobserwowano różnice także pomiędzy komórkami z poszczególnych kolumn. Średnie wymiary drożdży wyizolowanych z nośnika pochodzącego z kolumny I były mniejsze w porównaniu do komórek z pozostałych kolumn. Przykładowo średnia długość komórek w kolumnie I wynosiła 5,6 μm , a w ostatniej – 6,2 μm , szerokość zaś odpowiednio 4,0 i 4,6 μm (NIR dla długości – 0,41 μm , a dla szerokości – 0,31 μm) (tab. 4). Jednak, mimo że komórki z kolumny I były mniejsze niż z kolejnych kolumn, to i tak ich długość i szerokość była około 2-krotnie większa w porównaniu z komórkami z „matki drożdżowej” (tab. 3). Rozpatrując wartości minimalne i maksymalne powierzchni komórek pochodzących z nośnika z poszczególnych kolumn stwierdzono 4-5-krotne różnice tego parametru. Największe wartości wykazywały komórki bardzo duże, okrągłe.

Tabela 4

Wymiary komórek wyizolowanych po zakończeniu pracy fermentora z nośnika znajdującego się w kolumnach. Średnia z 80 pomiarów

a)

Kolumna	Długość (μm)					Szerokość (μm)				
	śred	min	max	war	od.st	śred	min	max	war	od.st
I	5,63	3,63	8,41	1,21	1,10	4,02	2,57	6,99	0,79	0,89
II	5,95	3,22	8,95	1,56	1,25	4,59	2,87	7,65	1,05	1,03
III	6,12	3,80	9,23	1,57	1,25	4,78	3,10	7,96	1,02	1,01
IV	6,20	4,29	9,57	1,52	1,23	4,59	3,08	6,98	0,78	0,88
NIR	0,41					0,31				

b)

Kolumna	Powierzchnia (μm^2)					Obwód (μm)				
	śred	min	max	war	od.st	śred	min	max	war	od.st
I	19,51	10,14	41,64	42,06	6,49	20,21	14,44	28,99	10,26	3,20
II	22,73	8,76	50,43	84,66	9,20	20,98	13,50	31,21	14,81	3,85
III	24,05	10,61	48,57	62,92	7,93	22,29	14,86	31,40	14,41	3,80
IV	23,16	11,27	48,93	66,79	8,17	21,94	15,44	31,28	13,77	3,71

śred – wartość średnia, wyliczona z pomiarów wszystkich komórek

min – wartość minimalna

max – wartość maksymalna

war – wariancja

od.st – odchylenie standardowe

Rozpatrując udział komórek o określonych wymiarach (tab. 5) stwierdzono, że w kolumnie I 60% komórek miało długość 4-6 μm , natomiast w pozostałych kolumnach około 60% drożdży charakteryzowało się długością 5-7 μm . Szerokość prawie

połowy (48%) komórek drożdży z kolumny I wynosiła od 3 do 4 μm , natomiast w dalszych kolumnach najwięcej komórek miało szerokość 4-5 μm . W kolumnie I większość komórek miało powierzchnię w granicach 10-25 μm^2 (87%), natomiast w pozostałych kolumnach powierzchnia komórek była większa i w przypadku około połowy drożdży kształtowała się w granicach 15-25 μm^2 . Różnice obwodu komórek z kolumny I i z pozostałych kolumn, nie były tak wyraźne, ale stwierdzano duże wahania w udziale komórek poszczególnych wymiarów, szczególnie w kolumnach II-IV.

Tabela 5

Udział komórek o określonych wymiarach pobranych z nośnika po zakończeniu pracy fermentora (%). Średnia z 80 pomiarów

a)

Kolumna	Długość (μm)						
	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10
I	6	30	30	24	6	4	0
II	8	15	25	30	19	3	0
III	2	18	37	21	12	9	1
IV	0	20	31	29	6	11	3

b)

Kolumna	Szerokość (μm)					
	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8
I	8	48	31	9	4	0
II	2	30	45	12	7	4
III	0	23	40	25	9	3
IV	0	24	49	19	8	0

c)

Kolumna	Powierzchnia (μm^2)									
	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	40-45	45-50	50-55
I	0	24	36	27	6	4	0	3	0	0
II	3	16	24	27	9	10	4	3	2	2
III	0	7	30	21	25	9	2	3	3	0
IV	0	7	39	24	12	9	2	6	1	0

d)

