

Jan Fiedurek<sup>1\*</sup>, Mariusz Trytek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej

Wpłynęło we wrześniu 2015 r.  
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Stresy abiotyczne. 2.1. Stres kwasowy. 2.2. Stres osmotyczny. 3. Podsumowanie

### The effect of acid and osmotic stress on metabolite production by microorganisms

**Abstract:** The efficiency of the overall biotechnological processes is strongly dependent on the interaction between the microbial biocatalyst and the stressful environment. Microorganisms have evolved to survive constant fluctuation in their external surroundings by special adaptation systems, including the reorganization of genomic expression by activation of transcriptional factors under stress conditions and the production of suitable metabolites. There is some evidence that more active microbial cells may be obtained by using abiotic stresses, such as osmotic and acidic stress, before or during the process. Also, changes in the conditions of stress application, for example its duration or simultaneous increase in temperature, may improve the yield, probably as a result of changes in the metabolic pathway of the microorganisms used. In this review, we have summarized the most important information from available literature on the effect of acid and osmotic stress on the production of useful metabolites by microorganisms.

1. Introduction. 2. Abiotic stresses. 2.1. Acidic stress. 2.2. Osmotic stress. 3. Conclusions

**Słowa kluczowe:** stres kwasowy i osmotyczny, metabolity

**Key words:** acid and osmotic stress, metabolites

## 1. Wstęp

Reakcje komórek na nagłe zmiany w środowisku i mechanizmy ochrony ich przed uszkodzeniami powodowanymi przez warunki stresowe, przeżywają prawdziwy rozkwit zainteresowania. Pojawia się coraz więcej doniesień naukowych poświęconych tym zjawiskom. Wzrost zainteresowania związany jest z pogłębieniem wiedzy na temat wpływu stresu na metabolizm drobnoustrojów wykorzystywanych w wielu gałęziach przemysłu, między innymi: w przemyśle fermentacyjnym, mleczarskim, farmaceutycznym, biotechnologicznym, chemicznym, tekstylnym i wielu innych. W przypadku organizmów jednokomórkowych warunki stresowe mogą być określane jako czynniki środowiska, które powodują hamowanie tempa wzrostu drobnoustrojów [30, 52, 66].

Odpowiedź organizmu na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego jest złożona i wymaga skoordynowanych mechanizmów percepcji, przekazywania oraz amplifikacji sygnału. Prowadzi to do zahamowania, bądź stymulacji ekspresji odpowiednich genów, zmian metabolizmu komórkowego oraz innych aspektów fizjologii. Drobnoustroje posiadają wiele mechanizmów umożliwiających przetrwanie w warunkach stresów środowiskowych [22]. Są one zależne od rodzaju

organizmu, na który stres oddziałuje, rodzaju działającego stresu, od jego intensywności, a także od tego czy dany stres występuje pojedynczo, czy synergistycznie z innym czynnikiem stresowym. Często występuje stres wieloczynnikowy, w którym nakładają się na siebie stresy jednoczynnikowe, mogące mieć negatywny wpływ na warunki fermentacji np. podczas produkcji bioetanolu [30]. Znaczącą rolę w odpowiedzi bakterii na stresy środowiskowe odgrywają system SOS, reakcja chemotaktyjna i odpowiedź ścisła (*stringent response*), polegająca na adaptacyjnej reakcji organizmu na zmiany w dostępie pożywienia (np. głód aminokwasowy) i inne stresy środowiskowe [18, 50].

W ochronę komórek przed działaniem stresów środowiskowych zaangażowany jest mechanizm genetyczny. U drożdży określono ok. 499 genów CER (*common environmental response*) – 216 indukowanych i 283 represjonowanych. Grupa genów indukowanych stresem dotyczy: metabolizmu węglowodanów, generowania energii, metabolizmu kwasów tłuszczowych, fałdowania i degradacji białek a także stresu komórkowego (białka szoku cieplnego, detoksyfikacja reaktywnych form tlenu, naprawa uszkodzeń DNA), podczas gdy geny represjonowane stresem powiązane są z procesami wzrostu, metabolizmem RNA, metabolizmem nukleotydów i białkami rybosomalnymi [30, 42].

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. 81 5375933; e-mail: [janek@poczta.umcs.lublin.pl](mailto:janek@poczta.umcs.lublin.pl)

Potencjalne korzyści wynikające ze wspólnej natury mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację komórki do różnorodnych zmian zachodzących w otoczeniu (np. ekspozycja komórki na warunki podwyższonego ciśnienia osmotycznego) może przygotować ją również do przetrwania w warunkach podwyższonej temperatury i odwrotnie. Wiele danych wskazuje, że mechanizm ten ma o wiele szerszy wymiar praktyczny, a tego typu zabieg adaptacyjny może pozwolić na zabezpieczenie komórki przed szerokim spektrum warunków stresowych [1, 48, 60]. Znajomość mechanizmów adaptacyjnych do określonych stresów może zminimalizować ich negatywne skutki, przez co zwiększyć wydajność określonych metabolitów. Ponadto poznanie genów ulegających aktywacji pod wpływem określonego bodźca stresowego może pozwolić na modyfikacje genetyczne bakterii, pod kątem ich zastosowań aplikacyjnych. Z pewnością wiedza dotycząca odpowiedzi komórkowej na poziomie genomu pozwoli usprawnić selekcję szczepów pod względem cech wrażliwości lub odporności na dany stres. W związku z tym coraz częściej mówi się o stosowaniu zabiegów adaptacji stresowej stającej się nowym, atrakcyjnym narzędziem w rękach biotechnologów [30].

Znajomość czynników warunkujących odpowiedzi drobnoustrojów chorobotwórczych na stres może mieć znaczenie w zapobieganiu lekooporności. Szlaki odpowiedzi komórek na warunki stresowe mogą być odpowiednimi celami dla interwencji terapeutycznej [52].

Wiele gałęzi przemysłu spożywczego wykorzystuje działalność wyselekcjonowanych drobnoustrojów. Szerokie zastosowanie, zwłaszcza w produkcji żywności fermentowanej, znajdują bakterie fermentacji mlekowej, które uznaje się za niezmiernie ważne dla zdrowia człowieka. Rozszerzenie zakresu badań odpowiedzi LAB na stres pozwala przeprowadzić kompleksową analizę wrażliwości bakterii na czynniki niekorzystne, wynikające z kryteriów stawianym bakteriom przeznaczonym do zastosowania przemysłowego i probiotycznego [46, 57].

