



**Vpliv temperaturnega šoka na vcepek  
*Saccharomyces cerevisiae* in produkcijo glicerola**

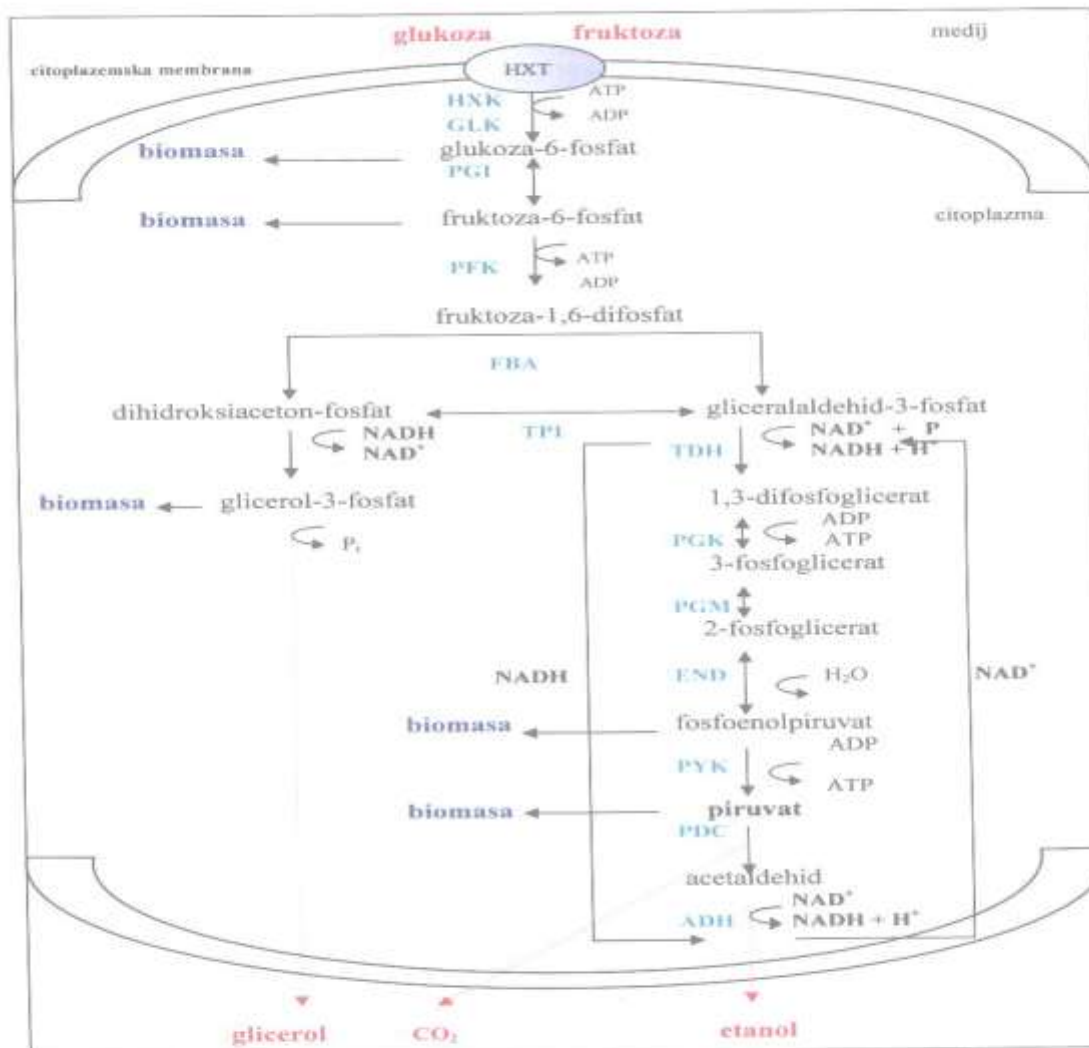
**Marin Berovič in Marko Herga**

**Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
Katedra za Kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo  
Univerza v Ljubljani**

# Laboratorijski 10 l fermentor z računalniškim vodenjem



# Glikoliza



Slika 5.: Shematični prikaz bioprocesa glikolize in alkoholne fermentacije.