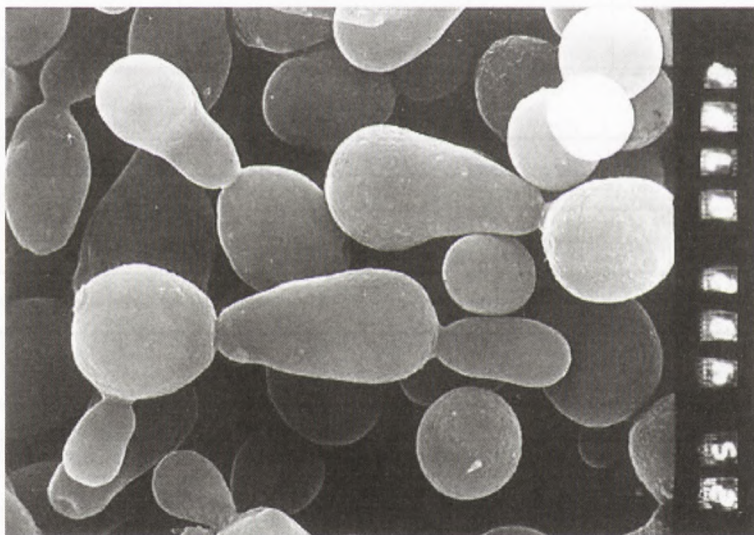
Kolumna	Obwód (μm)									
	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	26-28	28-30	30-32
I	0	9	13	28	26	9	10	3	2	0
II	3	6	15	16	27	9	12	9	2	1
III	0	2	13	15	22	24	8	9	0	7
IV	0	1	9	24	27	10	15	2	9	3

Średni stosunek długości komórek do szerokości wynosił w zależności od kolumny od 1:1,3 do 1:1,4, a w przypadku „matki drożdżowej” – 1:1,3.

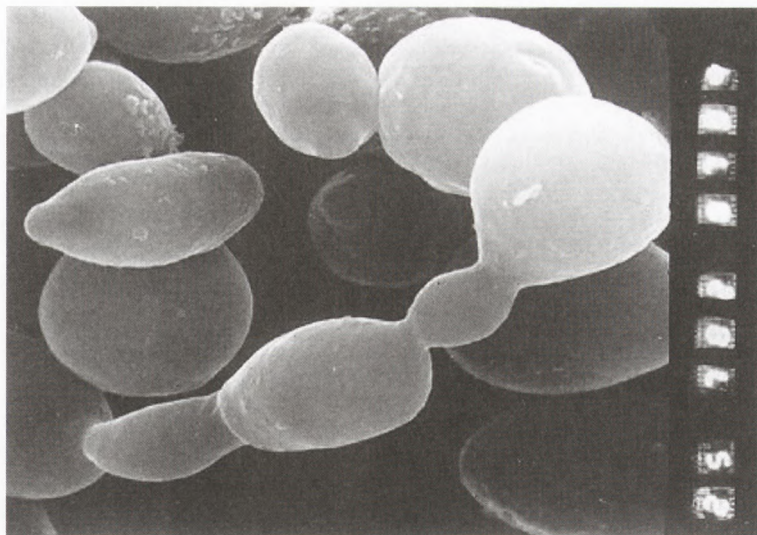
Pons i wsp. (13) podają, że stosunek długości do szerokości w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wynosił od 1:1,1 do 1:4,1, przy czym dla około 20% pomiarów otrzymano wartość 1:1,5. Cytowani autorzy mierzyli, wykorzystując komputerową analizę obrazu, zarówno komórki pojedyncze jak i podwójne. Stwierdzili oni ponadto, że średnica komórek żywych wynosiła średnio 6-9 μm , natomiast martwych około 4,5 μm . Lafforgue i wsp. (8) podają, że wymiary komórek w zależności od koncentracji biomasy wahały się w granicach 4,2-5,2 μm oraz 5,2-6,6 μm , przy czym większej liczbie komórek w podłożu odpowiadało zmniejszenie ich wymiarów.

Po 3,5-miesięcznej pracy fermentora zaobserwowano zmiany morfologii części komórek pochodzących z nośnika. Część z nich miała kształty wydłużone, buławkowate (gruszkowate) lub były to komórki bardzo duże okrągłe, a także tzw. pseudomycelia, czyli formy połączonych ze sobą kilku komórek. Stwierdzono także różnice pomiędzy drożdżami z poszczególnych kolumn.

