

Význam růstových faktorů a aminokyselin pro pivovarské kvasinky a jejich typizaci

RNDr. O. BENDOVIÁ, V. KURZOVÁ, prom. biolog, Ing. B. PARDONOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.12
582.282.232.095
647.466

Do redakce došlo 17. 4. 1970

Mezi nejdůležitější růstové faktory kvasinek, označované také jako bios-faktory patří látky ze skupiny vitamínů B, a to biotin, kyselina pantothenová, inozitol, thiamin a pyridoxin a dále kyselina nikotinová. K nim se řadí ještě i některé další (kyseliny listové, kyselina p-aminobenzoová a riboflavin). Mladina jich obsahuje značné množství, takže kvasnice jich mají zpravidla k dispozici dostatek. Přesto však se prokázalo, že i za těchto podmínek se syntetizují [16].

Biotin je pro pivovarské kvasinky esenciálním růstovým faktorem. Jsou vůči němu heterotrofní, protože jej nedovedou syntetizovat. Biotin je součástí některých ligáz, katalyzujících inkorporaci nebo přenos CO_2 . Účastní se biosyntézy tuků a jak se uvádí, snižuje jeho nedostatek obsah mastných kyselin s dlouhým řetězcem (zejména C_{18}), zatímco současně stoupá množství kyselin s krátkým řetězcem. Biotin má tedy vliv na složení tuků a protože cytoplazmatická membrána i buněčná stěna kvasinek obsahuje mj. i lipoproteiny, vede jeho nedostatek k jejím změnám a tím i k poruše penetrace substancí do buňky právě tak jako k poruše uvolňování látek z buňky do média. Proto je biotin pro kvasničnou buňku důležitým růstovým faktorem a přes nízký obsah tuků v pivovarských kvasinkách má změna syntézy mastných kyselin a jejich složení vliv na aktivitu a funkci buněk. Ukázalo se, že při nedostatku biotinu nastávají změny ve složení kvasničných sacharidů, neboť se v buněčné stěně zvyšuje podíl glukanu a sacharidů extrahovatelných kyselinou trichloroctovou a snižuje podíl mannanu, což vede ke zvýšení aglutinační schopnosti buněk [5].

Kyselina pantothenová je komponentou koenzymu A, který umožňuje v příslušných enzymových systémech přenos radikálů četných kyselin a zasahuje tak do řady metabolických pochodů, jako je odbourávání mastných kyselin, terminální oxidační cyklus kyseliny citrónové, cyklus kyseliny glyoxalové apod. Při jejím nedostatku se prodlužuje lag-fáze a celkově se snižuje rozmnožování, protože vlastní syntéza nestačí. Při biosyntéze koenzymu A kondenzuje kyselina pantothenová s cysteinem na tzv. pantetheln. Při jejím nedostatku přechází přebytkový cystein zřejmě na serin za současného uvolňování sirovodíku, což bylo potvrzeno u kmenů, které tuto kyselinu vyžadují [4].

Inozitol má vliv na oddělování dceřiných buněk od mateřských. Při jeho nedostatku vznikají svazky pučících buněk, ve starších kulturách vysloveně shluky. Kvasničné buňky v sobě hromadí relativně největší množství tohoto vitamínu. Uvádí se, že tento vitamín působí i na zvýšení kvasné schopnosti [2].

Thiamin se ve formě koenzymů účastní řady významných reakcí výměny látkové. Nejdéle známou reakcí je dekarboxylace kyseliny pyrohroznové a dále oxidační dekarboxylace α -ketokyselin.

Pyridoxin je pojem biologický, jemuž odpovídá účinek tří látek označených jako pyridoxinová triáda (pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin). Ve formě pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxamin-5-fosfátu vystupuje jako koenzym především při transaminaci a dekarboxylaci aminokyselin.

Kyselina nikotinová (niacin) působí vázána v nukleotidech jako součást enzymů a NAD a NADP při oxidoredukčních pochodech.