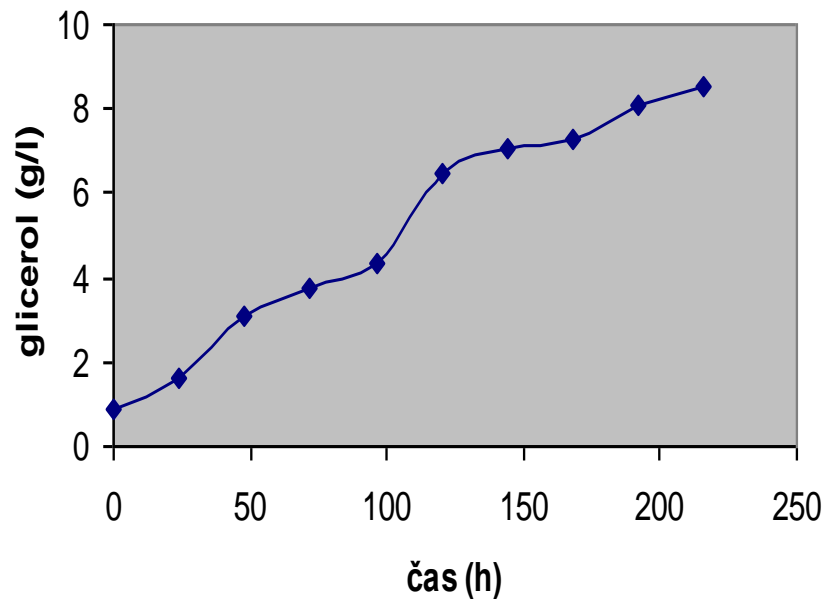
Pomen kratic na sliki: HXT (prenašalni protein za heksozo), HXK (heksokinaza), GLK (glukokinaza), PGI (fosfoglukoizomeraza), PFK (fosfofruktokinaza), FBA (aldolaza), TPI (triozafosfat izomeraza), TDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), PGK (fosfoglicerat kinaza), PGM (fosfoglicerat mutaza), ENO (enolaza), PYK (piruvat kinaza), PDC (piruvat dekarboksilaza), ADH (alkohol dehidrogenaza), (Boulton *in sod.*, 1996)

# Metabolizem kvasovk v alkoholni fermentaciji

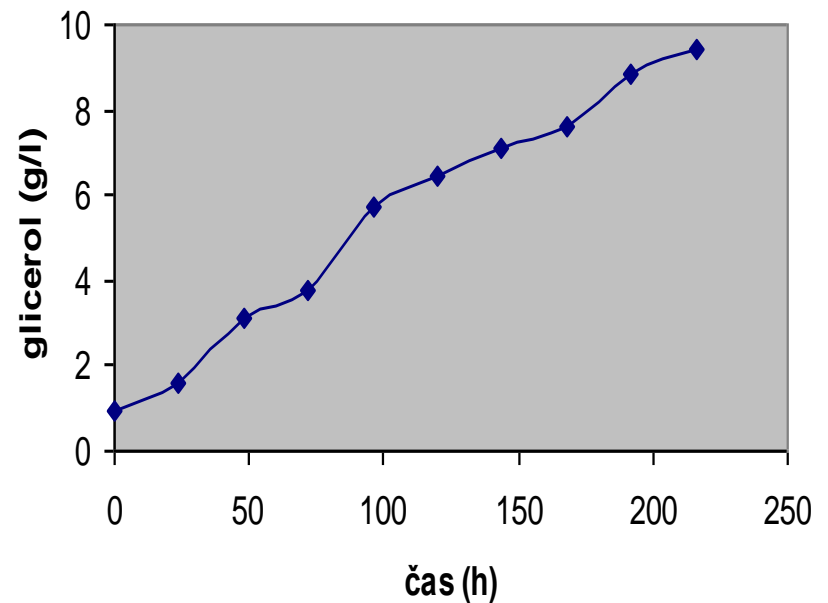


# Nastajanje glicerola pri spreminjanju temperature fermentacije

Fermentacija z nihanjem temperature (18-22 st)



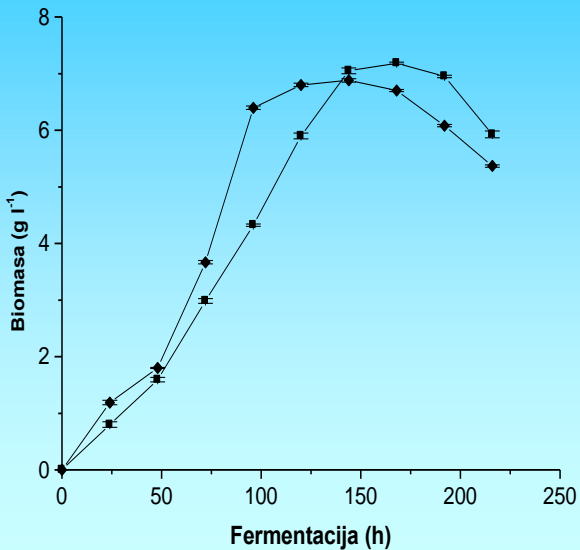
Fermentacija z nihanjem temp. (18-25 st)



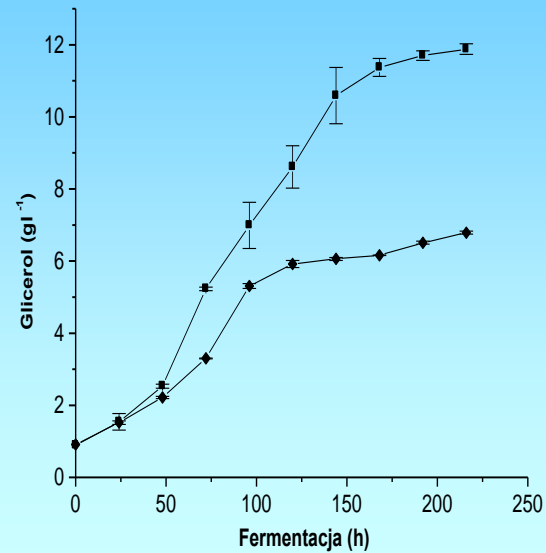
- S predhodnimi raziskavami smo ugotovili, da lahko produkcijo glicerola povečamo s spreminjanjem temperature med fermentacijo
- Pri temperaturnem šoku 45 °C, ki smo ga izvedli na vcepku pa smo dosegli enake koncentracije glicerola kot pri temperaturnih šokih pri 34 °C

