

Frakcionácia kvasničnej biomasy

VII. Spracovanie a využitie polysacharidových frakcií droždia

Ing. ROMAN KOLLÁR, Doc.Ing.ERNEST ŠTURDÍK, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Bratislava

RNDr.JOZEF ŠANDULA, CSc., Chemický ústav SAV, Bratislava

Doc.Ing.MIROSLAV FERENČÍK, DrSc., Lekárska fakulta UK, Bratislava

Doc.Ing.ERICH MINÁRIK, DrSc. Komplexný výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, Bratislava

Ing.JOZEF ŠVORC, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Bratislava

579 663

Kľúčové slová: *biomasa kvasiniek, frakcionácia droždia, bunkové steny, invertáza, β -glukán, manán, manánproteíny*

TEORETICKÝ ÚVOD

Glykoproteínový skelet kvasiniek predstavuje výhodnú surovinu na získavanie glukánov [1,2], manánov a manánproteínov [3,4], ako i bunkových stien [5], ktoré nachádzajú významné uplatnenie najmä v medicíne a v potravinárstve. Izolovaný β -D-glukán pôsobí aktivačne na imunitný systém organizmov a vykazuje tiež výrazné protinádorové, rádioprotektívne a imunoadjuvantné účinky, pri súčasnej nepatrnej toxicite a minimálnych vedľajších efektoch, ďalej sa uplatňuje priamo

ako adjuvans pri príprave vakcín alebo niektorých topických aplikáciách, rozpustné deriváty glukánov sa začínajú využívať v terapii niektorých nádorov a infekčných ochorení a slúžia ako nosiče liečiv so špecifickými depotnými účinkami [6,7,8]. Nízko-molekulové oligosacharidy majú funkciu elicitorov, ktoré spúšťajú obranné mechanizmy rastlín a zvyšujú odolnosť voči vírusovým, bakteriálnym a hubovitým ochoreniam [9,10]. Podobné ochranné účinky vykazujú tiež deriváty manánov, napr. sulfáty [11]. Manánproteíny sa vyznačujú veľmi dobrými emulzifikačnými vlastnosťami (bioemulgátory) [12]. Preparáty suše-

ných bunkových stien kvasiniek stimulujú alkoholové kvasenie muštu v sťažených podmienkach, napr. v ostrofiltrovaných muštoch, v muštoch s vyššou koncentráciou cukru, resp. zvyškami fungicídov alebo iných inhibítorov [13].

Vyššie spomínané polysacharidové preparáty sa získavajú jednotlivito z viacerých druhov kvasničnej biomasy rôznymi dezintegračnými a izolačnými postupmi [1,3,14]. Na našom pracovisku bol vypracovaný postup komplexnej frakcionácie pekárskeho droždia, ktorý popri sacharidových preparátoch umožňuje súčasne získavanie ďalších frakcií, predovšetkým kvasničného extraktu, invertázy, ergosterolu atď. [15-18]. Tento článok je venovaný zhodnoteniu polysacharidovej frakcie droždia, t.j. získavaniu a využitiu celých bunkových stien i purifikovaného β -glukánu pekárskeho kvasiniek v medicíne, vinárstve a analytickej chémii.