Istnieje wiele badań dotyczących wpływu stresów abiotycznych na wydajność metabolitów syntetyzowanych przez mikroorganizmy (tab. II i III). Dotyczy to zarówno biosyntezy metabolitów pierwszorzędowych, takich jak aminokwasy [32, 67], drugorzędowych, np. enzymy [24–27, 43, 29, 31, 49, 60], drobnoustrojowe toksyny [19, 21, 63] i innych substancji np. karnityna [7], erytrytol [72], kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy [44], kwas poli- $\gamma$ -glutaminowy [68]. Czasami lepszy efekt można uzyskać stosując dwa lub więcej czynników stresowych równocześnie, np. w wyniku zastosowania szoku temperaturowego, osmotycznego i alkalicznego w hodowli *Bacillus licheniformis* zwiększono wydajność biosyntezy kwasu poli- $\gamma$ -glutaminowego o ok. 185% [68].

## 2. Stresy abiotyczne

Stresem abiotycznym nazywamy wszelkie czynniki nieożywione, które mogą powodować szkodliwe skutki dla mikroorganizmów. Do stresu abiotycznego możemy zaliczyć: stres temperaturowy (podwyższenie lub obniżenie temperatury), stres osmotyczny, stres oksydacyjny, stres pH (zasadowość lub kwasowość środowiska), stres mechaniczny, stres ciśnieniowy, stres pokarmowy, stres wynikający z akumulacji toksycznych metabolitów (np. stres etanolowy), stres synergistyczny (wieloczynnikowy).

### 2.1. Stres kwasowy

Bardzo istotnym czynnikiem środowiska warunkującym wzrost drobnoustrojów jest wartość stężenia jonów wodorowych wyrażona wartością pH. Nie może być ona, ani za niska, ani za wysoka. Optymalna wartość pH do wzrostu mikroorganizmów oscyluje wokół odczynu obojętnego. Do najbardziej opornych drobnoustrojów na ten rodzaj stresu należą termofilne archeony z rodzaju *Picrophilus*, które znoszą spadek pH nawet do zera. Z kolei za najbardziej wytrzymałe z pośród alkalofili uważa się bakterie *Clostridium paradoxum*, której górna granica tolerownego pH wynosi 11 i alkalofilną sinicę *Leptolyngbya nostocorum* rosnącą nawet przy pH 13. Niezależnie od tego, czy organizm występuje w środowisku silnie kwaśnym, czy silnie zasadowym, pH wewnątrz jego komórki zbliżone jest do obojętnego. Utrzymanie obojętnego odczynu cytoplazmy możliwe jest dzięki nieprzepuszczaniu jonów wodorowych do wnętrza komórki, a gdy istnieje taka potrzeba, jony wodorowe są natychmiast z niej wydalone. Jony wodorowe jak i wodorotlenowe, występujące w nadmiarze mogą doprowadzić do wielu zaburzeń metabolicznych. Nadmiar jonów wodorowych prowadzi do zaburzeń działania pomp protonowych, jak choćby syntazy ATP, która jest jednym z kluczowych enzymów dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Z kolei wysokie stężenie jonów wodorotlenowych może skutkować zahamowaniem syntezy białek i aktywności oddechowej. Powyższe przykłady dotyczą bezpośredniego wpływu odczynu środowiska na metabolizm drobnoustrojów, ale wartość pH środowiska może także pośrednio wpływać na żywotność organizmów. Wartość pH środowiska wpływa na stopień dysocjacji słabych zasad i słabych kwasów, które znajdują się w tym środowisku. Forma niedysocjowana może łatwiej przenikać do wnętrza komórek i powodować silne działanie toksyczne. Znajomość wpływu wartości pH na metabolizm i wzrost drobnoustrojów jest bardzo ważna w wielu gałęziach przemysłu, a w szczególności podczas procesu utrwalania żywności. Obniżenie pH

niektórych produktów może zmniejszyć możliwość ich zakażenia bakteryjną mikroflorą bez znaczących zmian w smaku tych produktów [40].

Stres kwasowy definiuje się jako łączny biologiczny efekt niskiego pH i słabych organicznych kwasów obecnych w środowisku. Słabe kwasy obejmują lotne kwasy tłuszczowe (VFAs) jak masłowy, propionowy i octowy wytworzone w następstwie fermentacji. Słabe kwasy w formie cząsteczkowej mogą dyfundować przez błonę komórkową i dysocjować wewnątrz komórki, obniżając wewnętrzną wartość pH (pHi). Przy obniżeniu zewnętrznej wartości pH (pHo), niedysocjowany słaby kwas będzie dyfundować przez membranę (oparty na wartości pKa) i wpływać na pHi. To oznacza, że wystarczy mniej kwasu organicznego do zabicia komórek przy pHo 3,5 niż przy pHo 4,4. Uważa się również, że wewnątrzkomórkowe nagromadzenie się słabych kwasów, oprócz zakwaszania, ma także negatywny wpływ na komórki [4].

W procesie fermentacji przy użyciu drożdży często ustalana wartość pH różni się od optymalnego dla wzrostu organizmu gospodarza. Wynika to z faktu większej ich stabilności i produktywności [58], albo zmniejszonej proteolizy [12]. Proces fermentacji przy niskich wartościach pH często jest stosowany przy produkcji białek rekombinowanych. Shi i wsp. [58] określili optimum pH dla biosyntezy przeciwciał w zakresie pH 7,5–8,0, który nie jest skorelowany z inhibicją proteazy ani z optimum wzrostu. W przeciwieństwie do tego kilku autorów stwierdziło znaczącą poprawę sekrecji produktu w pH ok. 3,0, która wynikała z zahamowania aktywności proteaz komórek gospodarza [15, 16, 36]. Efekt ten ma znaczenie jedynie w przypadku, gdy produkt jest wrażliwy na rozkład w wyniku hydrolizy. Dla produkcji heterologicznych białek przy użyciu

drożdży *Pichia pastoris* wielu badaczy sugeruje użycie niskich wartości pH (około 3,0) [12, 16, 36]. W typowych hodowlach z zasilaniem pożywki, drożdże równie dobrze rosną w pH około 5,0. Jednakże, Hohenblum i inni [34] wykazali, że przeżywalność komórek zmniejsza się drastycznie z chwilą, gdy wartość pH pożywki spada do pH 3,0 i wzrasta w dalszym etapie podczas przedłużającej się fermentacji, zależnie od czasu trwania stresu kwasowego. W tych warunkach obserwowano zmniejszoną produktywność i wydajność białka rekombinowanego, jako efekt znacznego i stałego przyrostu nieaktywnej metabolicznie biomasy. Z tego wynika, że optymalna wartość pH jest zależna od rodzaju wytwarzanego metabolitu, warunkując zarówno proces biosyntezy jak też jego stabilność, często zależną od proteolitycznej hydrolizy produktu. Jednakże, próba zapobieżenia proteolizie przy niskich wartościach pH jest kontrowersyjna, z uwagi na fakt zwiększonej śmierci komórek w środowisku kwaśnym i w konsekwencji wzrostu w płynie pohodowlanym uwolnionych proteaz w wyniku lizy komórek. Interesujące podejście dla uniknięcia tego problemu proponują Branduardi i wsp. [6], które polega na użyciu tolerancyjnych na stres kwasowy drożdży *Zygosaccharomyces bailii* posiadających system ekspresji białek aktywny przy niskich wartościach pH.