Ferm.	18°C	T.Š. 8h/34°C	T.Š. 20min/45°C	12h /18-25°C
Glicerol (g/l)	6,81	11,62	12,14	9,42

# Vpliv temperaturnega šoka na vcepek *Sacharomyces cerevisiae*



Slika 1. Biomasa v fermentaciji z ■ 20 minutnim temperaturnim šokom vcepka pri 45 °C in ◆ kontrolni vzorec pri fermentaciji pri 18 °C.



Slika 2. Produkcija glicerola v fermentaciji z ■ 20 minutnim temperaturnim šokom vcepka pri 45 °C in ◆ kontrolni vzorec pri fermentaciji pri 18 °C.

**Tabela 1. Metaboliti nastali med fermentacijo ob uporabi termično obdelanega vcepka v primerjavi s kontrolnim vzorcem.**

<b>Metaboliti</b>	<b>Kontrolni vzorec (18 °C) (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Termično obdeleni vcepek (20 min / 45 °C) (g l<sup>-1</sup>)</b>
<b>Biomasa</b>	<b>6.7 ± 0.02</b>	<b>7.2 ± 0.02</b>
<b>Red. sladkorji</b>	<b>6.5 ± 0.23</b>	<b>2.4 ± 0.09</b>
<b>Ocetna kislina</b>	<b>0.28 ± 0.06</b>	<b>0.32 ± 0.02</b>
<b>Jantarna kislina</b>	<b>0.63 ± 0.11</b>	<b>0.75 ± 0.12</b>
<b>Jabolčna kislina</b>	<b>3.3 ± 0.16</b>	<b>3.4 ± 0.17</b>
<b>Vinska kislina</b>	<b>2.5 ± 0.18</b>	<b>2.2 ± 0.09</b>
<b>Etanol</b>	<b>84.70 ± 2.18</b>	<b>91.77 ± 0.93</b>
<b>Glicerol</b>	<b>6.81 ± 0,06</b>	<b>12.14 ± 0,26</b>



# Vpliv enojnih in dvojnih temperaturnih šokov na biosintezo glicerola

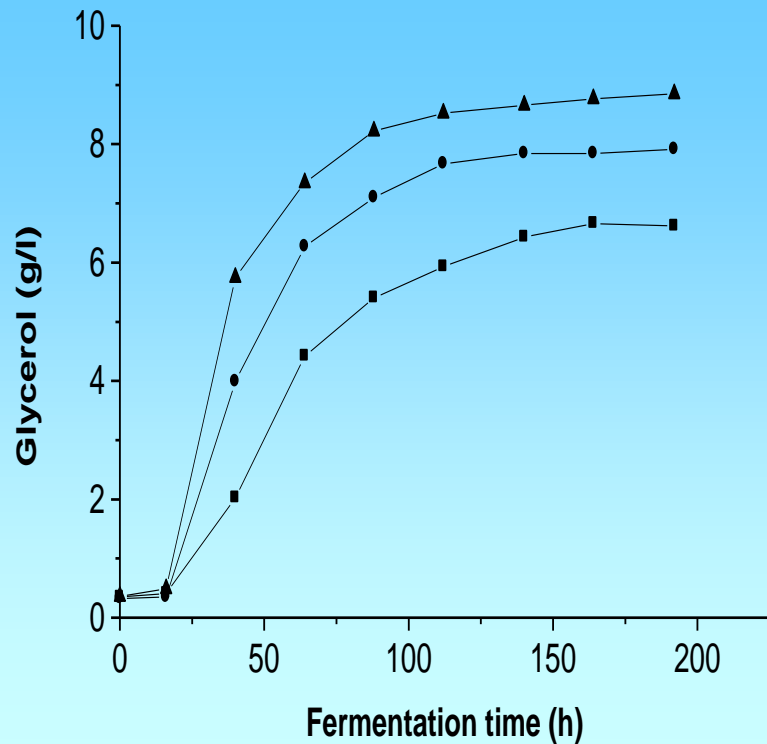


Fig. 1: Glycerol production at constant fermentation temperature of 18°C; black square, control; black circle, single heat shock at 34°C for 4 h; black triangle, single heat shock at 34°C for 24 h.