W kolumnie I obserwowano dużo komórek pączkujących oraz komórek z bliznami po pączkowaniu. Zmienioną morfologią charakteryzowały się jedynie komórki dobudowane, które przyjmowały kształt gruszkowaty lub wydłużony. Po pączkowaniu komórki potomne często nie oddzialały się, a jednocześnie same pączkowały w kilku miejscach, tworząc rozgałęzione „pseudomycelia” (rys. 3). W II kolumnie stwierdzano nadal komórki pączkujące, komórki z bliznami, a także o wydłużonym kształcie i „pseudomycelia”. Drożdże o kształcie gruszkowatym obecne były bardzo rzadko. W kolumnie III obserwowano mniej komórek pączkujących i komórek z bli-



Rys. 3. Zmienione kształty dobudowywanych komórek i tzw. „pseudomycelium”, komórki pochodzące z nośnika z I kolumny, mikroskop elektronowo-skaningowy, powiększenie $\times 4800$.

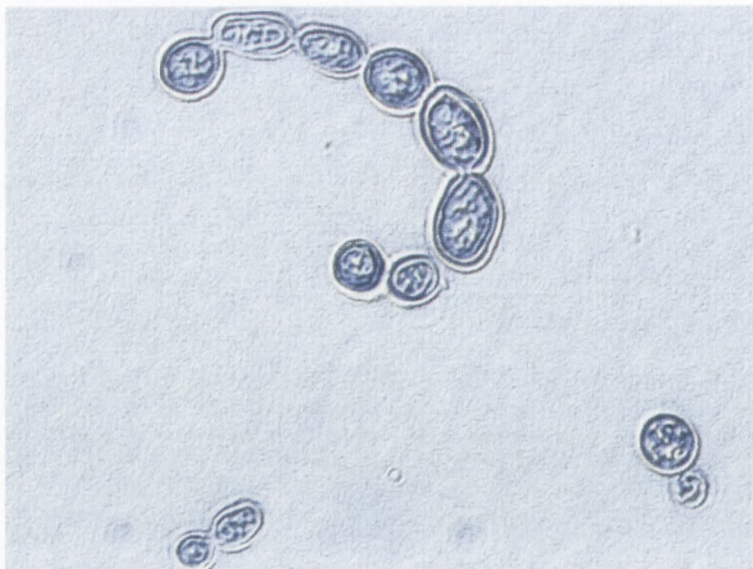


Rys. 4. Drożdże tworzące łańcuszek, komórki wyizolowane z nośnika z IV kolumny, mikroskop elektronowo-skaningowy, powiększenie $\times 7800$.

znami, a w IV – prawie ich nie stwierdzano. Często natomiast występowały łańcuszki komórek połączonych (rys. 4).

Zastosowanie analizy obrazu pozwoliło ponadto stwierdzić, że „pseudomycelia” tworzyły komórki, które nie oddzialały się od siebie po pączkowaniu, gdyż były połączone wspólną ścianą komórkową. W niektórych przypadkach ściana i błona komórkowa nie były całkowicie zamknięte, a przez to komórki miały także wspólną cytoplazmę (rys. 5).

Singh i wsp. (18) obserwowali tworzenie 5-6-komórkowej „pseudogrybni” przez wolne komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Powstawała ona w wyniku pączkowania i nieoddzielania się komórek potomnych od matczynych. Autorzy ci stwierdzili, że w niektórych przypadkach mikrotubule wrzeciona kariokinetycznego nie dzieliły się, stąd komórki matczyne posiadały kilka jąder, a komórki potomne żadnego. Spowodowane to było aktywacją białek regulujących syntezę DNA, bez jednoczesnej aktywacji białek regulujących powstawanie pączka, a wynikało z deficytu składników odżywczych. Również Shimosaka i wsp. (17) obserwowali w mutantach IHS-1 drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, komórki o dwóch lub więcej jądrach, a także bez jąder. Wynikało to z mutacji genu odpowiadającego za transport jądra do komórki potomnej. Mutacja ta powodowała również wydłużanie się komórek nowo powstałych. Z kolei Hill i Robinson (5) stwierdzili podczas fermentacji ciągłej wydłużanie się komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, z elipsoidalnych do „rózgowatych”. Zmiany te występowały głównie w komórkach nowo powstałych, a autorzy sugerują, że mogły być one spowodowane przystosowaniem się komórek do ni-



