

Příspěvek k problematice autolyzační schopnosti pивovarských kvasinek

663.12

Prof. Dr. OLGA BENDOVI, DrSc., Přírodovědecká fakulta UK Praha,
VĚRA KURZOVÁ, prom. biol., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Autolýza kvasinek je proces, který v podstatě představuje „sebedestrukci“ buněk. Jeho výsledkem je převedení některých intracelulárních látek, především proteinů, z buňky do vnějšího prostředí. Tento proces má v praxi pozitivní i negativní význam.

V pozitivním smyslu se kvasničního extraktu, získaného autolýzou kvasnic, běžně používá jednak v potravinářství jako přísady k různým poživatinám a jednak jako zdroje živých látek při různých fermentačních výrobcích. V biochemickém výzkumu umožňuje autolýza kvasinek extrakci enzymů a jejich další purifikaci. Na tomto základě spočívá např. průmyslová výroba invertasy (β -4-fruktofuranosidasy 3.2.1.26) a je možná i příprava jiných enzymů z kvasnic [5, 23].

V negativním smyslu je autolýza kvasinek nežádoucím jevem v procesu výroby piva, kde může vést k nepříjemným příchutím výrobku a vytvářet příznivé podmínky pro vývoj bakteriálních kontaminantů. U pekařského droždí je autolýza příčinou měknutí, ztekucení a ztráty schopnosti působit kynutí těsta.

Biochemický proces autolýzy kvasinek není však dosud dořešen. Je však běžně známo, že nejvýznamnějším jevem je při něm uvolňování proteinů a aminokyselin do média v důsledku aktivace proteolytických enzymů, přecházejících z buněk také do vnějšího prostředí. V současnosti se uvádí existence 3 typů proteas, a to A, B, C [1, 2, 3, 4, 7] a *Hough* navíc uvedl ještě typ D [5, 6]. Proteasa A aktivuje proteasy B a C [3, 4]. Podle *Hougha* je proteasa A přítomna relativně v největším množství. U spodních pivovarských kvasinek je při teplotách vyšších než 30 °C ve srovnání s ostatními proteasami méně stálá a má pro aktivitu optimální pH 7,5. Podobně je tomu u svrchních pivovarských kvasinek (optimální pH pro aktivitu 7,3), zatímco u pekařských kvasinek je optimum nižší (pH 6,8). Optimální pH pro aktivitu proteas B a C je u spodních pivovarských kvasinek 6,2, u svrchních kvasinek pH 4,5 a 6,6 a u pekařských kvasinek pH 4,9 a 4,5. Pro proteasu D byla zjištěna optima pH 3,5 (spodní kvasinky), 6,3 (svrchní kvasinky) a 4,3 (pekařské kvasinky). Produkty činnosti proteasy A jsou aminokyseliny a nízkomolekulární peptidy. Naproti tomu proteasy typů B, C, D produkují peptidy o molekulové hmotnosti vyšší než 5 000. Zřejmě produkty ostatních enzymových typů jsou substrátem proteasy A. Optimální pH pro stabilitu všech typů proteas je 6,0–6,2.

U pivovarských kvasinek spodních i svrchních je pro aktivitu proteasy A optimální teplota 35°, pro proteasy B a C 50° a pro proteasu D 60°. Podobně u pekařských kvasinek má proteasa A optimum při 37°, proteasa B 51°, proteasa C 59° a proteasa D 66° [6].

Během autolýzy kvasinek se do média vylučují i nukleové kyseliny. Při sledování kultury *Sacch. carlsbergensis* pomnožené ve sladince a autolyzující při 45° a pH 6,5 v destilované vodě *Hough* zjistil, že se kyselina desoxyribonukleová v biomase snížila stejně, jako i přibývalo v médiu. Jinak tomu bylo s kyselinou ribonukleovou, jejíž koncentrace v prostředí byla nižší, než kolik odpovídalo jejímu úbytku v biomase. Autor prokázal, že v průběhu autolýzy při 30° kvasinky užívaly přidávanou ribosu. Vyslovil předpoklad, že při nedostatku jiného vhodného zdroje uhlíku pivovarské kvasinky upravují svůj

metabolismus, takže využívají ribosu, i když tomu tak běžně není. Při autolýze je tedy zřejmě RNA degradována činností ribonukleasy na nukleotidy, které jsou tak dále štěpeny fosfomonoesterasami na nukleosidy a organický fosfát. Nukleosidasy rozkládají nukleosidy na ribosu a na volnou bázi. Poté může být ribosa využívána kvasinkami hexosomonofosfátovou metabolickou drahou. Výsledkem je její konverze na hexosomonofosfát, který může být buňkou dále využit při glykolyse [5].