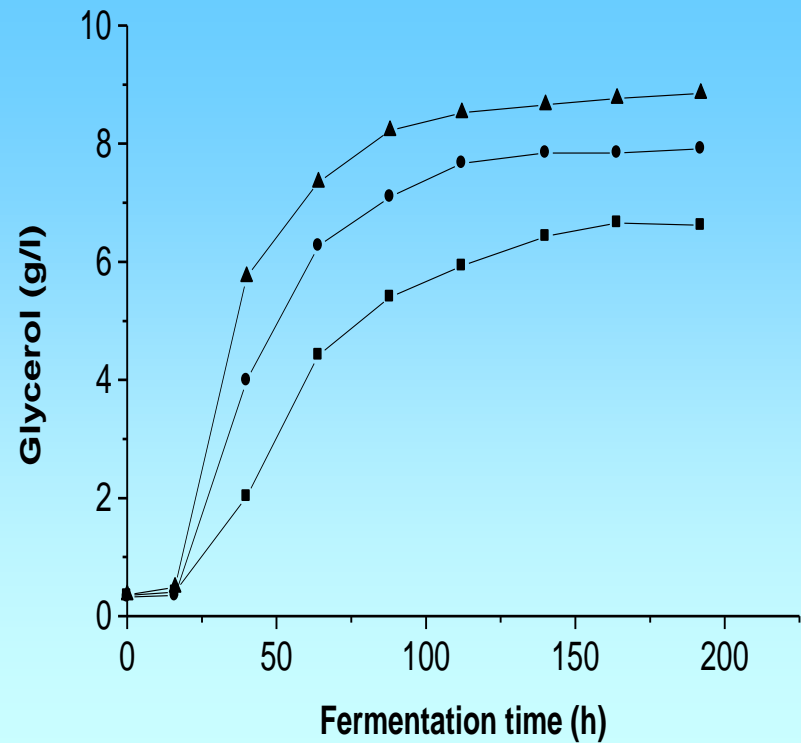


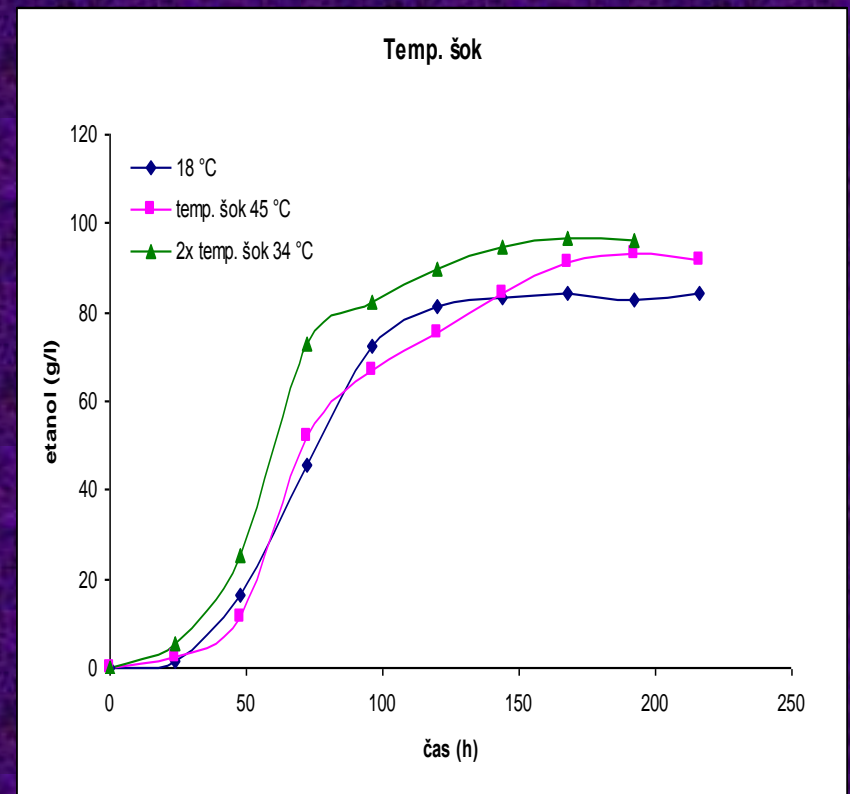
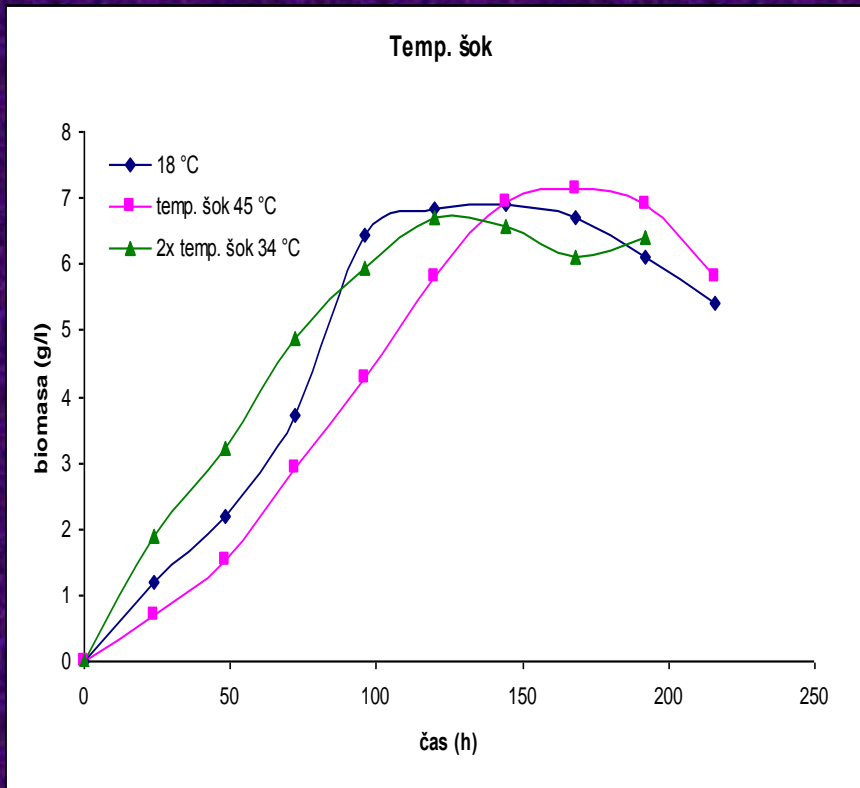
Fig. 2: Glycerol production at constant fermentation temperature of 18 °C; black square, control; black circle, double heat shock at 34°C (2 x 4 h); and black triangle, double heat shock at 34°C (2 x 8 h).