MATERIÁL A METÓDY

Východiskovou surovinou pre experimenty bolo lisované pekárske droždie (Potravínarský kombinát, droždiareň, Trebišov), ktoré sme dezintegrovali po nariadení vodou na 10%-nú suspenziu indukovanou autolýzou [19]. Autolýzát získaný po 24-hodinovej iniciovanej autolýze sme spracovali postupom komplexnej frakcionácie [19-21] na ergosterol a fosfolipidy, invertázu, kvasničný extrakt, bunkové steny a β -glukán. Preparát bunkových stien bol pripravený vysušením premytého sedimentu (Niro Atomiser, Dánsko, vstupná teplota 165 °C, výstupná 95 °C) získaného centrifugáciou autolýzáta (Alfa Laval, BRPX, Švédsko). Získaný preparát (BIOS 24) bol pridávaný ako biosorbent paralelne s komerčným preparátom (YW Fould-Springer, Maison-Alfort, Francúzsko) do muštu s obsahom sacharidov 276 g.l⁻¹, ktorý bol pripravený riedením za tepla a vo vákuu zahusteného muštu vodovodnou vodou. Ako modelové inhibitory kvasenia boli použité komerčné fungicídy Ronilan (BASF, SRN), Ridomil plus 48 WP (Ciba Geigy, Švajčiarsko), Euparen (Bayer A.G., SRN), Sandofan C (Sandoz, Švajčiarsko), ktoré boli pridané do muštu pred kvasením v množstve 10 mg.ml⁻¹. Mušt bol zakvasený alkoholrezistentným kmeňom *Saccharomyces cerevisiae* 76/O, resp. *S. oviformis* RIVE 15-1-467 (KVÚVV, Bratislava). Použil sa 3%-ný zákvas 3-dňovej kultúry (koncentrácia buniek v zákvas 4,95.10⁸ ml⁻¹). Kvasenie prebiehalo v 500 ml kvasných fľašiach s 300 ml muštu, ktorý bol sterilizovaný v prúdiacej pare pri 100 °C (3-krát 30 min v 24-hodinových intervaloch). Po vychladnutí na 25 °C sa do muštu dával biosorbent, resp. inhibítor a napokon sa mušt zaočkoval kvasinkami. Kvasné fľaše sa uzavreli kvasnou trubicou s glycerolom a korkové zátky sa utesnili parafínom. Kvasenie prebiehalo pri 24-25 °C za semianaeróbných podmienok. Registroval sa úbytok hmotností odpovedajúci odkvasovaniu sacharidov, ktorý je ekvivalentný vzniknutému CO₂.

Ďalej bol preparát bunkových stien, ktorý si zachováva značnú aktivitu invertázy, využitý pri príprave sacharózovej elektródy. Biokatalytické membrány s invertázovou aktivitou boli pripravené zosieťovaním bunkových stien (4 μ l suspenzie o sušine 100 mg.ml⁻¹), s glukózaoxidázou (GOD; 3 μ l preparátu fy Boehringer, SRN; špecifická aktivita 400 μ kat.ml⁻¹) a hovädzím sérovým albumínom (BSA; Serva, SRN; 8 μ l roztoku o koncentrácii 100 mg proteínov v 1ml) účinkom 2,5 %-ného roztoku (2,4 μ l) glutardialdehydu (GDA; Serva, SRN) na polyamidovej sieťke. Vysušená membrána sa pripevnila na polypropylénovú membránu Clarkovej kyslíkovej elektródy (typ SOPS 31, Chemoprojekt, Praha) pomocou gumového prstenca. Meranie sa uskutočnilo v oplášťovanej temperovanej nádobke pri teplote 37 °C. Senzor sa ponoril do vytemperovaného 0,8 mol.l⁻¹ fosfátového tlmivého roztoku o pH 7,8 saturovaného kyslíkom (prebublávaním vzduchom). Po ustálení prúdu sa do nádobky pridal štandard sacharózy, resp. vzorka a časový priebeh prúdu sa

zaregistroval na zapisovači. Výška zaznamenatej vlny (pokles prúdu) je úmerná koncentrácii sacharózy. Meranie prúdu sa uskutočnilo pomocou polarografického analyzátoru PA-4 (Laboratorní přístroje, Praha) vybaveného zapisovačom XY 4106 (Laboratorní přístroje, Praha). Časová os zapisovača bola riadená prostredníctvom počítača PMD-85 cez prevodník DA-8B (Katedra analytickej chémie CHITF SVŠT). Výsledky získané stanovením sacharózy pomocou sacharózového senzora boli porovnané s obsahmi nameranými glukózovou enzýmovou elektródou (vyrobenou na Katedre analytickej chémie CHITF SVŠT) s využitím komerčnej glukózaoxidázy (Serva, SRN), po hydrolýze sacharózy invertázou pridanou do vzorky (50 μ l suspenzie bunkových stien o koncentrácii 300 mg.ml⁻¹ s aktivitou 300 μ kat na 1 ml vzorky).