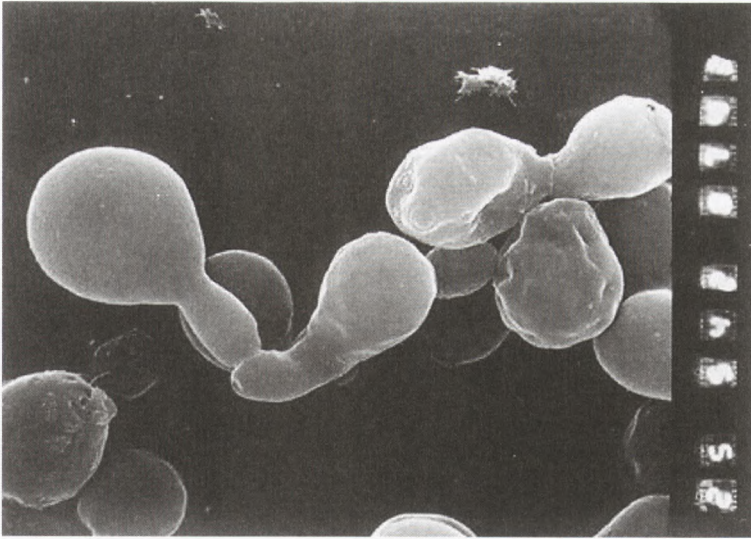
Rys. 5. Komórki z III kolumny, tworzące łańcuszek, komputerowa analiza obrazu, powiększenie $\times 3000$.

skiej koncentracji glukozy w podłożu. Ich zdaniem zwiększenie wymiarów komórek umożliwiało lepszy kontakt z substancjami odżywczymi.

Zalewski i Buchholz (20) podają, że komórki pączkujące są charakterystyczne dla fazy wzrostu wykładniczego, w którym spotykane są „agregaty” 4-komórkowe, powstałe z nierozdzielenia pączkujących komórek podwójnych lub występują komórki matczyne z dwiema potomnymi. Jednak w czasie trwania fazy stacjonarnej dominują komórki pojedyncze. Hinfray i wsp. (6) stosując drożdże unieruchomione w krążkach agarozowych obserwowali obniżenie liczby komórek nowo powstających. Zdaniem autorów wyższa wydajność fermentacji powodowała, że komórki zużywały mniej glukozy na budowę biomasy. Również Alteriis i wsp. (1) zaobserwowali obniżenie tempa wzrostu drożdży unieruchomionych w dyskach żelatynowo-skrobiowych. Rosnące w wolnym tempie komórki dzieliły się często asymetrycznie. Autorzy ci stwierdzili również, że komórki immobilizowane w porównaniu do komórek nie immobilizowanych wykazywały około 30% mniej komórek pączkujących.

W naszych badaniach drożdże unieruchamiano na nośniku porowatym, stąd warunki częściowo tylko przypominały warunki panujące w żelu. Tu dla komórek przylegających do nośnika ograniczenia dyfuzyjne stanowiły położone wyżej warstwy komórek oraz powierzchnia szkła piankowego.

Na zdjęciach z mikroskopu elektronowo-skaningowego w kolumnach II-IV obecne były niekiedy komórki zapadnięte, lekko pofałdowane (rys. 6). Mogły one ulec zniekształceniu w wyniku procedury przygotowania materiału do zdjęć. Jednak wszystkie próbki przygotowywano w ten sam sposób, a komórek takich w ogóle nie