Drożdże wykształciły różne strategie umożliwiające im tolerancję stresu kwasowego [38, 39–51] (tab. I). Podczas gdy wiedza o molekularnym mechanizmie oporności na stres kwasowy (tolerancja pH) pozostaje fragmentaryczna, to jest oczywiste, że niektóre gatunki drożdży, jak te z rodzaju *Zygosaccharomyces* są bardziej tolerancyjne od innych [61]. Causton i wsp. [8] zidentyfikowali pięć genów u *Saccharomyces cerevisiae*, które są specyficznie regulowane zależnie od pH. Gen

Tabela I  
Wpływ warunków stresowych na odpowiedź metaboliczną drobnoustrojów

Rodzaj stresu	Czynnik wywołujący stres	Skutek działania stresu	Mechanizm ochrony komórki	Literatura
Stres osmotyczny	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Podwyższone stężenie soli w środowisku</li> <li>– Wysokie stężenie cukru lub etanolu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Zaburzenie równowagi jonowej</li> <li>– Spadek turgoru komórki</li> <li>– Zagęszczenie cytoplazmy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Osmotaksja</li> <li>– Transport lub wypływ jonów</li> <li>– Synteza i transport osmoprotektantów</li> <li>– Zmiana superskręcenia DNA</li> <li>– Osmotyczna regulacja ekspresji genów</li> <li>– Synteza tzw. związków zgodnych i osmogennych, np. glicerolu</li> <li>– Synteza trehalozy</li> <li>– Synteza białek Hsp</li> <li>– Obkurczenie komórki, zmniejszające powierzchnię, na którą działa stres</li> </ul>	[1, 11, 13, 14, 30, 33, 35, 41, 50, 53, 69]
Stres pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Spadek lub wzrost wartości pH poza zakres tolerancji mikroorganizmu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Zaburzenia działania pomp protonowych</li> <li>– Zahamowanie syntezy białek i aktywności oddechowej</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Nieprzepuszczanie jonów wodorowych do wnętrza komórki</li> <li>– Usuwanie nadmiaru jonów wodorowych na zewnątrz komórki</li> </ul>	[38 – 40, 51]

Tabela II

Wpływ warunków stresu pH (kwasowego/alkalicznego) na wydajność użytecznych metabolitów wytwarzanych przez drobnoustroje

Mikroorganizm	Czynnik stresu kwasowego	Produkt	Skutek działania stresu	Literatura
<i>P. pastoris</i>	Obniżenie pH podłoża z 5,5 do 3,0	Rekombinowany chymotrypsynogen B	Zahamowanie aktywności proteaz komórek gospodarza i wzrost produktywności białka z 2,1 na 5,3 mg/L/h	[15]
<i>P. pastoris</i>	Obniżenie pH podłoża z 5,0 do 4,0–3,0 Obniżenie pH z 5,0 na 4,0 i temp. z 30 na 22°C	Białko heterologiczne CBM-CALB	Wzrost stężenia białka w podłożu z 40 do 90%; 3,3-Krotny wzrost stężenia białka	[36]
<i>A. niger</i>	Inkubacja konidiów w pH 2 i 3	Katalaza	1,5 i 1,8-krotny wzrost wydajności biosyntezy enzymu	[26]
<i>C. pannorum</i>	1-h inkubacja grzybni w pH 2 i 10	Werbenol i werbenon	1,4 i 1,5-krotny przyrost wydajności terpenoidów w przeliczeniu na 1 g biomasy w procesie biokonwersji $\alpha$ -pinenu	[64]
<i>B. licheniformis</i>	Stres alkaliczny; pH pożywki hodowlanej – 8,5	Kwas poli- $\gamma$ -glutaminowy	Wyższa o 133% wydajność produktu (23,63 g/L), w stosunku do kontroli o pH 7; 5,4-Krotny wzrost ekspresji genu syntetazy <i>PgsC</i>	[68]
<i>Y. lipolytica</i> 212	Obniżenie pH z 4,5 na 3,5 – na początku fazy produkcji kwasu, między 72 a 144 h (po końcowej fazie wzrostu)	Kwas $\alpha$ -ketoglutazarowy	1,7-Krotny wzrost wydajności produkcji	[44]

PDR12, kodujący transporter błonowy zależny ATP, jest indukowany przy niskich i hamowany przy wysokich wartościach pH. Istnieją różnice w fizjologicznej odpowiedzi drożdży na słaby stres kwasowy między różnymi gatunkami drożdży, np. *S. cerevisiae* gromadzi w tych warunkach trehalozę, co wiąże się faktem ich dodatkowej oporności na stres osmotyczny. Tego typu zjawisko nie występuje jednak u drożdży *Z. bailii* [9].

Chociaż istnieje wiele danych na temat mechanizmów regulacji w odpowiedzi na stres pH, niewiele z nich jednak dotyczy wytwarzania ważnych metabolitów w warunkach stresu kwasowego [37] (tab. I, II). Wymierne efekty w tym względzie obserwowano w procesie biosyntezy enzymów. W procesie fermentacji glukonowej przy użyciu *Aspergillus niger* w warunkach stabilizacji odczynu środowiska hodowlanego przy użyciu węgla wapnia na poziomie pH 5–6,5 fermentacja przebiega w kierunku wytwarzania kwasu glukonowego z uwagi na stabilność oksydazy glukozowej przy tych wartościach pH. Brak neutralizacji podłoża powoduje wzrost jego kwasowości, która może osiągnąć poziom ok. pH = 2,0, co jest przyczyną inaktywacji oksydazy glukozowej [3, 27, 31]. Często stosowane podłoża do biosyntezy tego enzymu są słabo zbuforowane. W podłożu o końcowej wartości pH 5,7, aktywność oksydazy glukozowej była 18-krotnie wyższa w porównaniu z jej wartością w pH 3,7 [27]. Niska wartość pH podłoża powoduje zahamowanie wytwarzania kwasu glukonowego i zwiększenie wydajności kwasu cytrynowego [23].