# ZAKLJUČKI

- S temperaturnimi šoki smo dosegli večjo metabolno aktivnost vinskih kvasovk in s tem višjo produkcijo glicerola in višjih alkoholov
- Določili smo optimalni temperaturni šok pri 34°C, ki je bil pri 8-urah in dokazali da nihanje temperature 18-25°C pozitivno vpliva na produkcijo glicerola in višjih alkoholov
- Kvasovke ki preživijo temperaturni šok 45°C, ki smo ga izvedli na vcepku imajo povišano produkcijo glicerola tekom cele fermentacije. Ta metoda je zaradi tega zelo primerna za produkcijo vina v velikem merilu, saj s tem postopkom nimamo tehnoloških problemov s segrevanjem in ohlajanjem med fermentacijo, ter s hlapnimi aromami v vinu.

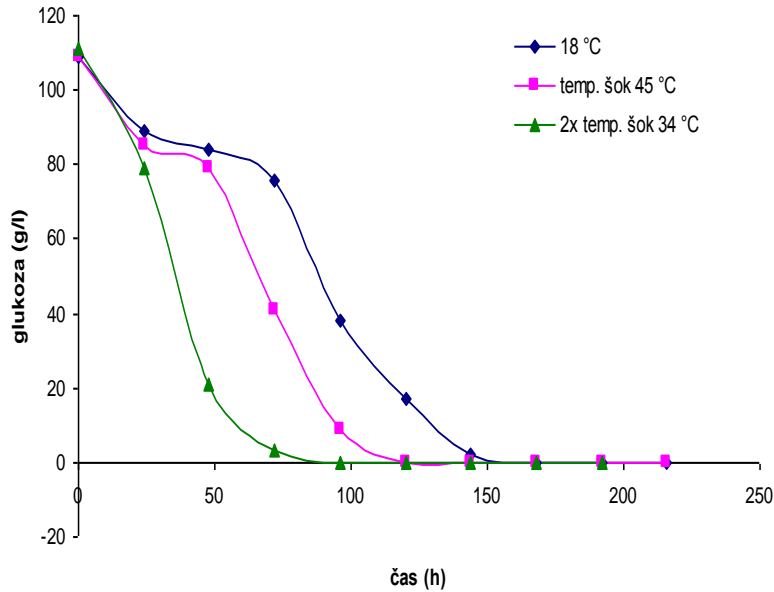
## Rezultate raziskav smo objavili v člankih

- **Berovič M, Herga M. 2007 Heat shock on *Saccharomyces cerevisiae* inoculum increases glycerol production in wine fermentation *Biotechnol. Lett.* vol. 29, 6, 891-894 (2007)**
- **Berovič M, Pivec A., Košmerl T., Wondra M., Čelan Š., Heat Shock on Glycerol Production in Alcohol Fermentation. *J.Biosc.Bioeng.*vol.103,2,135-139 (2007)**