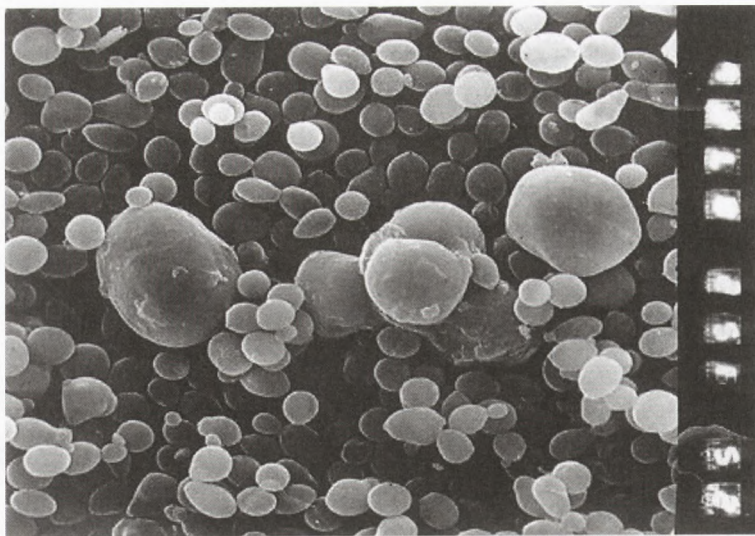


Rys. 6. Zapadnięte komórki wyizolowane z kolumny III, mikroskop elektronowo-skaningowy, powiększenie $\times 5400$.

zaobserwowano w „matce drożdżowej” i kolumnie I. Potwierdzeniem były obserwacje wykonane podczas komputerowej analizy obrazu, które wykazały także nierówną powierzchnię ściany komórkowej niektórych drożdży (rys. 9).

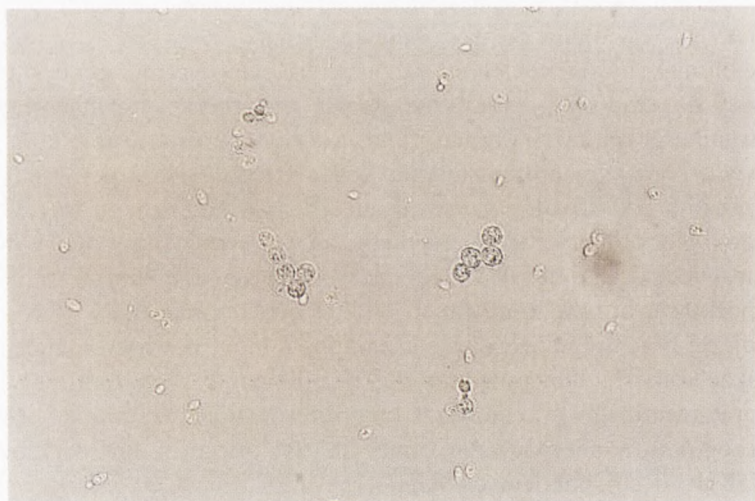
Martinez-Rodriguez i wsp. (12) podczas długotrwałego przetrzymywania komórek drożdży w winie (po ich umieszczeniu) oraz drożdży używanych w trakcie procesu szampanizacji, zaobserwowali podobne zdeformowanie komórek. Zdaniem autorów zmiany te wywołane zostały autolizą drożdży, w wyniku której nastąpiło przerwanie błony komórkowej stanowiącej barierę osmotyczną. Komórki traciły turgor i kurczyły się, stąd ściana, która nie ulegała zniszczeniu, stawała się „pomarszczona” w wyniku powstawania bruzd i fałd. Nierówną powierzchnię komórek podczas autolizy drożdży stwierdzili również Kollar i wsp. (7). Morris i wsp. (10) zaobserwowali, że komórki drożdży w warunkach stresu osmotycznego kurczyły się, a efektem tego było pomarszczenie zewnętrznej warstwy komórkowej. Natomiast zwiększenie wielkości komórek wiąże się z ciągłą syntezą substancji budujących ścianę komórkową, przy jednoczesnym braku pączkowania (9).

W niniejszej pracy w mikroskopie skaningowo-elektronowym nielicznie obserwowano także komórki olbrzymie, okrągłe, bez blizn (rys. 7). Natomiast w obrazach z mikroskopu świetlnego oraz podczas komputerowej analizy obrazu stwierdzano często, szczególnie w przypadku kolumny III i IV, obecność komórek bardzo dużych, okrągłych, o stosunkowo cienkiej strukturze zewnątrzkomórkowej (ścianę, błonę i przestrzeń peryplazmatyczną traktowano w tym przypadku łącznie), bez wyraźnej struktury wewnątrzkomórkowej, a ich wnętrze wypełniały „ziarnistości”