W podobnych badaniach konidia *A. niger* AM-11 inkubowano w warunkach stresu kwasowego (pH 2 i 3,

oraz pH 7 i 8 w ciągu 12 godzin). Najwyższą aktywność katalazy uzyskano w hodowli tego grzyba, którego konidia poddano stresowi kwasowemu w pH 2 i 3, co umożliwiło uzyskanie przyrostu aktywności tego enzymu odpowiednio, 1,8 i 1,5-krotnie w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [26]. W tych warunkach przyczyną wzrostu aktywności katalazy prawdopodobnie był nieznaczny spadek wewnątrzkomórkowego pH, który pociągał za sobą aktywację cykazy adenylowej i w konsekwencji wzrost poziomu cAMP [20].

Yáñez i wsp. [71] wykazali zahamowanie rozwoju *Lactobacillus rhamnosus* i produkcji mlecza przez komórki poddane stresowi kwasowemu [71]. Obniżenie wydajności mlecza w wyniku toksycznego stresu kwasowego jest wynikiem spadku żywotności komórek, a nie pośrednim efektem wpływu na metabolizm mlecza [71].

Aktywniejszą formę biokatalizatora w postaci grzybni *Chrysosporium pannorum* dla procesu biotransformacji  $\alpha$ -pinenu uzyskano przez poddanie jej działaniu stresu kwasowego. W tym celu trzydniową hodowlę tego grzyba inkubowano w środowisku o pH 2,0 i 10,0 w ciągu 1 godziny. Wykorzystanie takiej grzybni w procesie biotransformacji umożliwiło znaczący przyrost wydajności głównych produktów. Po stresie w pH 2,0 i pH 10,0 aktywność grzybni *C. pannorum* wzrosła odpowiednio 1,4 oraz 1,5-krotnie, w porównaniu do grzybni kontrolnej (pH 5,6) nie poddanej stresowi. Podobną wydajność (1,5-krotny przyrost w przeliczeniu na 1 g biomasy) otrzymano dla głównych produk-



tów biotransformacji tj. *trans*-werbenolu i werbenonu. Na uwagę zasługuje fakt, że stresy abiotyczne mogą zwiększyć zarówno wydajność powstających produktów biotransformacji, jak też stwarzają możliwość otrzymania nowych. Może świadczyć o tym fakt znacznego wzrostu koncentracji *trans*-pinokarweolu osiągnięty z wykorzystaniem jednego z rozpuszczalników organicznych np. dioksanu, etanolu lub chloroformu jako czynnika stresowego, któremu towarzyszył równoczesny spadek stężenia głównych produktów reakcji [64].

Singh i wsp., [59] badając wpływ zmian w kwasowości środowiska na drożdże *S. cerevisiae* stwierdzili wzrost stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidowej, który spowodował obniżenie płynności dwuwarstwy lipidowej. Turk i wsp. [65] sugerują, że zahamowanie szybkości podziału komórek *Debaryomyces hansenii* może być efektem zwiększenia sztywności błony komórkowej. Autorzy wykazali, że podczas adaptacji drożdży do zmian kwasowości środowiska w czasie ich inkubacji w pH alkalicznym lub kwasowym, wydłużał się czas generacji komórek. Jednakże znacznie większy skutek występował w warunkach stresu kwasowego [65].

## 2.2. Stres osmotyczny

Drobnoustroje w różnym stopniu adoptowały się do zmian środowiska osmotycznego. Maksymalne, tolerowane przez większość bakterii stężenie NaCl w środowisku wynosi ok. 0.7 M. Wyższe stężenia tolerują tylko gatunki halofilne.

Stres osmotyczny może być generowany przez:

- a) cukry – szczególnie wtedy, gdy mamy do czynienia z dużą gęstością zacieru. VHG (*very high gravity*) to technologia, w której stosuje się zacierzy zawierające nawet do 40% suchej substancji;
- b) etanol – gdy stężenie cukrów utrzymywane jest na niskim poziomie etanol jest głównym czynnikiem generującym stres osmotyczny w zacierze. Silniej zwiększa ciśnienie osmotyczne od cukrów, ponieważ ma mniejszą masę cząsteczkową;
- c) sole mineralne – akumulowane sole mineralne w wyniku recyrkulacji frakcji ciekłej w zacierach stanowią poważne zagrożenie dla komórek drożdżowych [30].

Drobnoustroje, aby mogły rosnąć, muszą być spełnione dwa warunki. Po pierwsze musi być zapewniony turgor w komórce, po drugie, cytoplazma (jej gęstość i skład jonów) musi stwarzać określone środowisko, pozwalające na stabilizację aktywności białek – w tym enzymów. Stres osmotyczny są to warunki, w których następuje zwiększenie lub zmniejszenie ciśnienia osmotycznego w środowisku w stosunku do fizjologicznego ciśnienia komórki. Wywołuje on wiele różnych odpowiedzi komórki, między innymi:

- osmotaksje – bakterie na zmiany osmotyczne środowiska reagują ruchem. Wzrost osmolarności podłoża oraz podwyższona temperatura powodują odwracalne zahamowania syntezy flagelin;
- transport lub wypływ jonów;
- transport osmoprotektantów;
- zmianę superskręcenia DNA;
- osmotyczną regulację ekspresji genów.

Mechanizmy odpowiedzi bakterii na działanie stresu osmotycznego przedstawiono w pracach przeglądowych: [35, 41 i 50] (tab. I).

Działanie stresu hiperosmotycznego powoduje akumulowanie jonów potasu, które zapewniają odpowiednie ciśnienie turgoru. Stężenie  $K^+$  we wnętrzu komórek jest proporcjonalne do osmolarności środowiska. Aktywność osmotyczna jonów  $K^+$  jest bardzo duża, porównywalna z aktywnością  $K^+$  w wolnym roztworze. Dotyczy to tylko jonów potasu, które są związane z niskocząsteczkowymi anionami. Jony potasu związane z białkami albo DNA cechują się słabą aktywnością. Poziom  $K^+$  w komórkach *Escherichia coli* utrzymywany jest dzięki dwóm systemom transportu: trk oraz kdp. System trk cechuje umiarkowane powinowactwo do  $K^+$ , natomiast system kdp posiada duże powinowactwo i działa tylko wtedy, gdy system trk nie jest w stanie zapewnić komórce odpowiedniego stężenia jonów potasowych. ATP-zależny system trk odgrywa szczególną rolę w przeciwdziałaniu skutkom stresu osmotycznego [35].