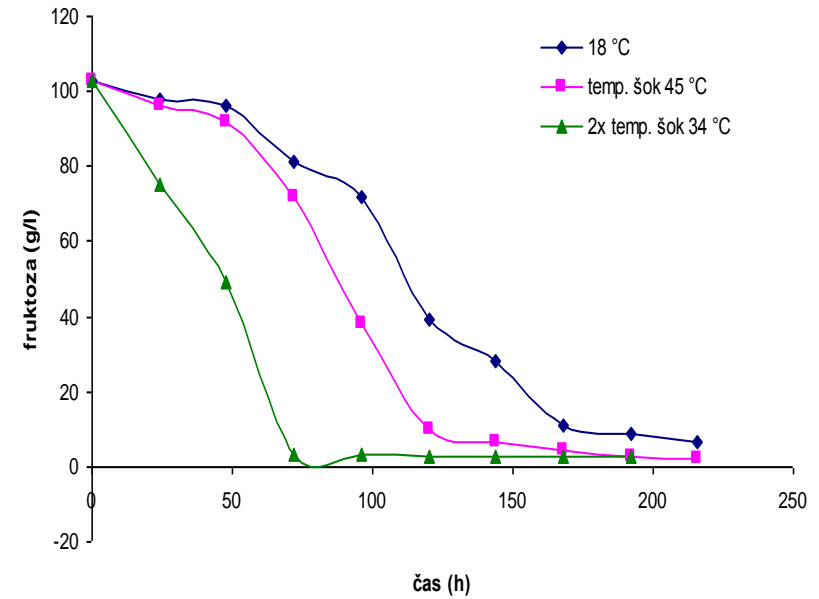


**Naraščanje biomase in etanola med fermentacijo pri 18°C, 20 minutnem temperaturnem šoku na vcepku pri 45°C in dvakratnem 12 urnem temperaturnem šoku pri 34 °C**

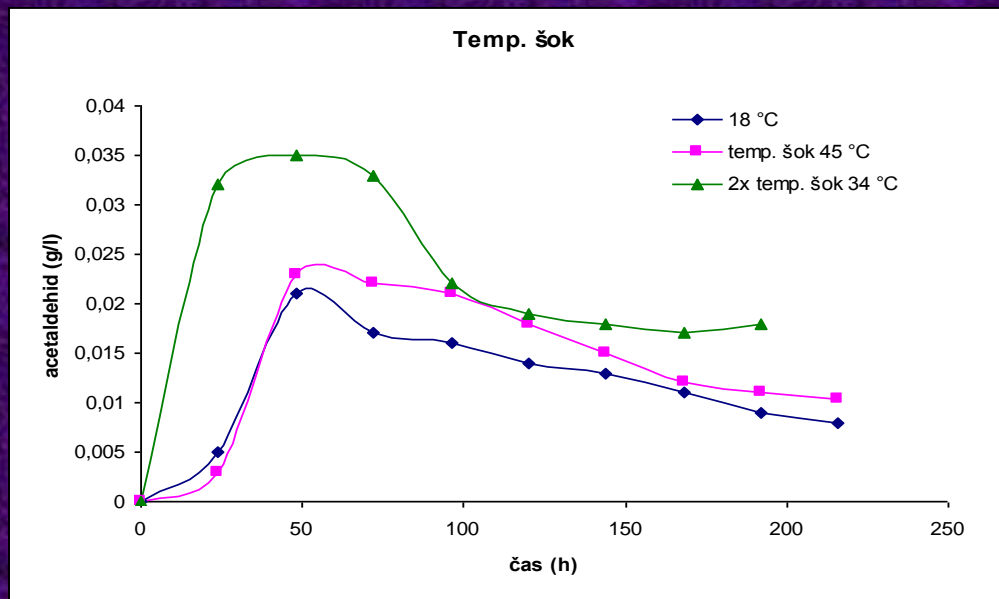
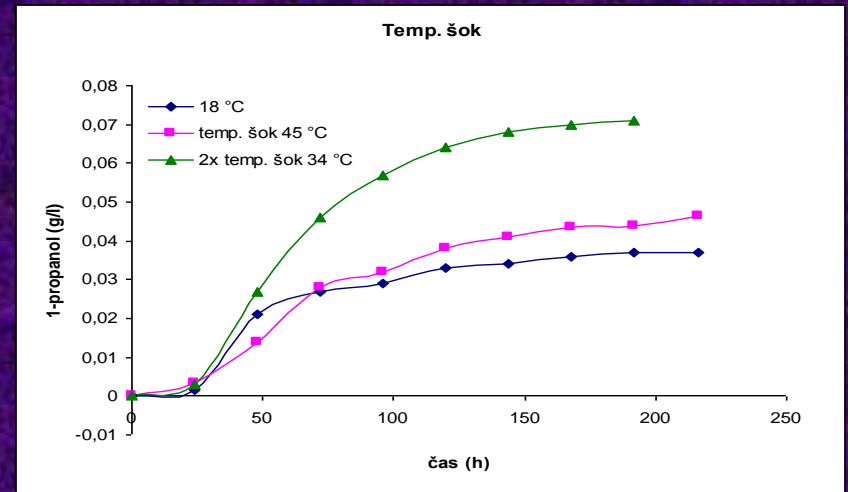
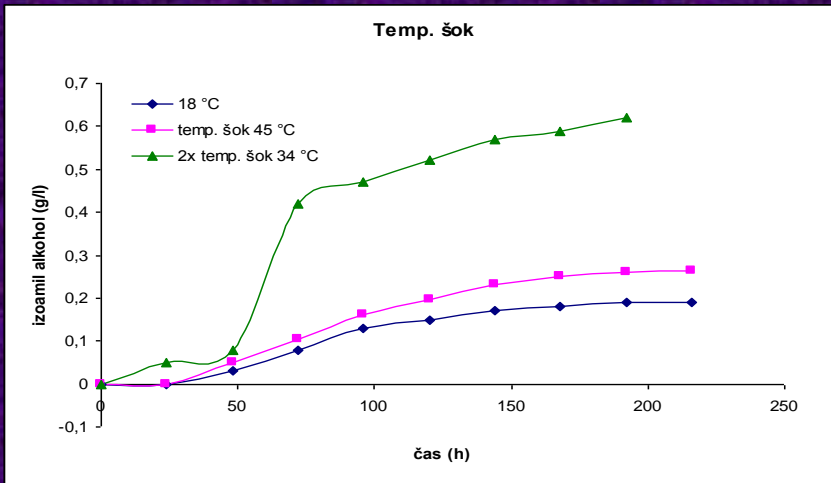
Temp. šok