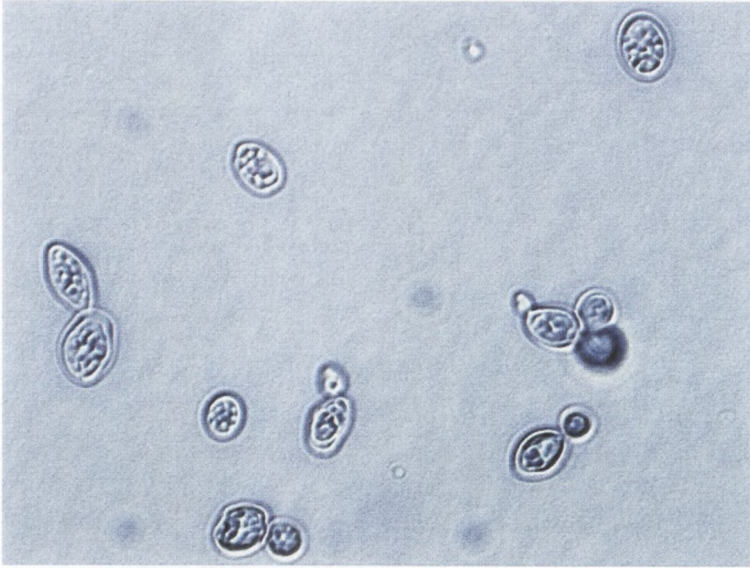


Rys. 7. Komórki „olbrzymie” pochodzące z nośnika z I kolumny, mikroskop elektronowo-skaningowy, powiększenie $\times 1500$.

(rys. 8). Komórki olbrzymie, jak się wydaje, mogły prawdopodobnie ulegać zniszczeniu w trakcie przygotowywania preparatów do mikroskopii skaningowej, np. podczas odwadniania w punkcie krytycznym mogło następować ich pęknięcie.



Rys. 8. Komórki „olbrzymie” pochodzące z nośnika z I kolumny, mikroskop świetlny, powiększenie $\times 800$.



Rys. 9. Komórki o nierównej ścianie komórkowej oraz wypełnione „ziarnistościami”, komputerowa analiza obrazu, powiększenie $\times 2500$.

Zastosowanie metody komputerowej analizy obrazu komórek drożdży pozwoliło stwierdzić, że komórki różnią się także strukturą wewnątrzkomórkową. Wspomniano już, że komórki olbrzymie wypełnione były ziarnistościami, bez wyraźnej struktury wewnątrzkomórkowej. Ziarnistości te wypełniały także większość komórek zarówno o zmienionych, jak i normalnych kształtach (rys. 9). Niektóre komórki zawierały natomiast duże wakuole w ilości od 1 do 2-3. W nowo powstających komórkach wodniczka zajmowała zwykle prawie całe ich wnętrze (rys. 10). Stąd, jak się wydaje, zmiany komórkowe zachodziły zarówno w kierunku zmian kształtu, jak i struktury wewnątrzkomórkowej.

Zalewski i Buchholz (20) podają, że komórki rosnące w podłożu bogatym w składniki odżywcze mają duże wakuole, stąd są one charakterystyczne dla fazy wzrostu wykładniczego. Natomiast kiedy podłoże staje się ubogie w substraty (w doświadczeniu przeprowadzonym przez cytowanych autorów była to glukoza), komórki zaczynają zużywać materiały zgromadzone w wakuolach, w związku z czym następuje rozpad tych struktur.

W naszych badaniach w otrzymanym winie stwierdzano jeszcze znaczne ilości cukrów, stąd drożdże nie musiały wykorzystywać materiałów zapasowych, zgromadzonych w wakuolach. Niemniej jednak nie można wykluczyć, że mogło brakować innych składników pokarmowych (np. niektórych aminokwasów, mikroelementów).

Avakjanc (2) zaobserwował w początkowym stadium autolizy drożdży zachodzącej podczas ich przetrzymywania w winie, tworzenie się kilku wakuoli. Po mie-



Rys. 10. Komórki z widocznymi wodniczkami, komputerowa analiza obrazu, powiększenie $\times 3000$.

siącu pomiędzy ścianą a błoną komórkową obecna była przestrzeń peryplazmatyczna, natomiast po sześćdziesięciu dniach cytoplazma stawała się ziarnista i trudno było rozpoznać struktury wewnątrzkomórkowe.