Riboflavin se uplatňuje ve formě FMN a FAD jako koenzym tzv. flavinových neboli žlutých enzymů rovněž při oxidoredukčních reakcích. Význam kyseliny p-aminobenzoové v metabolismu spočívá především v tom, že je stavební jednotkou kyselin listových, které se jako koenzym podílejí na přenosu jednonukleotidových radikálů.*]

Požadavky pivovarských kvasinek spodního a svrchního kvašení jsou odlišné. Spodní kvasinky se dělí na 4 typy vyžadující:

- I. pouze biotin
- II. biotin a kyselinu pantothenovou
- III. biotin a inositol
- IV. biotin, inositol a kyselinu pantothenovou

Svrchní kvasinky vyžadují ještě thiamin a pyridoxin [3, 20]. Windisch [18] však popírá platnost dělení spodních a svrchních kvasinek podle požadavků na thiamin a pyridoxin. Pokud jde o kyselinu nikotinovou, není pro pivovarské kvasinky zpravidla esenciálním růstovým faktorem. Totéž se uvádí i pro riboflavin a kyselinu p-aminobenzoovou [13].

Požadavky na růstové faktory jsou ovlivňovány i teplotou. Jak zjistil Amaha [1], zvyšují se nepřímě úměrně teplotě. Nedostatek různých faktorů v médiu ovlivňuje i tvar obrovských kolonií. Podle pozorování Weinfurtnera [15] projevují se v zá-

*] Řada prací potvrzuje možnost typizovat pivovarské kvasinky podle jejich požadavků na růstové faktory [2, 3, 13, 18, 20].

vislosti na růstových faktorech rozdíly mezi obrovskými koloniemi *Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae*. Mezi flokulujícími a neflokulujícími typy difference nebyly.

Schopnost kvasinek utilizovat aminokyseliny a jiné organické dusíkaté látky prostudoval a detailně popsal Thorne [19, 20]. Převážnou část spotřeby aminokyselin (asi 70 %) kryjí kvasinky přímou asimilací a téměř celý zbytek desaminací podle známé Ehrlichovy reakce za vzniku vyšších alkoholů. Sticklandův mechanismus je v tomto případě poměrně bezvýznamný. Kromě aminokyselin asimilují kvasinky také peptidy, to po rozštěpení působením exopeptidázy; asi 11 % asimilovatelného dusíku mladiny pochází z peptidů. V nedávné době se problematikou asimilace aminokyselin kvasinkami zabývali Jones a Pierce [6, 7], Robbins a Farley [10], Maule [8], Palmqvist a Åyräpää [9]. Zjistili, že během kvašení se jednotlivé aminokyseliny v mladině asimilují v určitém pořadí, a že je lze rozřadit podle míry asimilace a stupně utilizace kvasničnou buňkou. Přitom se předpokládá regulace vstupu aminokyselin do buňky pomocí permeázového systému. Palmqvist a Åyräpää uvádějí, že nejrychleji — prakticky v rané log-fázi — jsou z média vyčerpány asparagin, glutamin, serin a threonin. Údaje ostatních autorů jsou s těmito v praktické shodě. V první fázi kvašení musejí být naopak syntézovány ty aminokyseliny, které se mohou asimilovat — pravděpodobně z kompetičních důvodů — až později, a dále syntézovány ty, které již byly z média odčerpány. Fyziologická úloha uvedených amidů je velmi významná. Asparagin je snadno převeden na kyselinu asparagovou, která se inkorporuje jak do pyrimidinového, tak i do purinového skeletu, jejichž biosyntéza je důležitým stádiem biogeneze nukleových kyselin. Do něho se včleňuje rovněž glutamin a glycin, jenž vzniká ze serinu. Glycin se na začátku kvašení neasimiluje. Zatím není známo, zda threonin má podobnou fyziologickou úlohu jako serin, neboť rovněž poskytuje glycin, či zda jeho rychlá absorpce je prostě důsledkem jeho strukturální podoby ze serinem. Řešení otázky kvalitativních a kvantitativních poměrů při asimilaci aminokyselin v kvasící mladině umožňuje bližší pohled do metabolismu pivovarských kvasinek a lze u různých kmenů očekávat jisté difference. Naproti tomu v případě, že jde o utilizaci jedné aminokyseliny jako zdroje dusíku v médiu, lze předpokládat u různých druhů a kmenů ve vztahu k jednotlivým aminokyselinám rozdíly, které však nemusí být vždy ve shodě s poměry v kvasící mladině. Kvasničná kultura musí projít během tohoto procesu třemi stádii:

1. desaminací aminokyselin pro uvolnění amoniaku;
2. syntézou všech aminokyselin požadovaných pro proteosyntézu za využití uvolněného amoniaku;
3. integrací těchto aminokyselin do struktury bílkovin.