Vylučování cukrů z buněk během autolýzy je ve srovnání s exkrecí proteinů a nukleových kyselin malé. Buněčná stěna kvasinek zůstává v podstatě intaktní, takže živé a autolyzující buňky nelze mikroskopicky běžně rozlišit. Určitý podíl cukrů je však uvolňován z buněk ve formě glykoproteinů, které jsou dále štěpeny.

Autolýzu ovlivňují kultivační podmínky a mění se i optimum pH. Například kultura *Sacch. carlsbergensis* v aerovaném médiu snadno autolyzovala, zatímco kultura bez aerace vykazovala nižší míru autolýzy a optimum pH se snížilo z 5,0 na 4,6 [4]. Experimentálně bylo prokázáno, že kvasinky pěstované za příznivých podmínek autolyzují rychleji než v opačném případě. Ukázalo se však také, že k vytvoření proteolytických enzymů během kultivace je třeba, aby kultivační médium obsahovalo bílkoviny. V tomto směru je optimální živnou půdou mladina, zatímco médium obsahující jako zdroj dusíku pouze aminokyseliny nebo amonné soli je nevyhovující [5]. Cykloheximid jako inhibitor syntézy RNA a kobaltnaté ionty inhibující proteosyntézu (obojí v koncentraci 50 µg látky/ml), stimuluje vylučování proteinů a celkových dusíkatých látek při autolýze pivovarských kvasinek při 30°. Také manganaté a hořečnaté ionty (50 µg látky/ml) zvyšují proteolytickou aktivitu.

Zajímavý rozdíl byl také zjištěn mezi proteolytickými enzymy z lyzovaných kvasinkových protoplastů a proteasami z autolyzujících buněk [14]. Diference je především v tom, že první z nich neobsahují vázané cukry.

Pokud jde o lokalizaci proteolytických enzymů v kvasinkové buňce, nacházejí se tyto spolu s dalšími hydrolasami ve vakuolách. Uvádí se však také, že partikulární obsahující proteasy jsou vesikuly odvozené od endoplasmatického retikula, které se shromažďují na začátku tvorby pupene v blízkosti plasmatické membrány a reversní pinocytosou (fúzí stěny vesikulu s membránou) převádějí v nich látky přes membránu v místech, kde se tvoří pupen. Enzymový obsah těchto vesikulů působí změny buněčné stěny při tvorbě pupene [15, 16].

Při souhrnu dosavadních názorů na mechanismus autolýzy kvasinek je třeba zdůraznit význam vyšších teplot a jimi ovlivněné složení kvasnic jako směsi buněk živých, umíraících a mrtvých. Buňky postrádají živné látky a ve stavu snížené vitality se mění permeabilita jejich plasmatické membrány. Jejich buněčný obsah se uvolňuje do média.

Otázka procesu autolýzy kvasinek není stále ještě dořešena, přestože i bylo zhruba před 25 lety věnováno dosti práce [9, 10, 11, 12] a nešla zájmu vědeckých pracovníků ani v uplynulém desetiletí [5, 6, 13] právě tak jako problematika proteolytických enzymů u kvasinek. V této souvislosti je však třeba brát v úvahu i možnou exkreci různých sloučenin z kvasnic.

Tuto otázku nastolili na základě výsledků svých prací Lewis a Phaff [8], kteří se zabývali vylučováním aminokyselin a nukleotidů z kvasnic za různých podmínek. Z toho tedy plyne, že uvedená problematika vzhledem k svému významu pro praxi zasluhuje, aby jí byla ve výzkumné činnosti věnována dostatečná pozornost.

Posuzování a výběr pivovarských kvasinek je trvalým úkolem mikrobiologického oddělení Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského. Kromě běžných kritérií významných z hlediska praktického použití kvasnic se přistoupilo k průzkumu možnosti hodnotit kmeny pivovarských kvasinek podle jejich tendence k autolýze.

