

Biochemická charakteristika kvasinek

T. GINOVA-STOLJANOVA — Výzkumný ústav pivovarský, Sofia, BLR

Doba kvašení při výrobě piva závisí na mnoha faktorech. Z nich má velký význam kontrola metabolitů při utilizaci sacharidů mladiny. Je známo, že kvasinky využívají hlavní zkrasitelný cukr, tj. maltózu, po předchozí adaptaci, přičemž nastává indukovaná syntéza maltózozymázového komplexu — maltózopermeázy a α -glukozidázy. Magasanik a jiní autoři [1, 2] poukázali, že syntéza a aktivita respiračních a fermentačních enzymů je řízena katabolickou represí a inhibicí. U kvasinek se první regulační systém projevuje snížením obsahu a potlačením syntézy některých oxidačních enzymů Krebsova cyklu a maltózozymázy v přítomnosti glukózy [3, 4]. Při katabolické inhibici glukóza nebo její metabolit snižuje aktivitu již syntézovaných enzymů.

Projev těchto regulačních mechanismů závisí na koncentraci glukózy. Při koncentraci nižší než 0,006 % dochází k derepresi respiračních enzymů a při nižší než 0,2 % k derepresi maltózozymázy [2, 5]. Katabolická represe a inhibice jsou příčinou postupného využívání sacharidů mladiny. Citlivost různých kmenů kvasinek ke katabolické represí není stejná a je důležitou charakteristikou, která může být podkladem pro jejich biochemickou diferenciaci a selekci [5, 6].

V této práci jsou uvedeny výsledky sledování dvou jevů katabolické represe: glukózová represe respiračních enzymů (Crabtree-efekt) a glukózová represe maltózozymázy.

Pracovní metody

Zkoušeli jsme dva kmeny pivovarských kvasinek *Sacch. carlsbergensis* ze sbírky Výzkumného ústavu pivovarského v Sofii — kmen 51 a kmen T. Kultury narostlé na 2% glukóze s 0,5 % kvasničného extraktu (Difco) byly přeneseny do média s 0,15 % glukózy, jež je prostředím pro sledování kinetiky růstu [5]. Kultivace probíhala za aerobních podmínek v termostátované třepačce při 30 °C. Růst kvasinek se určoval měřením absorbance média.

Sledovali jsme změny celkové fermentační aktivity na maltóze jako funkci růstu kvasničné hmoty. Proto jsme kvasinky kultivovali za aerobních podmínek na médiu s 2 % maltózy s 0,5 % kvasničného extraktu. Po dosažení absorbance 0,2 (zdvojnásobení kultury) se přidalo 10 % glukózy. Vzorke se odebíraly v okamžiku přidání glukózy a 1 a 2 h později [5]. Kvasinky se promyly M/15 fosfátovým pufrem. Množství vytvořeného CO₂ a spotřebovaného O₂ jsme zjistili Warburgovým manometrickým přístrojem a vyjádřili jsme je v μ l plynu na ml média a na mg kvasničné sušiny za hodinu.

Výsledky a diskuse

Crabtree efekt (obrácený Pasteurův efekt) jako výsledný projev regulace metabolismu vymezuje zkvašování glukózy v aerobním médiu, dokud koncentrace cukru

neklesne na 6.10^{-3} M. Potom se přeměna energetického substrátu mění a kvasinky oxidují vytvořený etanol. Bylo zjištěno, že mnoho kvasinek z rodu *Saccharomyces* vykazuje výrazný Crabtree efekt [2].

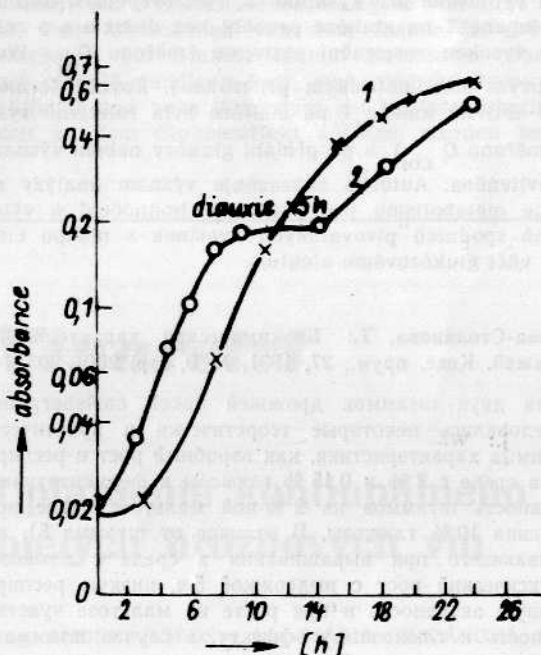
Růstová křivka zkoušených kmenů (obr. 1) ukazuje tři různé parametry pro charakteristiku pivovarských kvasinek: 1. Generační doba (T) v první exponenciální