Kvasničný β -glukán bol izolovaný zo sedimentovateľnej frakcie autolýzáta, po delipidizácii (izolácia ergosterolu a fosfolipidov [21]), extrakciou s 3%-ným NaOH (na 1 g sušiny sa použilo 5 ml roztoku) za stáleho miešania cez noc pri laboratórnej teplote a potom 2 h pri 100 °C. Suspenzia sa odstredila, sediment sa premyl vodou, neutralizoval s HCl a znovu 2-krát premyl vodou. Sediment sa ďalej extrahoval 2%-nou HCl (alebo 5%-nou kyselinou fosforečnou) 1 h pri 100 °C, odstredil a niekoľkokrát premyl vodou. Takto získaný partikulárny glukán sme lyofilizovali alebo vysušili v rozprašovacej sušiarňi, resp. desolvatovali etanolom a etyléterom. Pre porovnanie bol v paralelných experimentoch izolovaný glukán z intaktnej biomasy viacnásobnou extrakciou lúhom a HCl (resp. kyselinou octovou) pri teplote 90 °C a taktiež z nedelipidizovaného sedimentu biomasy pekárskeho droždia po autolýze (24 h pri 55 °C v termostate), ktorý sme získali po nariadení autolýzátu vodou (v pomere 1:1) a centrifugácii (Janetzki K 70, Poľsko, frekvencia otáčok 2500 min⁻¹, 50 minút). Povrchové manány sme získali zo supernatantu po extrakcii biomasy roztokom lúhu, vyžrážaním Fehlingovým reagensom. Obsah sušiny a popola vo vzorkách sa stanovil gravimetricky štandardnými metódami [22]. Analýza celkového dusika sa uskutočnila na elementárnom analyzátore Perkin Elmer 240 (USA). Obsah monosacharidov vo vzorkách bol stanovený po totálnej hydrolýze polysacharidu (6 mol.l⁻¹ HCl pri 100 °C po dobu 8 h) a prevedení na alditolacetáty plynovou chromatografiou (5700 A Hewlett-Packard, USA). IČ spektrá polysacharidov boli namerané na prístroji Perkin Elmer 983 G (USA) v tabletách KBr, NMR spektrá na spektrometri Bruker AM 300 (USA).

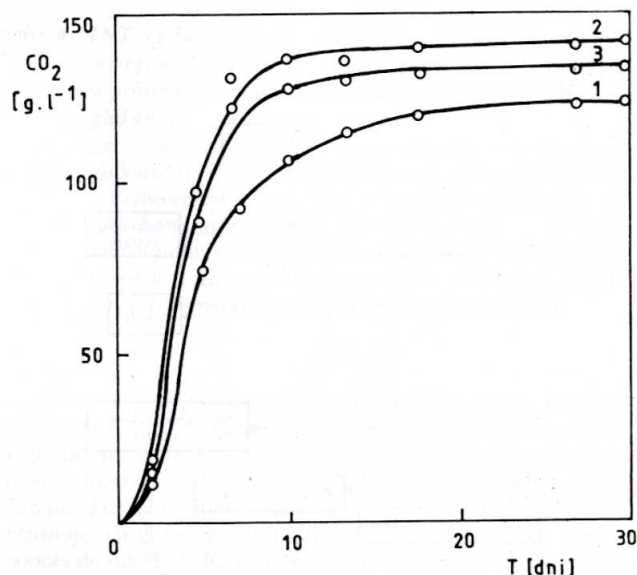
Okrem partikulárneho β -1,3-glukánu (Go) sme pripravili aj jeho rozpustné deriváty a to sulfoetylglukán (G₁), sulfopropylglukán (G₂), karboxetylglukán (G₃) a karboxymetylglukán (G₄) s rôznym stupňom substitúcie (SS) metylovými skupinami (G_{4A} - SS = 0,91, G_{4B} - SS = 0,76) [23,24].