Z tohoto hlediska byly provedeny zkoušky se 14 kmeny pivovarských kvasinek ze sbírky VÚPS, při nichž byla míra autolýzy posuzována podle množství aminodusíku obsaženého v autolyzátu.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Autolyzační schopnost kvasničných kmenů

Kmen č.	mg amino N/100 mg sušiny kvasinek	
	I	II
1	2,59	2,72
2	2,12	2,20
3	1,38	1,57
4	1,12	1,39
5	1,77	1,86
7	1,49	1,57
7/18	1,58	1,69
9	1,62	1,69
12	1,79	1,92
89	1,95	2,29
96	2,07	2,25
105	2,13	2,20
106	2,15	2,43
108	2,04	2,27

Číslo kvasničných kmenů podle Katalogu kultur kvasinek [Kocková [21]]

Kmen č. 7/18 je klon odvozený od kmene č. 7

Z tabulky je zřejmé, že mezi kmeny existují v jejich autolyzační schopnosti rozdíly. Největší rozdíl byl zaznamenán mezi kmeny č. 1 s největší tvorbou aminodusíku a kmenem č. 4 s jeho relativně nejnižší produkcí.

V další části práce byla pozornost zaměřena na sledování závislosti proteolytické aktivity provozně vedených kvasnic na čase a teplotě. V tomto případě byla proteolytická aktivita stanovována na principu měření množství rozštěpeného azokaseinu za podmínek přesně daných metodikou [4]. Této metodě byla dána přednost před stanovením proteolytické aktivity podle *Slavíka-Smetany* [17], protože na základě výsledků experimentálního ověření nebyl tento postup pro daný účel optimální. Vzorky kvasnic odebraných z provozu (úprava zhruba na konzistenci lisovaných kvasnic) byly ponechány při teplotách 30–45° po dobu 20 až 48 hodin.

Výsledky měření udává tabulka 2.

Ze změřených hodnot je zřetelný pokles proteolytické aktivity, zaznamenaný při prodloužené době autolýzy od 42 hodin při 40° u vzorků č. 2 a 96. Toto snížení se projevilo zejména při vyšší teplotě, tj. při 45°. V tomto případě byl vedle uvedených vzorků zřejmý pokles aktivity i u vzorku č. 3.

Z těchto výsledků by se dalo soudit na kmenové rozdíly ovlivňující aktivitu proteolytických enzymů. Je však třeba vzít v úvahu, že byly porovnávány kvasnice, které nebyly vedeny za stejných podmínek. Se zřetelem k této skutečnosti budou provedeny další ověřovací zkoušky, o jejichž výsledku bude referováno později.

Tabulka 2. Proteolytická aktivita kvasnic v závislosti na čase a teplotě (mg azokaseinu/ml)

Kmen č.	čas [h]	Teplota [°C]			
		30°	35°	40°	45°
2	20	*)	*)	0,17	0,17
	24	*)	*)	0,23	0,32
	42	*)	0,11	0,73	0,43
	48	*)	0,14	0,54	0,32
3	20	0,02	0	0	0
	24	0,06	0,08	0	0
	42	0,11	0,10	0,11	0
	48	0,12	0,17	0,12	0,02
7	20	*)	0,02	0,03	0
	24	*)	0,05	0,08	0,02
	42	0,05	0,05	0,10	0,06
	48	0,05	0,05	0,11	0,09
10	20	*)	0,05	0,05	0,04
	24	*)	0,10	0,09	0,09
	42	0,05	0,16	0,15	0,14
96	20	*)	0,05	0,15	0,37
	24	0,02	0,08	0,24	0,47
	42	0,06	0,18	0,57	0,12
	48	0,09	0,29	0,48	0,10