Na rozdíly ve schopnosti různých druhů kvasinek asimilovat jednotlivé aminokyseliny poukázal Schultz a Pomper [12]. Streutker [13] se v tomto

směru pokusil zjistit kmenové rozdíly u *Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae* a u příbuzného druhu *Saccharomyces uvarum*. Zjistil difference v závislosti na teplotě (5, 13,5, 25 a 30 °C). V řadě případů nedovedly kvasinky asimilovat některé aminokyseliny při 30 °C, zatímco při nízkých teplotách probíhal tento proces v dostatečné míře. Podobně tomu bylo i naopak.

Ve své práci jsme přešetřili příslušnost 34 kmenů pivovarských kvasinek ze sbírky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze k jednotlivým biotypům. Současně jsme u šesti vybraných kmenů sledovali možnost využití schopností utilizace aminokyselin jako jediných zdrojů dusíku v médiu pro bližší charakteristiku kmenů. Pracovali jsme s kmeny, jejichž typizace na základě řady morfologických, fyziologických, biochemických a sérologických vlastností a jejich označení a původ jsou uvedeny v předcházejícím sdělení [21].

Pracovní postup spočíval v sledování růstu jednotlivých kmenů v syntetických půdách, jak kompletních, tak i postrádajících určitý bios-faktor. Složení kompletní kultivační půdy (půda M):

glukóza	10,0 g	inozitol	25 mg
KH ₂ PO ₄	0,55 g	Ca-pantotenát	2,5 mg
KCl	0,425 g	biotin	0,025 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,125 g	thiamin HCl	0,5 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,125 mg	pyridoxin HCl	0,5 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	2,5 mg	dest. voda ad	1000 ml
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2,5 mg	pH se upraví na	5,5
NH ₄ SO ₄	3,3 g		

Půda A — bez Ca-pantotenátu

Půda B — bez inozitolu

Půda C — bez Ca-pantotenátu i inozitolu

Půda D — pouze s biotinem

Půda E — bez růstových faktorů

Půda M — kompletní

Inokulum se připravovalo po 24hodinové inkubaci kmene na základní půdě bez růstových faktorů. Očkovalo se vždy 0,5 ml inokula do 10 ml média v Erlenmayerových baňkách obsahu 100 ml. Růst se měřil nefelometricky po 48 hodinách kultivace při 28 °C. Jestliže růst na půdě bez určitého bios-faktoru byl nižší než 50 % růstu kontrolní kultury na kompletním médiu, hodnotil se výsledek jako požadavek daného kmene na příslušný biosfaktor.

Asimilace aminokyselin se sledovala v médiu stejného složení, pouze s tím rozdílem, že se jednotlivé L-aminokyseliny přidávaly v množství 0,8 mg N/ml základního média (v případě DL forem dvojnásobná dávka) a předkultivace probíhala 24 hodin ve sladině a potom stejnou dobu v médiu uvedeného složení, avšak bez zdroje N. Zaočkování a způsob kultivace byl ve všech případech stejný. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Jak ukazuje tabulka 1, patří téměř všechny testované kmeny do I. skupiny, tzn. vyžadují jako nezbytný růstový faktor pouze biotin. Kmeny č. 70, 86 a 88 vyžadují biotin a kyselinu pantotenovou a patří tedy do II. skupiny. Pro kmen č. 77 je nezbytný jak biotin, tak i kyselina pantotenová a inozitol, a proto je tento kmen představitelem IV. skupiny.

III. skupina s požadavky na přítomnost biotinu a inozitolu v médiu zastoupena není. Z výsledků je tedy zřejmé, že prakticky všechny kmeny s kompletním zkvašováním rafinózy patřily do I. skupiny, a že jsme se zde nesetkali s takovou rozmanitostí bios-typů, jakou uvádějí někteří jiní autoři [3, 11, 14, 17]. Výjimkou byly oba hybridy (č. 86 a 88), které zkvašovaly rafinózu do 3/3 a současně byly

zařazeny do II. bios-skupiny. Kmeny č. 59, 70 a 77 zkvašující rafinózu z 1/3 patřily rozdílným typům, a to kmen č. 59 k I. typu, č. 70 k II. typu a č. 77 ke IV. typu.