W badaniach drożdży *S. cerevisiae* wykazano, że nadekspresja genu HAL1 zwiększa tolerancję na NaCl poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu i zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu [55]. Odpowiedź drożdży na stres osmotyczny jest ściśle zależna od temperatury wzrostu. W warunkach szoku cieplnego, czas aktywacji szlaku HOG (*high osmolarity glicerol*), aktywowanego w stresie hiperosmotycznym, jest krótki. Konsekwentnie, w podwyższonej temperaturze, w stresie hiperosmotycznym, drożdże akumulują znacznie mniej glicerolu. Stwierdzono ponadto dodatkowe funkcje glicerolu w adaptacji drożdży na stres osmotyczny. Zmiany w jego stężeniu mogą warunkować aktywację szlaków przekazywania sygnałów komórkowych w warunkach stresowych. Istnieje zależność między metabolizmem glicerolu w komórce, a prawidłowym funkcjonowaniem ściany komórkowej drożdży [2, 70].

Drobnoustroje syntetyzują również tzw. związki zgodne – niektóre z nich są akumulowane w procesie adaptacji do stresu osmotycznego, jaki wywiera środowisko. Nie powodują znacznej zmiany w szybkości wzrostu bakterii, należą do nich: jony potasu, glutaminian,  $\gamma$ -aminomasłan i trehaloza. Trehaloza uwalniana podczas stresu osmotycznego akumulowana jest w cytoplazmie i ma za zadanie ochronę komórek

przed jego zgubnym wpływem. W warunkach stresu zewnętrzna trehaloza może stanowić dodatkowe źródło węgla dla bakterii *E. coli*. Jest ona rozkładana przez trehalazę do glukozy, która jest następnie transportowana do komórki bakteryjnej. Trehalaza może także indukować własny system transportu. Trehalaza w tym wypadku pełni funkcję osmoprotektanta. Związki zgodne, które mogą stymulować wzrost nazywamy osmoprotektantami, należą do nich prolina, betaina glicynowa oraz cholina [14, 35].

Stres osmotyczny może zmieniać stopień superskręcenia DNA, który wpływa na transkrypcję wielu genów. Czynnikiem mającym wpływ na superskręcenie DNA może być nagła zmiana stosunku ATP do ADP [35]. Ilość dostępnej wody w środowisku mikroorganizmów wpływa na wzrost, oddychanie, syntezę enzymu, sporulację i inne fizjologiczne funkcje [63]. Odpowiedzi komórek na środowiska o zmniejszonej aktywności wody ( $a_w$ ) został opisany w pracach wielu autorów [11, 13, 14, 33, 35, 41, 53, 69].

Zmiany energetyczne w komórce są bardzo ważne i wpływają na wiele procesów metabolicznych. Komórki drożdży *S. cerevisiae* traktowano 0,7 M NaCl. W tych warunkach ponad 150 białek wykazało przejściowe zmiany w modelu ekspresji. Spośród tej znacznej liczby białek, 18 wykazało 8-krotny wzrost tempa syntezy. Jednym z nich było białko Hsp104p. Badania te sugerują, że w wyniku działania stresu osmotycznego następuje wzmożona synteza białek szoku cieplnego – Hsp. Świadczy to o prawdopodobnym powiązaniu szlaków odpowiedzi komórek na oba rodzaje stresów. Niektóre z tych białek mają za zadanie np. usztywniać ścianę komórkową [1]. Istnienie relacji pomiędzy obydwoma rodzajami stresów potwierdzają również inne badania. W doświadczeniach japońskich naukowców wykorzystano nową metodę skriningu szczepów produkujących duże ilości glicerolu, w tym celu poddawano drożdże szokowi cieplnemu. W ten sposób otrzymano mutanty produkujące dużo większe ilości glicerolu niż komórki rodzicielskie [48]. Drożdże oprócz zagęszczenia cytoplazmy syntetyzują związki osmogenne np. glicerol, którego zadaniem jest zwiększenie turgoru komórki. Wykazano, że stężenie glicerolu i trehalozy w komórkach jest najwyższe w 0,75 M NaCl i temperaturze 44°C [30]. Strategie gromadzenia glicerolu w odpowiedzi na szok osmotyczny różnią się w znacznym stopniu od gatunku drożdży. Najważniejszą drogą akumulacji glicerolu przez *S. cerevisiae* w warunkach stresu osmotycznego jest wzrost tempa jego produkcji. Za stymulację syntezy glicerolu podczas stresu osmotycznego jest odpowiedzialny szlak HOG [48]. Komórki inkubowane w pożywce zawierającej 0,7 M NaCl przez 40 min. produkowały trzy razy więcej glicerolu, w porównaniu z komórkami pozbawionymi oddziaływania szoku osmotycznego. Kluczowym enzymem biorącym udział

w tworzeniu glicerolu jest NAD-zależna dehydrogenaza 3-fosfoglicerolu (ctGPD). Aktywność tego enzymu wzrasta ok. 6-krotnie w warunkach inkubowania komórek w 0,7 M NaCl przez 60 min. [45].

Nasilenie stresu osmotycznego zależy również od rodzaju substancji osmoaktywnej. Hiszpańscy naukowcy porównali tolerancję drożdży *Candida tropicalis* i *S. cerevisiae* na szok osmotyczny wywołany przez  $\text{Na}^+$  i  $\text{Li}^+$ . *C. tropicalis* wykazały lepszą do nich adaptację i utrzymywały wyższy wewnątrzkomórkowy stosunek jonów  $\text{K}^+$  do  $\text{Na}^+$  i  $\text{Li}^+$  niż *S. cerevisiae*, w podłożu z glukozą. Jednakże *C. tropicalis* charakteryzowały się słabszą adaptacją na stres osmotyczny (wywołany przez KCl i sorbitol) i wytwarzały mniejszą ilość glicerolu w porównaniu do *S. cerevisiae*. W podłożach z galaktozą, która nie powoduje represji jako źródło węgla, *S. cerevisiae* syntetyzowały obniżoną zawartość glicerolu i wykazały zwiększoną wrażliwość na stres osmotyczny. W tych warunkach drożdże te wykorzystywały trehalozę jako istotniejszy czynnik osmoregulacyjny (osmolit) niż glicerol. Wyniki tych badań sugerują, że tolerancja drożdży na szok osmotyczny i toksyczność jonów oraz związana z nimi synteza osmolitów i transport kationów modulowane są przez kontrolę kataboliczną wywołaną przez glukozę [28].