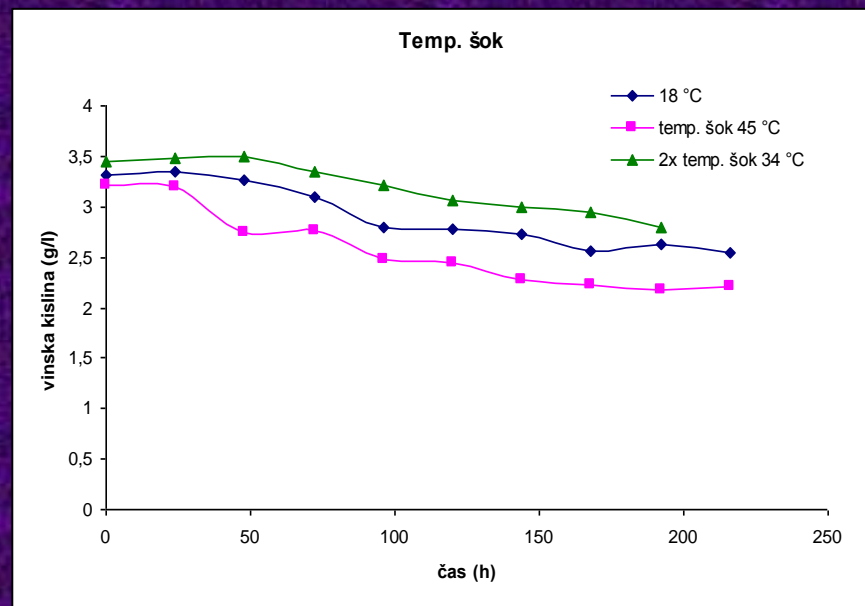
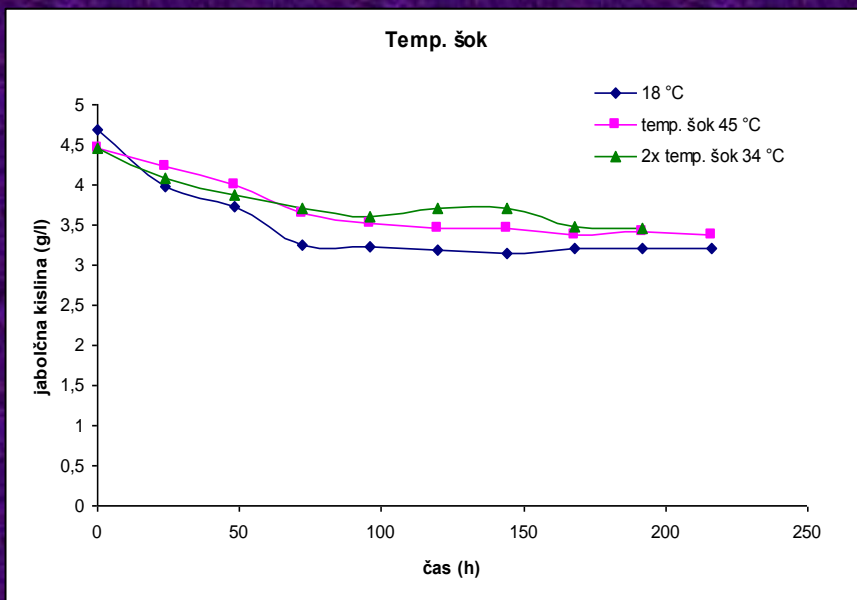
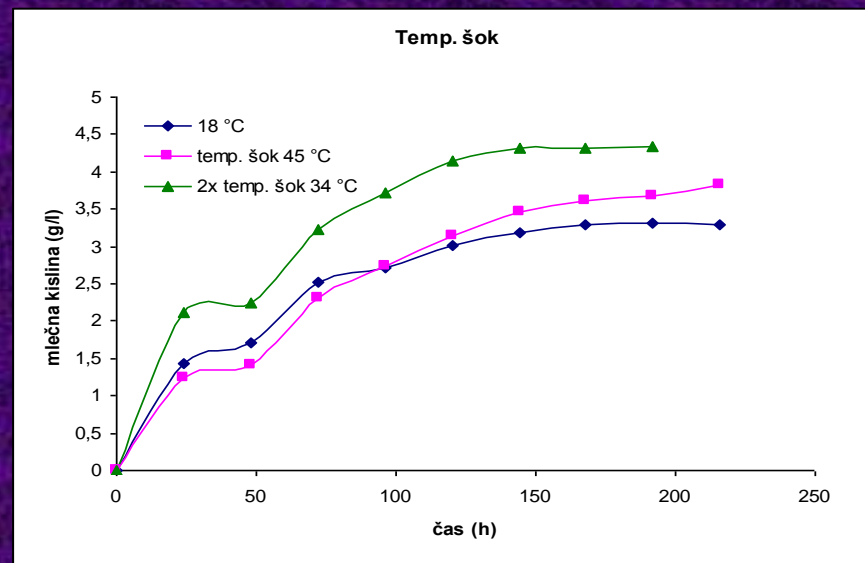
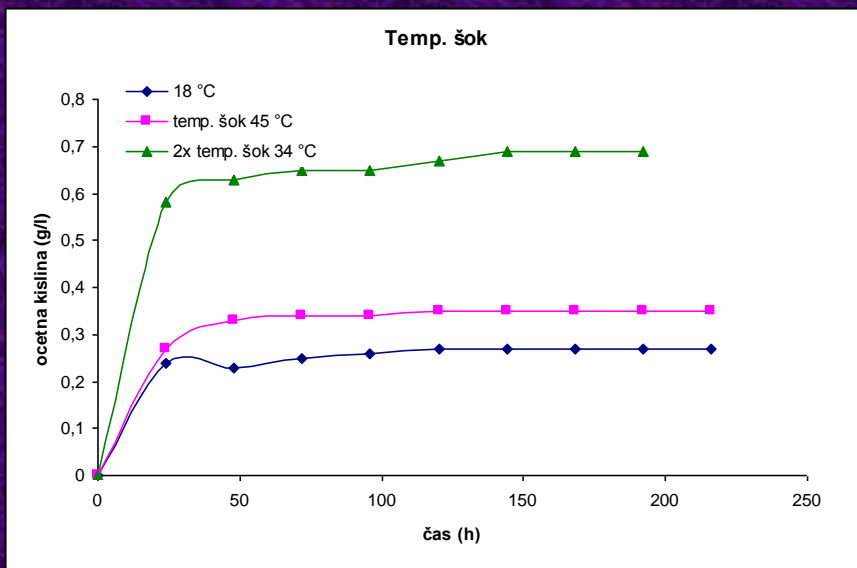
Temp. šok



