

Problematika kvasničných kultur v pivovarském průmyslu*)

ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, ČSAV, Chemický ústav SAV, Bratislava

663.13

Množství prací, stále se objevujících v odborných pivovarsko-sladařských časopisech dokazuje, jak je problematika pivovarských kvasinek stále živým předmětem výzkumu. Potvrzují to také četné přednášky na různých mezinárodních sjezdech a symposiích. Tato problematika je palčivou nejen v zemích, kde technologický postup není ještě tak jednostranně usměrněn jako při spodním pivovarském kvašení, ale je o ni zájem všeobecný. Dokladem toho je také u nás mnoho dotazů a požadavků na nové čisté kultury. Tento příspěvek, který se zabývá uvedenou problematikou je rozdělen na dvě části. První část je věnována výsledkům ve výzkumu kvasinek za poslední léta ve světovém měřítku, druhá našim vlastním domácím problémům a vytyčení směru soustavného výzkumu v otázce pivovarských kvasinek.

Hlavní směry, v nichž se nejvíce udělalo, jsou tři:

1. Studium využití různých cukrů kvasinkami.
2. Hledání nových kmenů s rozmanitými požadavky na základní metabolismus.
3. Aglutinace a sedimentace pivovarských kvasinek.

Studium využití různých cukrů kvasinkami

Papírová chromatografie umožnila nahlédnout blíže do sestavy cukrů ve rmutech, sladinách, mladínách nebo v pivu. Dnes je vypracováno množství metod pro důkaz nejrozličnějších cukerných sloučenin jako aldohexóz, aldopentóz, ketohexóz, ketopentóz, uronových kyselin, deoxycukrů, aminocukrů, oligosacharidů i polysacharidů. Nejpodstatnějším zdrojem těchto cukrů pro pivovarské tekutiny je sladový škrob, který při rmutování podléhá enzymatickému rozkladu. Avšak dnes byly podrobeny studiu i jiné polysacharidy, přicházející do sladin z ječné obilky, jako jsou např. hemi-celulózy, rozkládající se enzymaticky na alfa a beta-glukan, který tvoří největší část neškrobnatých polysacharidů v ječmeni nebo na araboxylan apod. Mnohé z nich jsou potom zdrojem výskytu pentóz v sladinách, např. arabinózy, xylózy, oligosacharidů xylobiózy a vyšších pento-oligosacharidů. O těchto cukrech, které se dostávají do pivovarských tekutin z jiných zdrojů, než je škrob, bylo v posledních letech uveřejněno více pojednání.

Největší význam pro kvašení mají však cukry vzniklé při rozkladu škrobu — cukry maltózové řady. Díky chromatografickým metodám máme dnes podrobnější znalosti o jejich sestavě. Rozbořením při rmutování se u nás zabývala různá pracoviště a také naše pracoviště vydalo o tom několik zpráv. Enzymatickým rozkladem vzniklé cukry podléhají dále také změnám chemickým. Jde např. o chemickou hydrolýzu sacharózy, o epimeraci maltózy, maltotriózy apod. Naši pracovníci se zabývali studiem schopnosti zkvašovat epimerací vzniklé keto-oligosacharidy maltózové řady a zjistili, že naše kmeny pivovarských kvasinek tuto schopnost postrádají. Jsou však jiné kvasinky, které klidně z prostředí odstraní nejen maltulózu, ale

i maltotriózu a z ní epimerací vzniklý cukr, jako např. vinné kvasinky, *Sacch. cerevisiae* rasa XII nebo druhy rodu *Schizosaccharomyces*. Enzymatickou hydrolýzou sladového škrobu nebo už z odštěpených dextrinů vzniká tzv. nigeróza, která tvoří s maltulózou téměř chromatografický pár. A zůstává jistě ještě řada dosud neidentifikovaných cukrů, vznikajících při rmutování v sladinách. Také i polyfenolické látky ječmene a chmele mohou být zdrojem mikrokvant různých cukrů.