Stres osmotyczny nie musi być kojarzony tylko z ujemnymi skutkami. Okazuje się, że może być on przydatny do syntezy wielu użytecznych metabolitów (tab. III), w tym leków. Meksykańscy naukowcy wykorzystali szok osmotyczny do ekstrakcji aminohydrolazy penicyliny – PA (EC: 3.5.1.11) z komórek *E. coli*. PA jest używana do produkcji kwasu 6-aminopenicylinowego (6-APA), ważnego intermediatu w produkcji półsyntetycznej penicyliny. Komórki *E. coli* były wystawiane na wysokie stężenie sacharozy, przez co następował wzrost ciśnienia osmotycznego, następnie wirowano je i zatrzymywano działanie stresu osmotycznego poprzez dodanie do wody. Stres osmotyczny indukował uwalnianie materiału cytoplazmatycznego. Uwolnione cytoplazmatyczne białka odseparowano przez wirowanie zdeintegrowanych komórek. W tych doświadczeniach stres osmotyczny został użyty do częściowego oczyszczenia PA, która następnie została wykorzystana w przemysłowej produkcji 6-APA [56].

Wiele podłoży dla hodowli drobnoustrojowych ma  $a_w$  powyżej 0,90. Ocena wpływu  $a_w$  na wzrost mikroorganizmów wykazała, że maksymalny jego poziom i nadprodukcja metabolitów często obserwowano przy  $a_w$  w granicach od 0,9 do 1,0. Bakterie kwasu mlekowego wykazały 10-krotny przyrost biosyntezy diacetylu, kiedy obniżono  $a_w$  do poziomu 0,95 [62]. W fermentacji etanolowej prowadzonej przy użyciu *S. cerevisiae*, zużycie substratu i biosynteza glicerolu są wyższe przy  $a_w$  0,971 niż przy 0,994. Obniżenie  $a_w$  poniżej 0,990, zazwyczaj zmniejsza tempo wzrostu i koncentracji

Tabela III  
Wpływ warunków stresu osmotycznego na wydajność użytecznych metabolitów wytwarzanych przez drobnoustroje

Mikro-organizm	Czynnik stresu osmotycznego	Produkt	Skutek działania stresu	Literatura
<i>E. coli</i>	Wysokie (22,1%) stężenie sacharozy +1,47% EDTA, odwirowanie i przeniesienie komórek do r-ru H <sub>2</sub> O	Aminohydrolaza penicyliny	Indukcja wzmożonego uwalniania białek cytoplazmatycznych; 85,6% wydajność ekstrakcji enzymu z komórek	[56]
<i>E. coli</i>	10-min wytrząsanie komórek w r-rze hipertonicznym (18% sacharoza) i następnie w r-rze hipotonicznym (zimna H <sub>2</sub> O, 4°C)	Rekombinowany ludzki interferon- $\alpha$ 2b	Zwiększenie uwalniania białka peryplazmatycznego z $452,9 \times 10^{-6}$ (dla 2,5% sacharozy) do $2472,5 \times 10^{-6}$ mg/g (dla 25% sacharozy)	[54]
<i>P. notatum</i>	Podwyższone do 0,4 M stężenie NaCl w podłożu hodowlanym; 1-h inkubacja wyhodowanej grzybni w 0,4 M roztworze NaCl w pH 6	$\beta$ -Galaktozydaza	1,6-Krotny wzrost aktywności enzymu w stosunku do podłoża bez NaCl; 1,9-Krotny wzrost sekrecji enzymu do podłoża	[25]
<i>S. cerevisiae</i>	40 min inkubacja komórek w pożywce z 0,7 M NaCl	Glicerol	3-Krotny wzrost biosyntezy glicerolu	[48]
<i>A. niger</i>	Dodanie 1,2 M NaCl do 6-h hodowli konidiów grzyba	Katalaza	2,8-Krotny przyrost aktywności enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego	[26]
<i>A. niger</i>	Zawieszenie 72-h grzybni w środowisku 1,2 M NaCl w pH 6,0 (przez 2 h)	Oksydaza glukozowa	Zwiększenie sekrecji enzymu do podłoża i 2,1-krotny przyrost aktywności w porównaniu z kontrolą	[24]
<i>E. coli</i> BW25993	Jonowy 0,6 M NaCl (1,2 Osm) oraz niejonowy – 1,2 M sacharoza, 2-h stres wobec komórek w fazie wzrostu logarytmicznego	$\beta$ -galaktozydaza	3,6-Krotny wzrost aktywności enzymu w porównaniu z podłożem bez NaCl. 1,2-Krotny wzrost produkcji enzymu po zwiększeniu osmolarności z 0,6 na 1,2 Osm	[10]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Wzrost ciśnienia osmotycznego z 0,68 do 3,21 osmol/kg wraz ze wzrostem stężenia glicerolu z 5 do 20%; Dalszy wzrost ciśnienia osmotycznego do 4,92 osmol/kg w wyniku dodatku NaCl w stężeniu 50 g/L (przy 20% stężeniu glicerolu)	Erytrytol	25-Krotny wzrost wydajności erytrytolu oraz wzrost stosunku erytrytol/mannitol (z 0,14 do 1,11) w procesie biokonwersji glicerolu; Dalszy, 10-krotny wzrost współczynnika wydajności erytrytol/mannitol (do 11,0); wzrost wydajności erytrytolu o 57,5%	[72]
<i>E. coli</i> O44 K74 – komórki spoczynkowe	Dodatek 0,5 M NaCl do 50 mM buforu fosforanowego o pH = 7,5, zawierającego zawieszony spoczynkowe komórki i krotonobetainę jako substrat. Inkubacja w bioreaktorze przez 72 h w temp. 37°C	L-karnityna (osmoprotektant)	1,7-Krotny wzrost wydajności produkcji (z 40 na 68,5 %) karnityny w procesie biotransformacji krotonobetainy w porównaniu z kontrolą bez NaCl; spadek współczynnika dehydrogenaza/liaza izocytrynianowa z 8 do 2,5 i wzrost współczynnika fosfotransferaza/syntetaza acetylo-CoA z 2,1 na 5,2	[7]

biomasy [47]. Dane dotyczące wpływu stresu osmotycznego na syntezę i sekrecję enzymów nie są jednoznaczne [5, 17, 29, 43]. Szczep grzyba *Penicillium notatum* hodowany w warunkach stresu osmotycznego (0,4 M NaCl) charakteryzował się zwiększoną aktywnością  $\beta$ -galaktozydazy, która znacznie wzrosła (około 1,6-krotnie) wraz ze zwiększaniem stężenia NaCl. W tych warunkach wzrost biomasy był hamowany. W celu zwiększenia sekrecji  $\beta$ -galaktozydazy zlokalizowanej w przestrzeni peryplazmatycznej, 72-godz. grzybnię zawieszono w roztworze NaCl (0,2–1,6 M) w środowisku o pH 3,0–7,0. Najwyższą aktywność  $\beta$ -galaktozydazy uzyskano w środowisku 0,4 M NaCl w pH 6,0, co umożliwiło uzyskanie 1,9-krotnego przyro-