Tabulka 1. Dýchání sledovaných kvasinek při aerobním růstu na 0,15 % glukóze

Médium	$Q_{O_2} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
	Kmen kvasinek 51	T
inokulační kvasinky	0	0
I. exponenciální fáze	0	21
II. exponenciální fáze — kmen 51 po diauxii	38	78

Tabulka 2. Vývoj glukózového efektu na médiu s 2 % maltózy

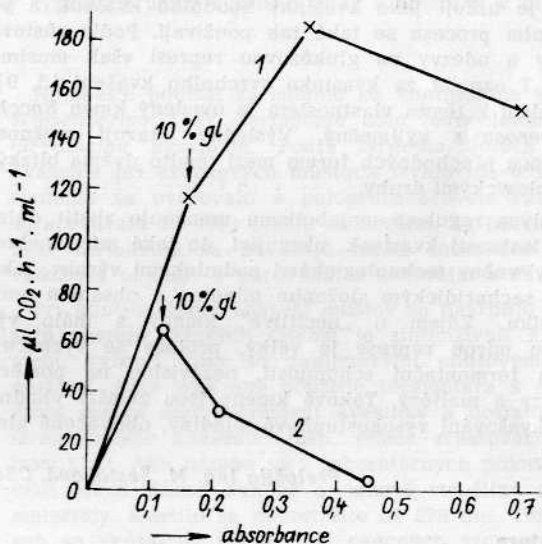
Kmen	Charakteristika kultivace	Absorbance	$Q_{CO_2}^{N_2} \cdot \mu\text{l} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
51	maltóza	0,135	348
	+ glukóza, 1 h	0,215	114
	+ glukóza, 2 h	0,460	9
T	maltóza	0,150	482
	+ glukóza, 1 h	0,360	396
	+ glukóza, 2 h	0,600	162



Obr. 1. Růstová křivka kvasinky *Sacch. carlsbergensis* kmene T (1) a kmene 51 (2) za aerobních podmínek v médiu s 0,15 % glukózy. Abscisa — doba kultivace v h, Ordináta — absorbance kvasinek v médiu

fázi, během které se glukóza využívá kvašením. Pro kmen 51 je $T=2$ h a pro kmen T je $T=2,50$ h. 2. U kmene 51 se při využití glukózy zastavuje růst kultury, přičemž růstová křivka vykazuje diauxii s prodlevou 5 h. Růstová křivka kmene T diauxii nevykazuje. 3. Generační doba 4,30 h pro druhou fázi růstu kmene 51, kdy se oxiduje vytvořený etanol. Metabolismus obou sledovaných kmenů je tedy výrazně rozdílný. Kmen 51 vykazuje růstovou křivku (typickou pro kvasinky spodního kvašení) s výrazným Crabtree efektem [6]. Adaptace k oxidaci etanolu u kvasinek *Sacch. carlsbergensis* prochází latentní fází, jejíž doba se mění v závislosti na kmeni od 1,30 do 13,30 h [5]. Na konci této fáze začíná dereprese a syntéza respiračních enzymů. Kvasinky svrchního kvašení, *Sacch. cerevisiae*, nevykazují diauxii [5, 6, 7]. Je to vysvětlováno postupnou derepresí a částečnou syntézou enzymů Krebsova cyklu. My jsme pozorovali, že kmen T nevykazuje diauxii a podle tohoto biochemického znaku se projevuje jako kmen svrchního kvašení.

Významné jsou výsledky měření dýchání kvasinek během růstu v médiu s 0,15 % glukózy po nárůstu na půdě s 2 % glukózy (tabulka 1). V době inokulace média i během první exponenciální fáze jsou respirační enzymy kmene 51 zcela potlačeny a projevují se až po diauxické prodlevě. U kmene T jsou hodnoty Q_{O_2} nízké, avšak dochází k rychlé adaptaci ještě před vyčerpáním glukózy. V následující fázi růstu kmene T (zdvojnásobení kvasničné hmoty) je respirační rychlost vysoká a přibližuje se hodnotám, charakteristickým pro kvasinky



Obr. 2. Glukózový efekt (represe a inhibice) u kmene T (1) a kmene 51 (2) v médiu s 2 % maltózy a po přidání 10 % glukózy. Abscisa — absorbance kvasinek v médiu, Ordináta — $\mu\text{l} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

svrchního kvašení [7, 8]. Jak už jsme se zmínili, druhým sledovaným jevem je glukózová represe maltózozymátového komplexu (obr. 2, tabulka 2). Kmen 51 je citlivější: po přidání glukózy do média s 2 % maltózy se fermentační aktivita snižuje a za 1 h činí hodnota $Q_{CO_2}^{N_2}$ pouze 33 % hodnoty v okamžiku přidání represoru (tab. 2). Po uplynutí dalších 1,30 h je inhibice zkvašování maltózy téměř úplná. Tyto změny v aktivitě fermentace jsou procentním vyjádřením množství reprimovaných a inhibovaných enzymů. Vyskytuje se nejen potlačení

syntézy, ale i inhibice maltózy-mázového komplexu [5]. Tyto výsledky je ovšem třeba vztahovat k dané koncentraci represoru a můžeme očekávat, že při jiném poměru induktor—represor se změní rychlost metabolických reakcí.