Cukerné složky mladiny mají velký význam pro fermentační činnost násadových kvasnic. Je přirozené, že hlavním zdrojem cukru pro tvorbu alkoholu je maltóza. Ale také sacharóza stejně dobře kvasí a je dokonce prvním cukrem, který z kvasící mladiny zmizí ještě před glukózou a fruktózou. Kvasinky si nejdříve vybírají nejsnáze využitelné cukry, takže k dokvašování zůstávají zbytky nezpracované maltózy, a vyšší cukry maltózové řady. Podle toho jaký fond hydrolytických enzymů mají kvasinky, mohou je při dokvašování dále štěpit. Byla dokonce objevena kvasinka, nazvaná *Sacch. diastaticus*, o jejích vlastnostech bylo podáno několik zpráv. Tyto kvasinky prý obsahují enzym glukamylázu, která nejdříve štěpí alfa-1,4-glukosidickou vazbu dextrinu. Kvašení dextrinů v pivě však podporují ještě mléčné bakterie, z nichž některé varianty mají schopnost štěpit také alfa-1,6-vazbu štěpných produktů amylopektinu.

Za poslední léta byl také podstatně pozměněn názor na mechanismus vstupu cukrů do buněk kvasinek. Zatímco v starších pracích se hovoří o buněčné membráně jako o bariéře, již prostupují difuzí molekuly určitých rozměrů, dnešní názory pokládají vstup cukrů do buněk za aktivní přenos. V poslední době byl tento názor také aplikován na pivovarské kvasinky v pivovarských tekutinách. Zjistilo se, že do buněk pronikají i takové cukry, které nejsou metabolizovány a tyto se mohou v buňkách hromadit tak dlouho, dokud se jejich koncentrace uvnitř nevyrovná s jejich koncentrací v prostředí. Jakmile začnou v buňce nabývat vyšší koncentrace, vycházejí z buňky, a to takovou rychlostí, jakou jsou do ní přijímány. Pravděpodobně i mechanismus výstupu je tentýž, jaký se uplatňoval při vstupu. Naproti tomu cukry, které jsou užitkovány, mohou pronikat do buněk i tehdy, když jejich koncentrace v buňce je vyšší než v prostředí. Pronikají sem tedy ve směru proti koncentračnímu spádu. To nemůže být postup samovolný, ale potřebuje se k tomu energie, která by tento transport umožnila. Povaha této energie není dosud známa. Tento aktivní přenos se vysvětluje dnes modelově tak, že přenášený cukr musí mít určitý tvar, aby se mohl v určitých místech dotýkat látky, která tu slouží jako nosič. Různými pokusy s inhibitory cukerného metabolismu se dnes dokazuje, že takovým nosičem je kyselina ribonukleová. Místa, v kterých se cukr s touto látkou dotýká, mohou být obsazena některými kovovými ionty nebo skupinami, např. uranylem, vápníkem i hořčíkem. Tyto ionty mohou pak brzdit přenos cukru do buněk.

U disacharidů byly dnes osvětleny dva mechanismy vstupu. První z nich se týká maltózy. Maltóza proniká do buněk podobným mechanismem, jaký byl právě vyložen. Tento systém přenosu mal-

*) Předneseno na IV. sladařsko-pivovarském semináři 8. prosince 1961 v Plzni.

tózy do buněk kvasinek je indukovatelný za předpokladu, že buňky vlastní genetický komplement. Maltóza, která je jednou vnesena do buňky, je enzymaticky hydrolyzována. K tomu potřebná hydrolyza je také enzymem indukovatelným a geneticky kontrolovaným. K využití maltózy kvasničnou buňkou je tedy zapotřebí membránového přenášejícího systému (permeáza) a vnitřního hydrolytického enzymu. Druhý princip vstupu do buněk je vysvětlován na příkladě invertázy, která je jako hydrolytický enzym umístěna při povrchu membrány. Jejím vstupu předchází štěpení sacharózy, takže do buněk už přechází mechanismem, popsaným pro jednoduché cukry. Fosforylované cukry, které vznikají jako meziproducty při využití těchto jednoduchých hexóz, nemohou pronikat buněčnou membránou. Z toho se usuzuje, že v systému alkoholického kvašení je sdružený s permeázovým aktivním přenosem volného cukru do buňky a ne jeho fosforylovaného derivátu. Fosforylovaných cukrů nemůže být využito intaktními živými buňkami, ale jen plasmatickým obsahem. Ještě je třeba vzpomenout, že intaktní kvasničné buňky mohou hydrolyzovat koloidní škrob, ba dokonce i inulin, ačkoli žádný z nich nemůže procházet buněčnou membránou. Proto tyto hydrolytické enzymy musí být umístěny na povrchu kvasinek. Zda jsou tyto enzymy umístěny v struktuře buněčné stěny anebo jsou částí protonlasmové membrány, není dosud rozřešeno. Umístění některých hydrolytických enzymů na povrchu kvasinek by také vysvětlilo schopnost štěpit dextriny kvasinkou *Sacch. diastaticus*.