stu aktywności tego enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [25]. W podobnych badaniach konidia *A. niger* hodowano w warunkach stresu osmotycznego. Najwyższą aktywność katalazy uzyskano po dodaniu do 6-godz. hodowli tego grzyba 1,2 M NaCl, co umożliwiło uzyskanie 2,8-krotny przyrost aktywności tego enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego. Aktywność oddechowa grzybni *A. niger* wykazała istotne zahamowanie wraz ze wzrostem stresu osmotycznego [26]. Cheung i wsp. [10] badali, wpływ stresu osmotycznego zarówno jonowego i niejonowego (przy użyciu sacharozy) na wytwarzanie  $\beta$ -galaktozydazy. Znaczący, ponad 3,6-krotny przyrost aktywności enzymu w porównaniu



z kontrolą uzyskali w warunkach stresu NaCl. Był to 3-krotnie wyższy wzrost produkcji  $\beta$ -galaktozydazy, niż w przypadku stresu niejonowego. Zwiększona biosynteza tego enzymu była prawdopodobnie efektem wzmożonej syntezy cAMP.

Zdecydowana większość oksydazy glukozywej wytwarzanej przez *A. niger* związana jest ze strukturami wewnątrzkomórkowymi komórki, dlatego też istotnym zagadnieniem z biotechnologicznego punktu widzenia jest opracowanie efektywnej metody ekstrakcji tego enzymu. W celu zwiększenia sekrecji oksydazy glukozywej zlokalizowanej w przestrzeni peryplazmatycznej, 72-godz. grzybnię zawieszano w środowisku NaCl (0,4–2,8 M). Najwyższą aktywność oksydazy glukozywej uzyskano w środowisku 1,2 M NaCl w pH 6,0, dzięki czemu uzyskano 2,1-krotny przyrost aktywności tego enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [24].

### 3. Podsumowanie

Drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów oporności na stres i wszystkie te przystosowania mają określone cechy wspólne. Zatem można przypuszczać, że niektóre z nich ewoluowały z jednego mechanizmu oporności, który wraz z pojawianiem się nowych czynników stresowych ulegał drobnym zmianom. Możliwe, że z tego powodu, synteza trehalozy lub białek Hsp jest indukowana przez kilka różnych rodzajów stresów. Podobna natura mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację drobnoustrojów do określonych stresów często może pozwolić na zabezpieczenie komórki przed szerokim spektrum warunków stresowych. Poznanie mechanizmów adaptacyjnych do określonych stresów może zminimalizować ich negatywne skutki, a nawet przyczynić się do zwiększenia wydajności syntetyzowanych przez drobnoustroje ważnych metabolitów. Z pewnością znajomość odpowiedzi komórkowej na poziomie genomu umożliwi usprawnienie selekcji szczepów pod względem cech wrażliwości lub oporności na dany stres. Może też mieć znaczenie w zapobieganiu lekooporności, gdy szlaki odpowiedzi komórek na warunki stresowe będą odpowiednimi celami dla interwencji terapeutycznej.

### Piśmiennictwo

1. Akhtar N., Blomberg A., Adler L.: Osmoregulation and protein expression in a pbs2delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to hypersaline stress. *FEBS Lett.* **403**, 173–180 (1997)
2. Alonso-Monge R., Real E., Wojda I., Bebelman J.P., Mager W.H., Siderius M.: Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Mol. Microbiol.* **41**, 717–730 (2001)
3. Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C., Rehm H.J.: Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Bioeng.* **91**, 494–501 (2005)
4. Bearson S., Bearson B., Foster J.W.: Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**, 173–180 (1997)
5. Bobowicz-Lassociska T., Grajek W.: Changes in protein secretion of *Aspergillus niger* caused by the reduction of the water activity by potassium chloride. *Acta Biotechnol.* **15**, 277–287 (1995)
6. Branduardi P., Valli M., Brambilla L., Sauer M., Alberghina L., Porro D.: The yeast *Zygosaccharomyces bailii*: a new host for heterologous protein production, secretion and for metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **4**, 493–504 (2004)
7. Cánovas M., Bernal V., Sevilla A., Iborra J.L.: Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 722–37 (2007)
8. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A.: Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 323–337 (2001)
9. Cheng L., Moghraby J., Piper P.W.: Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 89–95 (1999)
10. Cheung C., Lee J., Lee J., Shevchuk O.: The effect of ionic (NaCl) and non-ionic (sucrose) osmotic stress on the expression of  $\beta$ -galactosidase in wild type *E. coli* BW25993 and in the isogenic BW25993  $\Delta$  lacI mutant. *J. Exp. Microbiol. Immunol. (JEMI)*, **13**, 1–6 (2009)
11. Cochet N., Demain L.: Effect of water activity on production of  $\beta$ -lactam antibiotics by *Streptomyces clavuligerus* in submerged culture. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 333–337 (1996)
12. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R.: Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**, 23–52 (2000)
13. Csonka L.N., Hanson A.D.: Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569–606 (1991)
14. Csonka L.N.: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147 (1989)
15. Curvers S., Brixius P., Klauser T., Thömmes J., Weuster-Botz D., Takors R., Wandrey C.: Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. *Ferm. Biotechnol. Prog.* **17**, 495–502 (2001)
16. Curvers S., Linnemann J., Klauser T., Wandrey C., Takors R.: Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation – Kinetic analysis of growth and product formation. *Eng. Life Sci.* **2**, 229–235 (2002)
17. Davis L.L., Baudoin A.M.: Effect of osmotic potential on synthesis and secretion of polygalacturonase and cellulase by *Geotrichum candidum*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 138–141 (1987)
18. Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A.: Odpowiedź ścisła – mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe. *Post. Biochem.* **52**, 87–93 (2006)
19. Doughari J.H., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S.: Effect of oxidative and temperature stress on viability and toxin production of environmental isolates of *Escherichia coli*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 264–275 (2012)
20. Erazo P., Mazon M.J., Gancedo J.M.: Internal acidification and c-AMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **165**, 671–674 (1987)
21. Errera R.M., Campbell L.: Osmotic stress triggers toxin production by the dinoflagellate *Karenia brevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10597–10601 (2011)