**Poraba glukoze in fruktoze med fermentacijo pri 18°C, 20 minutnem temperaturnem šoku na vcepku pri 45°C in dvakratnem 12 urnem temperaturnem šoku pri 34 °C**



**Nastajanje izoamilalkohola, 1-propanola in acetaldehida med fermentacijo pri 18°C, 20 minutnem temperaturnem šoku na vcepku pri 45°C in dvakratnem 12 urnem temperaturnem šoku pri 34 °C**



**Nastajanje očetne in mlečne kisline, upadanje vinske in jabolčne kisline med fermentacijo pri 18°C, 20 minutnem temperaturnem šoku na vcepku pri 45°C in dvakratnem 12 urnem temperaturnem šoku pri 34 °C**

**Table 1a,b: Metabolites produced in fermentations at various temperature conditions**

Single HS: single heat shock for 4 h and single heat shock for 24 h

Double HS: double heat shock for 2 x 4 h and double heat shock for 2 x 8 h.

Fermentation	Reduc. sugars (g l <sup>-1</sup> )	Isoamyl alcohol (g l <sup>-1</sup> )	1-propanol (g l <sup>-1</sup> )	Acet aldehyde (g l <sup>-1</sup> )	Ethanol (g l <sup>-1</sup> )	E Glycerol (g l <sup>-1</sup> )	Acetic acid (g l <sup>-1</sup> )	Succ. acid (g l <sup>-1</sup> )	Citric acid (g l <sup>-1</sup> )	Malic acid (g l <sup>-1</sup> )	Tartaric acid (g l <sup>-1</sup> )
Control (18°C)	3.2	0.24	0.090	0.009	86.90	6.7	0.35	0.67	0.58	2.9	2.5
Single HS (4h)	2.6	0.33	0.031	0.010	92.00	7.9	0.45	0.73	0.57	2.5	3.5
Single HS (24h)	2.3	0.35	0.033	0.012	94.00	8.2	0.41	0.74	0.58	2.5	3.5
Double HS (2x4h)	2.0	0.51	0.037	0.013	101.00	10.0	0.56	0.78	0.72	2.3	3.6
Double HS (2x8h)	1.9	0.53	0.039	0.014	103.11	10.9	0.56	0.79	0.72	2.1	3.5