V poslední době se u pivovarských kvasinek *Sacch. carlsbergensis* sleduje schopnost využít maltotriózu. Tato kvasinka nepropouští maltotriózu, ale bezbuněčný extrakt obsahuje enzym, schopný tento cukr rozkládat. Zjistilo se, že kvasinky mohou maltotriózu využít při pH 5 a 7, nikoliv však při pH vyšším. Dalo by se to vysvětlit tvorbou keto-cukru epimerací v alkalickém prostředí.

Hledání nových kmenů s rozmanitými požadavky na základní metabolismus

U kvasinek byl již dávno pozorován tzv. Pasteurův efekt. Je to ukaz, při němž se vlivem kyslíku objeví snížená kvasivá schopnost. Např. využily-li kvasinky za anaerobních podmínek 80 % glukózy, za podmínek aerobních, několikrát za sebou vedené, mohou snížit tuto utilizaci až na 14 %. Tyto otázky zajímají dnes především ty, kteří připravují pivo ještě svrchním kvašením, za podmínek teplejšího vedení anebo za podmínek méně anaerobních. U svrchních kvasinek *Sacch. cerevisiae* je také Pasteurův efekt zřetelnější než u spodních kvasinek *Sacch. carlsbergensis*.

Vyvinula se snaha vypěstovat také z těchto svrchních kvasinek kmeny, které by hlouběji kvasily. Proto se mnoho pracovníků uchýlilo k pokusům, jako kdysi provedl *Ephrussi* a *Slonimski*, když vypěstovali respiračně deficientní mutanty, tzv. „malé kolonie“ (petit colonie). Podobné mutanty se ztrátou dýšací schopnosti se dají vypěstovat různým způsobem, např. vlivem některých minerálních solí nebo účinkem akriflavinu, UV záření apod. Tyto mutanty postrádají celou řadu oxydo-redukčních enzymů, zejména cytochromových. Stačí je potom v glukózovém prostředí provětrat, aby tyto enzymy a přenášedle elektronů získaly opět tento systém. Vysvětluje se to postupnou indukcí tak, že kyslík indukuje cytochrom oxydázou a tato

indukuje tvorbu cytochromu c, který pak indukuje řadu cytochromových reduktáz. Takové snadno obnovitelné enzymy jsou kataláza a cytochrom-peroxydáz. Bylo dokázáno, že ty vlivy, které podporují tvorbu katalázy, podporují syntézu kyseliny ribonukleové.

Někteří pracovníci se pokoušeli připravit účinkem akriflavinu mutanty, které ztratily schopnost dýchání také ze spodních kvasinek *Sacch. carlsbergensis*. Avšak výsledky těchto pokusů byly neuspokojivé, neboť počet získaných mutantů byl zanedbatelně malý.

Původně se myslelo, že k vypěstování ztrátových mutantů účinkem chemikálií je nutné, aby kultura, na kterou tyto působí, se nacházela ve stadiu intenzivního pučení. Avšak některé novější pokusy s vlivem solí mangánu ukázaly, že to není nezbytnou nutností při určité hladině volných aminokyselin a při určité koncentraci iontů hořčíku. Dnes se soudí, že tyto respirační varianty vznikají jako výsledek mechanického defektu v distribuci dědičných struktur, usměrňujících dýchání.

Aglutinace a sedimentace pivovarských kvasinek

O sedimentaci pivovarských kvasinek jako důsledku vločkovatění (aglutinace) je bohatá literatura v minulosti i v současnosti. Avšak přes množství prací, které se uveřejňují v této vědní oblasti, nebylo za poslední léta do nich vneseno nějaké nové hledisko — něco, co už dříve nebylo vysloveno. I když se stále důrazněji prosazuje genetický charakter těchto vlastností, musíme přiznat, že aglutinace jako vlastnost kvasinek se odedávna připisovala kmenům a rasám. Kvasinky byly rozlišovány na spodní a svrchní, na prachové a vločkovité.