Bylo zjištěno, že permeáza maltózy je citlivější k účinkům glukózy než α -glukozidáza, a proto omezuje nebo zastavuje zkvašování maltózy [9, 10]. Velikost této inhibice je různá a závisí na vlastnostech kmenů. U kmene T po přidavku glukózy v době zdvojení kultury nebyly ovlivněny aktivita a syntéza enzymů maltózy-mázového komplexu. Represe se projevuje až po dvouhodinovém působení glukózy, avšak v podstatně menší míře než u kmene 51. Přitom se udržuje relativně vysoká hodnota $Q_{CO_2}^N$. Výsledky ukazují, že kmen si delší dobu uchovává adaptační schopnost zkvašovat maltózu a desadaptace snižuje kvašení na kritickou úroveň.

U kmene T jsme zjistili velmi slabou represí enzymů, charakteristickou pro kvasinky svrchního kvašení. U spodních kvasinek je citlivost ke glukózovému efektu doprovázena nejen represí, ale i inhibicí maltózo-permeázy.

Získané výsledky dovolují teoretické i praktické závěry. Byl zjištěn podstatný rozdíl v biochemické charakteristice dvou kmenů *Sacch. carlsbergensis*. Kvasinky *Sacch. carlsbergensis* a *Sacch. cerevisiae* se obvykle biologicky rozlišují podle využívání trisacharidu rafinózy. U obou zkoušených kvasinek jsme zjistili úplné zkvašování rafinózy, charakteristické pro *Sacch. carlsbergensis*. Fermentační schopnost a technologické vlastnosti je určují jako kvasinky spodního kvašení, a ve výrobním procesu se také tak používají. Podle růstové křivky a odezvy na glukózovou represí však musíme kmen T označit za kvasinku svrchního kvašení [3, 9]. Vzhledem k těmto vlastnostem je uvedený kmen *Sacch. carlsbergensis* výjimečný. Výsledky ukazují možnost existence přechodných forem mezi těmito dvěma blízkými biologickými druhy.

Analýza regulace metabolismu umožňuje zjistit důležité vlastnosti kvasinek, ukazující, do jaké míry mohou být ovlivněny technologickými podmínkami výroby, jako např. sacharidickým složením mladiny a obsahem aminodusíku. Zájem o „necitlivé“ kmeny s málo výraznou mírou represe je velký, protože se vyznačují stálou fermentační schopností, nezávislou na poměru glukózy a maltózy. Takové kmeny jsou zvláště vhodné pro zkvašování vysokostupňové mladiny, obohacené glukózou.

Přeložila Ing. M. Šestáková, CSc.

Literatura

- [1] MAGASANIK B.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **26**, 1961, s. 249.
- [2] KOTELNIKOVA A., ZVJAGIESKAJA P.: Biochimija drožževych mitochondrij. Izd. Nauka. Moskva 1973.
- [3] HABOUCHA J., MASSCHELEIN C.: Biochim. Biophys. Acta **38**, 1960, s. 1.
- [4] RAMOS-JEUNEHOMME C. aj.: Proceedings EBC. 1973, s. 111.
- [5] RAMOS-JEUNEHOMME C.: Repression et inhibition catabolique de la maltosylase et des enzymes respiratoires chez *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis*, Thèse de docteur, Bruxelles, 1973.
- [6] MASSCHELEIN C. aj.: Proceedings EBC, 1963, s. 381.
- [7] HABOUCHA J. aj.: Proceedings EBC, 1959 s. 157.
- [8] BLAUWE J.: Fermentation, 1969, č. 3, s. 109.
- [9] GORTS C.: Biochim. Biophys. Acta **184**, 1969, s. 299.
- [10] SIRO R., LOVGREN T.: Brewers Dig. 1980, č. 9, s. 34.

GINOVA-STOLJAVOVA, T.: Biochemická charakteristika kvasinek. Kvas. prům., **27**, 1981, č. 9, s. 200—203.