Kollar i wsp. (7) stwierdzili, że w czasie autolizy, w starzejących się drożdżach następowała degradacja struktury wewnątrzkomórkowej, wakuole zajmowały całą jej przestrzeń, a cytoplazma wypływała z komórek. Efektem było powstawanie komórek duchów (*cell ghosts*). Również Martinez-Rodriguez i wsp. (12) zaobserwowali puste komórki drożdży powstające podczas ich autolizy, zachodzącej w winie.

W naszych badaniach nie zaobserwowano komórek o rozerwanej ścianie czy komórek zupełnie pustych. Jednak nie wiadomo, jak zdeformowane komórki zachowałyby się, gdyby proces fermentacji prowadzony był jeszcze dłużej.

Na zmianę morfologii komórek wpływać mogą także uboczne produkty fermentacji. Maiorella i wsp. (11) stwierdzili, że kwas octowy niszczy błonę komórkową, w wyniku czego komórki stają się nieregularne i wydłużone. 1-propanol i 2-metylobutanol są przyczyną powstawania „pseudomyceliów” oraz wpływają na powstawanie komórek długich, o kształcie różgi. Zwiększona zawartość aldehydu octowego powoduje ponad dwukrotny wzrost wymiarów komórek, które stają się „papkowate”, natomiast glicerol wpływa na zmniejszenie ich wymiarów i nadaje im „sztywność”.

4. Wnioski i spostrzeżenia

1. Proces długotrwałej, ciągłej fermentacji winiarskiej prowadzony przy zastosowaniu wysokocukrowych nastawów i drożdży unieruchomionych na szkle piankowym powoduje w części komórek drożdży zmiany kształtu i struktury wewnątrzkomórkowej.

2. Stwierdzone zmiany są prawdopodobnie formą przystosowania się do niekorzystnych warunków bytowania. Pod uwagę jako niekorzystne warunki mogą być brane: wysokie stężenia cukrów i etanolu, obecność produktów ubocznych fermentacji, brak tlenu, długi czas pracy fermentora, niepełnocenne podłoże.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN nr 5 P06G 056 19.

Literatura

1. de Alteriis E., Porro D., Romano V., Parascandola P., (2001), *FEMS Microbiol. Lett.*, 195, 245-251.
2. Avakjanc S. P., (1982), *Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR*, 2, 55-59.
3. Barros A. M. R., Cabral J. M. S., Novais I. M., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 1097-1104.
4. Grajek W., Walkowiak-Tomczak D., (1993), *Przem. Ferment. i Owoc-Warz.*, 12, 13-15.
5. Hill G. A., Robinson C. W., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, (11), 815-820.
6. Hinfrey C., Jouenne T., Junter G. A., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, (10), 1107-1112.
7. Kollar R., Voříšek J., Šturdík E., (1993), *Folia Microbiol.*, 38, (6), 479-485.
8. Lafforgue C., Malinowski J., Goma G., (1987), *Biotechnol. Lett.*, 9, (5), 347-352.
9. Lumsden W. B., Duffus I. H., Sloughther I. C., (1987), *J. General Microbiol.*, 133, 877-881.
10. Morris G. J., Winters L., Coulson G. E., Clarke K. J., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2023-2034.
11. Maiorella B., Blanch H. W., Wilke Ch. R., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 103-121.
12. Martinez-Rodriguez A. J., Polo M. C., Carrascosa A. V., (2001), *International J. Food Microbiol.*, 71, (1), 45-51.
13. Pons M. N., Vivier H., Remy J. F., Dodds J. A., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1352-1359.
14. Rose A., Harrison J. S., (1970), *The yeast*, vol. 3, *Yeast technology*, 26-28, Academic Press, London, New York.
15. Roukas T., (1996), *J. Food Engin.*, 27, 87-96.
16. Sharma S. Ch., (1997), *FEMS Microbiol. Lett.*, 152, 11-15.
17. Shimosaka M., Masui S., Togawa Y., Okazaki M., (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 72, (6), 485-487.
18. Singh V. K., McCracken D. A., Nadakavukaren M. J., Jayaswal R. K., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 166, 95-101.
19. Wzorek W., Pogorzelski E., (1998), *Technologia winiarstwa gronowego i owocowego*, 131-136, 166-173, SIGMA-NOT, Warszawa.
20. Zalewski K., Buchholz R., (1996), *J. Biotechnol.*, 48, 43-49.