Dnes se ví, že to není jen vlastnost kmenů, ale že je to také otázka vnějšího prostředí, které může ovlivňovat svým složením vločkovatění kvasinek. Nejsou to jen vlivy chemické, ale i fyzikálně chemické a fyzikální. Máme-li shrnout názor, ke kterému směřují výsledky experimentálního bádání v této oblasti, je asi takový: kvasničná kultura je směsí dobře vločkových buněk a buněk u nichž tato schopnost chybí. Některé látky v prostředí, jako např. bílkoviny, alkoholy, vícevalentní ionty, pentozany, chmelové látky apod., mohou flokulační efekt zvýšit. Naproti tomu jiné vlivy, např. cukry nebo zvýšená teplota mohou vést k snížení vločkovitosti. Tak se mohou vnějšími účinky vyselektovat kultury se schopností vločkovat anebo kultury, které tuto schopnost ztratily. Některí se domnívají, že jsou pouze kultury vločkovité a ne vločkovající a že není přechodných charakterů. Jiní opět rozdělují kvasinky podle vločkovatění do více skupin tak, že odlišují kvasinky prachové a potom několik stupňů kvasinek vločkovitých podle toho, v kterém stadiu kvašení vločkovatění nastane.

Veliký význam se připisuje povrchovému polysacharidům, kterým se kdysi dával souhrnný název „kvasničné gummy“. Dnes s pokročilým vývojem biochemie a sérologie jsou tyto povrchové polysacharidy analyzovány také chemicky. Tyto analýzy ukázaly na důležitost manan-fosfolipid-proteinového komplexu, který má hlavní význam při aglutinaci kvasinek. Některí tvrdí, že kvašení vločkovitými kvasinkami je možné jen tehdy, mají-li tyto určité období, kdy nevločkují a jsou-li v mladině suspenzovány. Je proto také třeba sledovat podmínky od vločkovatění a látky, které toto podporují. Bylo zjištěno, že období, kdy kvasinky nevločkují, odpo-

vidá období, kdy dochází k syntéze mananového komplexu. Analýzou buněčných blan se zjistilo, že prachové kvasinky obsahují větší množství mananu až na konci kvašení. Proto jsou dnes pokládány prachové kvasinky za vločkovité ve stadiu, kdy právě nevločkují.

Tyto tři krátké souhrny vyznačují dvě důležité věci:

a) že výzkum problematiky pivovarských kvasinek se nezastavil jen na pokusnictví, ale využívá plně a do hloubky všech poznatků základního výzkumu;

b) že problematika v celosvětovém měřítku je velmi podobná našim vlastním potřebám.

I když se za poslední léta u nás ve výzkumu pivovarských kvasinek mnoho neudělalo, je třeba vzpomenout alespoň práci organizačního rázu při zřízení střediska „Slovenské čisté kultury pivovarské“. Tato práce záležela v tom, že především byla provedena katalogizace, která spočívala na základech již provedené typizace našich kultur ještě v Brnickém pivovaru. Ke kulturám pivovarských kvasinek byly však připojeny i jiné čisté kultury, např. vinné kvasinky, patogenní kvasinkovité mikroorganismy a také některé plísňe. Všechny tyto kultury udržuje dnes mikrobiologická laboratoř Chemického ústavu ČSAV v Bratislavě. K tomu byly před třemi léty připojeny také práce s propagací přesně určených násadových provozních čistých kultur. Od té doby byla katalogizace provedena již dvakrát. Na jejím základě jsou dnes zaregistrovány naše čisté kultury v státní sbírce a také v Mezinárodním centru mikrobiálních kultur v Lausanne. Chemický ústav ČSAV v Bratislavě má v plánu v budoucnosti s touto katalogizací pokračovat, nejen proto, aby získala tradice, ale zejména proto, že se tato sbírka mikroorganismů stále rozšiřuje o kmeny, získané z ciziny, o kmeny, potřebné pro biochemický výzkum biosyntézy sacharidů i o domácí izoláty, neboť se provádí průzkum výskytu kvasinkovitých mikroorganismů v přírodě našich krajů. Provádí se také typizace některých důležitých druhů. Oba vydané katalogy vzbudily zájem o naše pivovarské i ostatní kultury také v cizině, takže za poslední léta bylo dodáno mnoho kmenů do SSSR, Belgie, Japonska, Dánska, Maďarska, Polska, Rakouska, Jugoslávie apod.

Pouhá registrace kultur však není účelem takového střediska čistých kultur. Je třeba kultury udržovat tak, aby si zachovaly své důležité vlastnosti, je třeba sledovat jejich podmínky výživy, kontrolovat jejich taxonomické znaky a také vypěstovávat nové průmyslové kmeny, hodící se pro různé technologické postupy.