*) Kvasnice neautolyzují

Literatura

- [1] PRINGLE J. R.: Proc. IV. Intern. Symp. on Yeasts, Vienna, 1974, s. 73
- [2] LENNEY, J. E. Y.: J. Bact. **102**, 1975, s. 1265
- [3] SAHEKI, I. - HOLZER, B.: Biochem. Biophys. Acta, **384**, 1975, s. 384
- [4] BERAN, K. - BĚHALOVÁ, B.: Fol. Microbiol. **24**, 1979, s. 455
- [5] HOUGH, J. S. - MADDOX, I. S.: Process Biochemistry, **5**, 1970, s. 50
- [6] MADDOX, I. S. - HOUGH, J. S.: Biochem. J. **117**, 1970, s. 843
- [7] HATA, I. - HAYASHI, R. et al.: Proc. IV. IFS Ferment. Technol. Today, 1972, s. 279
- [8] LEWIS, M. Y. - PHAFF, H. Y.: Proc. A SBC, 1963, s. 100
- [9] JOSLYN, M. A.: Wall. Lab. Comm. **18**, 1955, s. 107
- [10] JOSLYN, M. A.: Wall. Lab. Comm. **18**, 1955, s. 191
- [11] VOSTI, D. C. - JOSLYN, M. A.: Appl. Microbiol. **2**, 1954, s. 79
- [12] KULKA, D.: J. Inst. Brew. **59**, 1953, s. 285
- [13] BRENNER, M. W. - LAUFER, L. - HSU, W. P.: Proc. Annual Meeting A SBC 1973, s. 53
- [14] MATILE, P. - WIEMKEN, A.: Arch. Microbiol. **56**, 1967, s. 148
- [15] SENDADIEU, NORTHCOLE, D. H.: J. Gen. Microbiol. **55**, 1967, s. 393
- [16] MOOR, H.: Arch. Microbiol. **57**, 1967, s. 135
- [17] SLAVÍK - SMETANA, V.: Chem. listy **46**, 1952, s. 649
- [18] FABIÁN, F.: Folia Microbiol. **15**, 1970, s. 160
- [19] HANSEN, G. G. et al.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **130**, 1965, s. 761
- [20] SATAKE, L. - OKUYAMA, I.: J. of Biochem. Tokyo **47**, 1960, s. 654
- [21] KOCKOVÁ, A. - KRATOCHVÍLOVÁ: Katalog kultur kvasinek, Veda, SAV Bratislava, 1973
- [22] HELM, E.: Wall. Lab. Comm. **16**, 1953, s. 315
- [23] CICHOSZ, G. et al.: Mschr. Brauerei **1980**, s. 100

Bendová, O. - Kurzová, V.: Příspěvek k problematice autolyzační schopnosti pivovarských kvasinek. Kvas. prům. 27, 1981, č. 10, s. 225–227.

Článek obsahuje výsledky průzkumu možnosti hodnocení kmenů pivovarských kvasinek z hlediska jejich autolyzační schopnosti. Autolýza kvasinek představuje při nedodržování vhodných technologických podmínek výroby nebezpečí pro vznik autolyzačních příchutí výrobku a snížení jeho biologické stálosti. Uvedené výsledky jsou první informací o řešení této problematiky ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, na kterou navazuje podrobnější výzkumná práce.

Бендова, О., Курцова, В.: К проблематике способности автолиза пивоваренных дрожжей. Квас. прум., 27, 1981, № 10, стр. 225—227.

Статья содержит результаты исследования возможности оценки штаммов пивоваренных дрожжей с точки зрения их способности автолиза. Автолиз дрожжей при несоблюдении благоприятных технологических условий представляет собой опасность возникновения привкуса, вызванного автолизом и понижения биологической устойчивости продукта. Приведенные результаты являются первой справкой о решении этой проблематики в НИИ пивоварения и солодоращения, за которой следует более подробная исследовательская работа.

Bendová, O. - Kurzová, V.: A Contribution to the Problem of Brewery Yeast Autolyzing Capability. Kvas. prům. 27, 1981, No. 10, s. 225—227.

The article comprises results of study dealing with the possibility of brewery yeast strain evaluation from standpoint of their autolyzing capability. Yeast autolysis

can cause formation of autolyzing flavours of the final product and decrease its biological stability. The results presented here are the first communication how this problem is solved in the Research Institute of Brewing and Malting Industry. The publication giving full details is under preparation.

Bendová, O. - Kurzová, V.: Beitrag zur Problematik der Autolysefähigkeit der Bierhefen. Kvas. prům. 27, 1981, No. 10, S. 225—227.

Der Artikel enthält die Ergebnisse einer Studie, in der die Möglichkeit verfolgt wurde, die Bierhefestämme vom Standpunkt ihrer Autolysefähigkeit zu beurteilen. Die Autolyse der Hefe stellt bei Nichteinhaltung geeigneter technologischer Produktionsbedingungen eine Gefahr der Entstehung des Autolysegeschmacks und Verkürzung der biologischen Haltbarkeit dar. Die im Artikel angeführten Ergebnisse wurden im Rahmen der Angangsetappe einer Forschungsarbeit des Forschungsinstituts für Brauerei und Mälzerei in Prag gewonnen; das Thema wird gegenwärtig ausführlicher bearbeitet.