22. Feehily C., Karatzas K.A.: Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 11–24 (2013)
23. Fiedurek J.: Podstawy wybranych procesów biotechnologicznych. Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2004
24. Fiedurek J.: Effect of osmotic stress on glucose oxidase production and secretion by *Aspergillus niger*. *J. Basic Microbiol.* **38**, 107–112 (1998)
25. Fiedurek J.: Enhancement of  $\beta$ -galactosidase production and secretion by high osmotic stress in *Penicillium notatum*. *Microbiol. Res.* **153**, 65–69 (1998)
26. Fiedurek J.: Production of *Aspergillus niger* catalase under various stress conditions. *Acta Microbiol. Polon.* **49**, 43–49 (2000)
27. Fiedurek J.: Wytwarzanie oksydazy glukozy przez *Aspergillus niger*. Rozprawa habilitacyjna Wydz. BiNoZ, XLVI, Wyd. UMCS, Lublin, (1992)
28. García M.J., Ríos G., Ali R., Bellés J.M., Serrano R.: Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **143**, 1125–1131 (1997)
29. Grajek W., Gervais P.: Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 658–662 (1987)
30. Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji alkoholowej. *Biotechnologia*, **3**, 46–63 (2008)
31. Gromada A., Fiedurek J.: Influence of medium components and metabolic inhibitors on glucose oxidase production. *Acta Microbiol. Polon.* **45**, 37–43 (1996)
32. Guillouet S., Engasser J.: Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 496–500 (1995)
33. Hahn-Hagerdal B.: Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 322–327 (1986)
34. Hohenblum H., Borth N., Mattanovich D.: Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *J. Biotechnol.* **102**, 281–290 (2003)
35. Hrebenda J.: Odpowiedzi bakterii na działanie stresu osmotycznego. *Post. Mikrobiol.* **33**, 31–53 (1994)
36. Jahic M., Gustavsson M., Jansen A.K., Martinelle M., Enfors S.O.: Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J. Biotechnol.* **102**, 45–53 (2003)
37. Kapteyn J.C., ter Riet B., Vink E., Blad S., de Nobel H., van den Ende H., Klis F.M.: Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* **39**, 469–479 (2001)
38. Krebs H.A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya F.: Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* **214**, 657–663 (1983)
39. Kren A., Mamnun Y.M., Bauer B.E., Schüller C., Wolfger H., Hatzixanthis K., Mollapour M., Gregori C., Piper P., Kuchler K.: War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1775–1785 (2003)
40. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna. PWN, Warszawa, 2008
41. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Targońska M., Kalita M., Gnat S.: Osmoadaptacja i systemy transportu potasu w bakteriach Gram-ujemnych. *Post. Mikrobiol.* **51**, 93–98 (2012)
42. Mattanovich D., Gasser B., Hohenblum H., Sauer M.: Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* **113**, 121–135 (2004)
43. Mildenhall P., Prior B.A., Trollope L.A.: Water relations of *Erwinia chrysanthemi*: growth and extracellular pectic acid lyase production. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 27–34 (1981)
44. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A.: Enhanced  $\alpha$ -ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8711–8718 (2013)
45. Nevoigt E., Stahl U.: Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **3**, 231–241 (1997)
46. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – stadium vbnc. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **5**, 15–28 (2013)
47. Olz R., Larsson K., Adler L., Gustafsson L.: Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat under NaCl stress. *J. Bacteriol.* **175**, 2205–2213 (1993)
48. Omori T., Kiyoshi O., Umemoto Y., Yuki K., Kajihara Y., Shimoda M., Wada H.: Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 187–190 (1996)
49. Pandey A., Ashakumary L., Selvakumar P., Vijayalakshmi K.S.: Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 485–486 (1994)
50. Piecuch A., Obląk E.: Mechanizmy oporności drożdży na stres środowiskowy. *Post. Hig. Med. Dosw.* (online). **67**, 238–254 (2013)
51. Piper P., Calderon C.O., Hatzixanthis K., Mollapour M.: Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol.* **147**, 2635–2642 (2001)
52. Poole K.: Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2069–2089 (2012)
53. Purvis J.E., Yomano L.P., Ingram L.O.: Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3761–3769 (2005)
54. Ramanan R.N., Tan J.S., Mohamed M.S., Ling T.C., Tey B.T., Ariff A.B.: Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- $\alpha$ 2b from *Escherichia coli* using response surface method. *Process Biochem.* **45**, 196–202 (2010)
55. Ríos G., Ferrando A., Serrano R.: Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 515–528 (1997)
56. Rodríguez M., Güereca L., Valle F., Quintero R., López-Munguía A.: Penicillin acylase extraction by osmotic shock. *Proc. Biochem.* **27**, 217–223 (1992)
57. Serrazanetti D.I., Guerzoni M.E., Corsetti A., Vogel R.F.: Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol.* **26**, 700–711 (2009)
58. Shi X., Karkut T., Chamankhah M., Alting-Mees M., Hemmingsson S.M., Hegedus D.: Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* **28**, 321–330 (2003)
59. Singh B., Oberoi G.K., Sharma S.C.: Effect of pH stress on lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ind. J. Exp. Biol.* **28**, 430–433 (1990)
60. Skowronek M., Fiedurek J.: Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 686–692 (2003)
61. Sousa M.J., Miranda L., Côte-Real M., Leão C.: Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acid environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3152–3157 (1996)

62. Troller J.A., Stinson J.V.: Moisture requirements for growth and metabolite production by lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* **42**, 682–687 (1981)
63. Troller J.A.: Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technol.* **29**, 76–82 (1980)
64. Trytek M., Fiedurek J., Gromada A.: Effect of some abiotic stresses on the biotransformation of  $\alpha$ -pinene by a psychrotrophic *Chrysosporium pannorum*. *Biochem. Eng. J.* w druku (2016)
65. Turk M., Montiel V., Zigon D., Plemenitas A., Ramos J.: Plasma composition of *Debariomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiol.* **153**, 3586–3592 (2007)
66. Turkiewicz M.: Drobnoustroje psychrofilne i ich biotechnologiczny potencjał. *Kosmos*, **273**, 307–320 (2006)
67. Varela C.A., Baez M.E., Agosin E.: Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4222–4229 (2004)
68. Wei X., Tian G., Ji Z., Chen S.: A new strategy for enhancement of poly- $\gamma$ -glutamic acid production by multiple physicochemical stresses in *Bacillus licheniformis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 709–713 (2015)
69. Witter L.D., Anderson C.B.: Osmoregulation by microorganisms at reduced water activity ( $w$ ) Food microbiology, vol. I. Concepts in physiology and metabolism, red. T.J. Montville, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987, s. 1–34
70. Wojda I., Alonso-Monge R., Bebelman J.P., Mager W.H., Siderius M.: Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology*, **149**, 1193–1204 (2003)
71. Yáñez R., Marques S., Gírio F.M., Roseiro J.C.: The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. *Process Biochem.* **43**, 356–361 (2008)
72. Yang L.B., Zhan X.B., Zheng Z.Y., Wu J.R., Gao M.J., Lin C.C.: A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresour Technol.* **151**, 120–127 (2014)