U dvou kmenů kvasinek *Sacch. carlsbergensis* byly sledovány některé teoreticky i prakticky významné bio-

chemické charakteristiky, jako jsou aerobní růst a respirace v médiu s 2 % a 0,15 % glukózy a fermentační aktivita kmenů na 2% maltóze po přidání 10% glukózy. Na rozdíl od kmene 51, vykazujícího při růstu na médiu s glukózou diauxický růst s prodlevou 5 h, nízkou respirační aktivitu a při růstu na maltóze citlivost ke glukózovému efektu, byly u kmene T zjištěny vlastnosti zcela výjimečné pro kvasinku *S. carlsbergensis*: aerobní růst kmene T na glukóze proběhl bez diauxie a s relativně vysokou respirační aktivitou (měřeno Q_{O_2} Warburgovým manometrickým přístrojem). Rovněž fermentační aktivita kmene T na maltóze byla relativně vysoká (měřeno $Q_{CO_2}^N$) a po přidání glukózy nebyla významně ovlivněna. Autorka zdůrazňuje význam analýzy regulace metabolismu pro praktické hodnocení a výběr kmenů spodních pivovarských kvasinek s nízkou citlivostí vůči glukózovému efektu.

ГИНОВА-СТОЛЯНОВА, Т.: Биохимическая характеристика дрожжей. Квас. прум., **27**, 1981, № 9, стр. 200—203.

Для двух штаммов дрожжей *Sacch. carlsbergensis* исследовались некоторые теоретически и практически значимые характеристики, как аэробный рост и дыхание в среде с 2 % и 0,15 % глюкозы и ферментативная активность штаммов на 2 %-ной мальтозе после прибавления 10 % глюкозы. В отличие от штамма 51, показывающего при выращивании в среде с глюкозой диауксический рост с выдержкой 5 ч, низкую респираторную активность и при росте на мальтозе чувствительность к глюкозному эффекту, в случае штамма Т были определены свойства весьма исключительные для дрожжей *Sacch. carlsbergensis*: аэробный рост штамма Т на глюкозе протекал без диауксии и с относительно низкой респираторной активностью (измерено Q_{O_2} манометрическим прибором Варбурга). Также ферментативная активность штамма Т на мальтозе была относительно высока (измерено $Q_{CO_2}^N$) и прибавление глюкозы не оказало на нее выразительного влияния. Автором подчеркивается значение анализа регулирования метаболизма для практической оценки и выбора штаммов пивных дрожжей с низкой чувствительностью к глюкозному эффекту.

GINOVA-STOLJANOV, T.: Biochemical characteristics of yeast. Kvas. prům., **27**, 1981, č. 9, s. 200—205.

Some theoretically and practically significant biochemical properties of two *Saccharomyces carlsbergensis* strains were followed, e. g. aerobic growth and respiration in 2% and/or 0,15% glucose medium and fermentation activity in 2% maltose + 10% glucose medium. In contrast to strain No. 51, which shows on the glucose medium diauxic growth with 5 h rest, low respiration activity and, if grows on maltose, sensibility to glucose effect, strain T showed properties very exceptional for *S. carlsbergensis*: this strain has grown aerobically on glucose without diauxic effect and with relatively high respiration activity to the Q_{O_2} as measured with Warburg's manometric apparatus. Fermentation activity of strain T on maltose was relatively high, too (when measured $Q_{CO_2}^N$) and it was not influenced significantly even after adding glucose. The author emphasizes importance of the metabolism control analysis for the brewing bottom yeast evaluation and their selection from the point of view of low sensibility toward dextrose effect.

G'anova-Stoljanova, T.: Biochemische Charakteristik der Hefen. Kvas. prům. 27, 1981, No. 9, S. 200—203.

Bei zwei Stämmen der Hefen *Saccharomyces carlsbergensis* wurden einige theoretisch und praktisch wichtige Charakteristiken, verfolgt, und zwar das aerobe Wachstum und Respiration im Medium mit 2 % und 0,15 % Glukose und die Fermentationsaktivität der Stämme auf 2 % Maltose nach Zugabe von 10 % Glukose. Zum Unterschied von dem Stamm 51, der beim Wachstum auf Glukose-Medium diauxisches Wachstum mit einer 5-stündigen Rast, eine niedrige Respirationsaktivität und beim Wachstum auf Maltose Empfindlichkeit zu dem Glukoseeffekt aufwies, wurden bei dem

Stamm T Eigenschaften festgestellt, die bei den Hefen *S. carlsbergensis* als außergewöhnlich erscheinen: das aerobe Wachstum des Stammes T auf Glukose verlief ohne Diauxie und mit einer relativ hohen Respirationsaktivität (Q_{O_2} mittels der Warburgschen manometrischen Apparatur gemessen). Auch die Fermentationsaktivität des Stammes T auf Maltose war relativ hoch und nach Zugabe von Glukose wurde die Fermentationsaktivität nicht wesentlich beeinflusst. Die Autorin unterstreicht die Bedeutung der Analyse der Regulation des Metabolismus für die praktische Bewertung und Auswahl der Stämme untergäriger Brauereihefen mit einer geringen Empfindlichkeit gegenüber dem Glukoseeffekt.