Imunomodulačná aktivita glukánových preparátov sa zisťovala na základe ich vplyvu na INT-reduktázovú aktivitu ľudských polymorfonukleárných leukocytov in vitro, alebo peritoneálnych makrofágov morčiat in vitro [25]. V prípade peritoneálnych makrofágov sa zisťovala aj ich schopnosť usmrcovať kvasinky *Candida albicans* [26]. Pri pokusoch in vitro sa inkubovali polymorfonukleárne leukocyty, izolované z ľudskej periférnej krvi, s jednotlivými glukánovými preparátmi a zisťovala sa potom schopnosť leukocytov redukovať INT (jódinitrotetrazóliumchlorid) za vzniku farebného formazánu. Stupeň tejto redukcie umožňuje posúdiť metabolickú aktivitu leukocytov, ktorá je úmerná ich schopnosti usmrcovať mnohé poškodené mikroorganizmy.

V pokusoch in vivo sme používali morčatá s priemernou hmotnosťou 400 g. Zvieratá sme rozdelili na pokusné a kontrolné skupiny. Každé zo zvierat pokusných skupín dostalo 13, 9 a 5 dní pred odberom makrofágov glukánový preparát (Go - nerozpustný glukán, G₁ - rozpustný sulfoetylglukán alebo G_{4A} - rozpustný karboxymetylglukán) v množstve 10 mg na 1 kg živej hmotnosti, suspendovaný alebo rozpustený v 2 ml PBS (fosfátom tlmivý fyziologický roztok). Morčatá z kontrolnej skupiny dostávali len PBS. Makrofágy sa izolovali po usmrtení morčiat výplachom ich brušnej dutiny.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našich predchádzajúcich článkoch publikovaných na tému frakcionácia kvasničnej biomasy sme informovali o možnostiach získavania a využitia niektorých preparátov pripravených z pekárskoho droždia [15-18] po indukovaní autolýzou [27]. Tento príspevok je orientovaný na zúžitkovanie komponentov bunkovej steny, ktoré sa získavajú zo sedimentovateľnej frakcie po centrifugácii autolýzátu kvasničnej biomasy. Sediment autolýzátu sa skladá v prevažnej miere z polysacharidov (70-75 %). Proteíny a nukleové kyseliny predstavujú cca 20 % a zvyšok tvoria lipidy, ktoré po autolýze zostanú viazané na stenové fragmenty. O problematike izolácie a frakcionácie lipidov už bolo podrobnejšie pojednané [24]. Ďalším preparátom, ktorý je možné pripraviť zo sedimentu autolýzátu pekárskoho droždia, sú bunkové steny, ktoré sa získavajú priamo vysušením premytého sedimentu v rozprašovacej sušiarňi. Sušené bunkové steny nachádzajú významné uplatnenie vo vinárstve pri stimulácii či regulácii alkoholového kvasenia hroznových muštov v nepriaznivých fermentačných podmienkach kvasiniek, vyvolaných prítomnosťou rôznych inhibítorov (často rezíduí pesticídov). V našich experimentoch sme na testovanie účinku bunkových stien použili mušty bez a s prídavkom inhibítorov kvasenia (fungicídy Euparen, Ridomil, Ronilan, Sandofan) a pre porovnanie sme v rovnakých podmienkach aplikovali komerčne vyrábaný stimulant kvasenia na báze sušených bunkových stien (YW). Priebeh alkoholového kvasenia bol registrovaný úbytkom hmotnosti odpovedajúcej odkvasovaniu sacharidov, ktorý je ekvivalentný vzniknutému CO_2 . Na obr. 1 je zaznamenaný

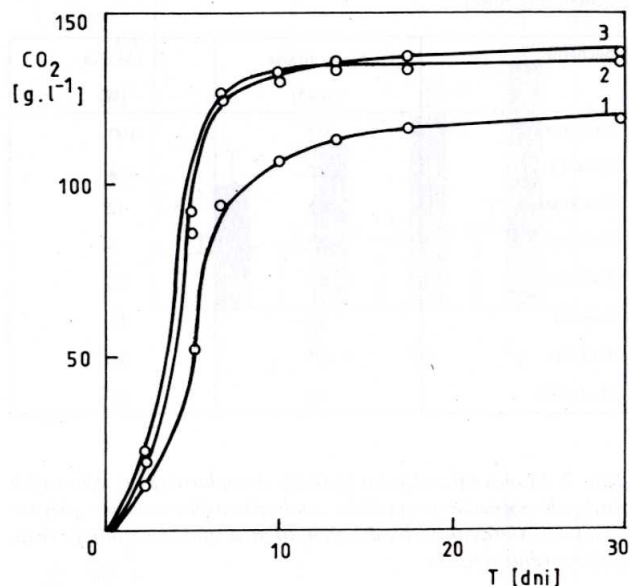


Obr. 1. Vplyv bunkových stien ako biosorbentov na priebeh kvasenia hroznového muštu