Autorkou byly kdysi laboratorně, poloprovozně i v provozu sledovány vlastnosti našich domácích kmenů. Když byla naposledy studována otázka využití různých cukrů z pivovarských tekutin až po hotové pivo, bylo zjištěno, že naše domácí kmeny, pokud jde o výběr a užití cukrů, jsou ve svých vlastnostech téměř vyrovnány. Není proto divu, že stále přicházejí dotazy a požadavky na kmeny se speciálními vlastnostmi, stejně tak jak je to vidět i v zahraničním průmyslu. Z toho se formují přirozené požadavky, které by si nárokoval průmysl na svůj výzkum v problematice pivovarských kvasinek:

1. Vypěstování kmenů rychle a hluboko kvasících, jaké žádají především slovenské závody.

2. Vypěstování kmenů s vlastností nevločkovat, které by se hodily na dokvašování některým našim velkým závodům, které je občas žádají na doplnění série svých provozních kultur.

3. Vypěstování kmenů odolných vůči nepříznivým vlivům velkého množství surogátů, a to podle chemické povahy surogátu, popř. vypěstování takových kmenů, které by byly schopny štěpit dodané polysacharidy.

4. Udržet v rezervě kmeny-mutanty různých vlastností, např. schopné hluboko prokvašovat při tepém vedení bez tvorby nežádoucích průvodních zplodin, kmeny odolné vůči kovovým iontům, kmeny vhodné pro kontinuální procesy atd. To znamená udržet je v takové formě, aby neztratily své jednou získané vlastnosti.

Tím nejsou přirozeně vyčerpány všechny možnosti problematiky výzkumu pivovarských kvasinek, ale jen ty, které jsou v současné době důležité. Jak z předcházejícího vyplývá, jeví se nutnost, aby při takovém komplexním výzkumu došlo k stupňovitému členění výzkumu a jeho skloubení v těchto hlavních článcích:

1. Výzkum ve smyslu základním.
2. Výzkum ve smyslu aplikovaném.
3. Průmyslová realizace.

Při aplikaci tohoto členění na naše domácí poměry si jistě uvědomíme, že nám tu něco chybí. I když by bylo naše pracoviště s to řešit otázky, týkající se základního výzkumu kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů, není tu pracoviště, které by tyto vyřešené problémy přenášelo do průmyslu.

Bylo by vhodné, kdyby práce na tomto úseku byly vhodně koordinovány, tak aby podniky samy nemusily nastupovat tuto cestu a aby naše kmeny byly přezkoušeny pro nejružnější účely. Kdyby se podniky přece rozhodly doplnit si svůj aplikovaný výzkum zcela vážně a důsledně, mikrobiologické pracoviště Chemického ústavu ČSAV v Bratislavě jim bude ochotně nápomocné při realizaci po stránce výuky, organizace i iniciativy.

Literatura

- [1] Chantrenne H., Courtois C.: Formation de catalase induite par l'oxygene chez la levure, *Biochim. biophys. acta* **14**, 397 (1954).
- [2] Chantrenne H.: Effects d'un inhibiteur de la catalase sur la formation induite de cet enzyme chez la levure. *Biochim. biophys. acta* **16**, 410 (1955).
- [3] S. Nagai, H. Nagai: A new evidence for induction of respiration deficiency in yeast by acriflavine. *Experientia* **14**, 321 (1958).
- [4] Chester V. E.: Endogenous metabolism of freshly harvested cells of brewers yeast. *Nature* **183**, 902 (1959).
- [5] Chester V. V.: Effect of oxygen on endogenous metabolism of a respiratory — deficient brewer's yeast. *Nature* **184**, 1956 (1959).
- [6] Korn E. D., Northcote: Physical and chemical properties of polysaccharides and glycoproteins of the yeast and glycoproteins of the yeast-cell wall. *Biochim. J.* **75**, 12 (1960).
- [7] Mac William I. C., Phillips A. W.: Occurrence of maltulose and nigerose in beer. *Chemistry and Industry*, 364 (1959).
- [8] Harris G., Thompson C. C.: Uptake of nutrients by yeast. I. Penetration of sugars into yeasts, *Jour. Inst. Brewing* **66**, 213 (1960).
- [9] Harris G., Thompson C. C.: Uptake of nutrients by yeasts. II. Maltotriose permease and the utilization of maltotriose by yeasts. *Jour. Inst. Brewing* **66**, 293 (1960).
- [10] Millbank J. W., Hough J. S.: The action of acriflavine on brewer's yeasts. *Jour. gen. microbiol.* **25**, 191 (1961).
- [11] Rothstein A.: The biochemical properties of the cell membrane of yeast in relation to sugar uptake and glycolysis. V. th. Intern. Congress of Biochemistry, Moskva 1961.

Došlo do redakce 11. 12. 1961.