V dalším úseku práce se sledovala schopnost kmenů asimilovat jednotlivé aminokyseliny jako jediné zdroje dusíku v médiu. Předběžnou zkouškou bylo zjištěno, že kmeny neasimilují lyzin, což je za těchto podmínek pro pivovarské kvasinky charakteristické. Šetření však bylo třeba provést nejen z kvalitativního, nýbrž i kvantitativního hlediska, což představovalo práci náročnou nejen časově, nýbrž i na množství použitých čistých aminokyselin. Proto byl proveden průzkum pouze u několika kmenů. Šlo o dva typy *Sacch. carlsbergensis* domácího původu, dále o dva kmeny zkvašující rafinózu z 1/3 a o dva zmíněné hybridy.

Z tabulky 2 je vidět, že za uvedených pokusných podmínek jsou patrné zřetelné rozdíly již za 24 hodin kultivace. Nejrychleji byl asimilován aminodusík z asparaginu a kyseliny glutamové. Pomalu probíhala asimilace glycinu, velmi nízký byl růst na threoninu, a to i ve druhém dni kultivace a totéž platilo ve zvýšené míře i o histidin, který umožňoval růst prakticky pouze u kmene č. 77. V porovnání s ostatními projeví rozdílné rychlosti využívání jednotlivých aminokyselin především kmeny č. 77, 86 a 88. Je pochopitelné, že zde byly zaznamenány difference, protože šlo prakticky o druhové rozdílné kmeny. Bylo by zajímavé sledovat tuto schopnost u kmenů s větší podobností, tedy výhradně stejného druhu. Je jisté, že obraz asimilační schopnosti kmenů je jiný, jde-li o médium obsahující celý komplex aminokyselin, jako je pivovarská mladina. Tato skutečnost je známa z odborné literatury a její šetření u různých kmenů otevírá možnost jejich dalšího bližšího poznání.

Souhrn

Článek uvádí výsledky typizace 34 kmenů pivovarských kvasinek podle požadavků na vitamíny a u 6 kmenů zaznamenává závislost růstu na přítomnosti jednotlivých aminokyselin jako jediných zdrojů dusíku v médiu. 29 kmenů spodních pivovarských

Tabulka 1. Požadavky zkoušených kmenů na růstové faktory

Kmen	Růst na půdě (v mg sušiny ve 100 ml)						Bios typ
	A	B	C	D	E	M	
1	210	196	194	190	4	220	I.
2	210	218	202	202	4	210	I.
3	174	172	184	154	4	186	I.
4	190	200	196	200	4	190	I.
7	206	196	196	174	3	206	I.
9	210	202	202	196	3	210	I.
10	192	178	160	162	3	196	I.
12	210	212	218	212	4	210	I.
31	202	192	190	196	3	206	I.
32	186	192	186	190	18	186	I.
33	174	150	140	142	5	186	I.
34	166	190	155	168	4	191	I.
41	170	168	181	168	4	168	I.
42	196	196	196	202	4	202	I.
43	196	200	174	190	4	194	I.
44	186	120	125	126	3	185	I.
45	196	160	162	168	3	202	I.
46	184	158	165	164	18	185	I.
47	184	156	173	164	4	178	I.
56	165	125	115	122	3	165	I.
57	194	174	184	192	24	196	I.
58	202	191	190	188	42	184	I.
59	185	172	192	188	34	192	I.
70	0	96	0	0	0	122	II.
77	0	0	0	0	0	173	IV.
78	155	150	160	140	0	166	I.
80	165	165	162	160	0	169	I.
81	173	171	182	174	4	173	I.
82	63	60	58	58	0	65	I.
83	170	170	168	162	2	173	I.
84	130	160	168	170	2	171	I.
86	3	166	3	3	0	177	II.
87	76	78	86	80	0	76	I.
88	3	166	48	48	0	168	II.

Tabulka 2. Asimilace aminokyselin jako zdroje dusíku (udáváno v mg sušiny kvasničné suspenze ve 100 ml kult. půdy)

	Kultivace 24 hodin						Kultivace 48 hodin					
	kmen						kmen					
	1	2	59	77	86	88	1	2	59	77	86	88
kys. glutamová	104	96	120	102	146	48	150	158	184	288	172	194
kys. asparagová	54	54	87	54	142	12	137	146	194	300	172	184
valin	68	44	12	30	114	4	132	140	162	150	168	158
izoleucin	44	44	68	100	34	0	142	134	184	172	174	140
alanin	60	85	92	7	106	0	154	164	214	218	172	154
methionin	60	88	45	14	24	0	155	170	226	158	132	114
asparagin	137	140	150	158	176	0	184	184	196	230	194	192
glycin	39	38	28	0	42	0	132	132	174	164	146	114
threonin	4	8	0	5	0	0	52	44	32	40	76	44
histidin	0	0	0	0	0	0	4	00	0	44	4	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	4	12	4	146	18	144	164	202	164	160	154

kvasinek vyžadovalo biotin jako jediný růstový faktor. Ze tří kmenů, zkvašujících rafinózu z 1/3, jeden vyžadoval pouze biotin, druhý — biotin a kyselinu pantothenovou a třetí — biotin, kyselinu pantothenovou a inozitol. Dva hybridní kmeny vyžadovaly biotin a kyselinu pantothenovou, třetí — pouze biotin. Jednotlivé kmeny se lišily rychlostí růstu na jednotlivých aminokyselinách jako zdroji dusíku. Nevhodné jako jediné zdroje dusíku se kromě lyzinu ukázaly histidin a threonin.

Literatura

- [1] AMAHA, M. - TAKEUCHI, M.: *Inst. Brew.*, **67**, 1961: 335.
[2] ATKIN, I.: *Call. Lab. Comm.* **25**, 1962: 113.
[3] ATKIN, L. - GRAY, P. P.: *Call. Lab. Comm.* **25**, 1962: 122.
[4] DELLWEG, H.: *Der Brauereitechniker*; **20**, 1968: 153.
[5] DUNWELL, J. L. - AHMAD, F. - ROSE, A. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 1961: 604.
[6] JONES, M. - PIERCE, J. S.: *J. Inst. Brew.* **70**, 1964: 307.
[7] JONES, M. - PIERCE, J. S.: *Proc. E. B. C.*, Stockholm, 1965.
[8] MAULE, D. R. - PINNEGAR, M. A.: *J. Inst. Brew.* **72**, 1966: 488.
[9] PALMQVIST, U. - ÅYRÄPÄÄ, T.: *J. Inst. Brew.* **75**, 1969: 181.
[10] ROBBINS, G. S. - FARLEY, M. - BURKHART, B. A.: *Proc. A. M. Amer. Soc. Brew. Chem.* 1964, 34.
[11] SCHEDA, R. - YARROW, D.: *Arch. Microbiol.* **55**, 1966: 209.
[12] SCHULTZ, A. S. - POMPER, S.: *Arch. Biochem.* **19**, 1948: 184.
[13] STREUTKER, R. T.: *Wall. Lab. Comm.* **22**, 1959: 27.
[14] WEINFURTNER, F. - ESCHENBECHER, F. - BORGES, W.: *Zbl. Bakt.* II, abt. 113, 159: 134.
[15] WEINFURTNER, F. - ESCHENBECHER, F. - BORGES, W.: *Arch. f. Mikrob.* **37**, 1960: 193.
[16] WEINFURTNER, F. - ESCHENBECHER, F. - THOSS, G.: *Brauwiss.* **17**, 1934: 121.
[17] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: *Brauwiss.* **14**, 1961: 281.
[18] WINDISCH, S. - HERBST, A. M.: *Brauerei, Wiss. Beilage* **11**, 1958: 133.
[19] THORNE, R. S. W.: *Wall. Lab. Com.* **13**, 1950: 319.
[20] THORNE, R. S. W.: *Brew. Dig.* 1952: 45.
[21] BENDO VÁ, O. - KURZOVÁ, V. - PARDONOVÁ, B.: *Kvasný průmysl* **16**, 1970: v tisku.

Lektorovala Doc. Ing. L. Šilhánková, CSc.