- 1 - kontrolný mušt bez biosorbentu
- 2 - mušt s prídavkom YW (Fould-Springer) 300 mg.l⁻¹
- 3 - mušt s prídavkom BIOS 24 (CHTF SVŠT) 300 mg.l⁻¹

účinnosť prídavku preparátov bunkových stien (BIOS 24 a YW v koncentrácii 300 mg.l⁻¹) v porovnaní s kontrolným muštom (bez prídavku biosorbentu a fungicídov), pričom je z obrázku zrejmé, že priebeh kvasenia v kontrolnom mušte je pomalší a menej dokonalý. Z viacerých experimentov realizovaných s prídavkom inhibítorov kvasenia sme na ilustráciu účinku biosorbentov vybrali jeden (zaznamenaný na obr. 2), v ktorom bol ako inhibítor kvasenia použitý preparát Ronilan. Prídavok bunkových stien umožnil rýchlejšie a kompletnejšie skvasenie

muštu, ako v prípade kontroly bez biosorbentu. Podobný efekt bol pozorovaný aj v prípade ostatných použitých inhibítorov (Euparen, Ridomil a Sandofan C). Mladé vína boli po dokvasení podrobené chemickej analýze, pričom sa zistilo, že prakticky vo všetkých vzorkách s prítomnosťou biosorbentu sa dosiahol vyšší obsah alkoholu v porovnaní s kontrolným muštom a nižší obsah prchavých kyselín. Celkovo možno zhrnúť, že mušty v prítomnosti biosorbentu majú lepší priebeh kvasenia a takéto vína vykazujú priaznivejšie parametre ako vína bez prídavku bunkových stien. Okrem laboratórnych experimentov sa preparáty bunkových stien odskúšali tiež v prevádzkových podmienkach vo Vinárskych závodoch v Pezinku pri kvasení "problematických" muštov (v objeme 150 hl), pričom ich vplyv na priebeh fermentácie bol pozitívne hodnotený.



Obr. 2. Priebeh kvasenia hroznového muštu s prídavkom inhibítora Ronilan v koncentrácii 10 mg.l⁻¹ bez (1) a v prítomnosti biosorbentu YW (2), resp. BIOS 24 (3) vo výsledných koncentráciách 300 mg.l⁻¹

Originálne využitie menšieho množstva preparátu bunkových stien je možné pri konštrukcii enzýmovej elektródy na priame stanovenie sacharózy, kde sa využíva aktivita invertázy, ktorá je imobilizovaná na prirodzenom nosiči paralelne s pridanou glukózooxidázou. Takýto typ analytického senzora môže nájsť široké uplatnenie napr. vo fermentačnom priemysle, ako aj pri stanovení sacharózy v rôznych druhoch potravinárskych výrobkov.

Sacharózový biosenzor pozostáva z biokatalytickej membrány, obsahujúcej koimobilizované bunkové steny kvasiniek spolu s glukózooxidázou, pripevnenej na aktívny povrch Clarkovej kyslíkovej elektródy. Sacharóza podlieha v membráne hydrolýze katalyzovanej invertázou obsiahnutou v bunkových stenách na α -D-glukózu a fruktózu, α -D-glukóza mutarotuje na β -D-glukózu, ktorá je následne oxidovaná za katalytického účinku glukózooxidázy, pričom sa spotrebúva kyslík. Zmena koncentrácie kyslíka sa meria Clarkovou elektródou a je úmerná koncentrácii sacharózy.

Doposiaľ známe sacharózové senzory využívajú kombináciu troch purifikovaných enzýmov [28-30]. Invertázu, mutarotázu katalyzujúcu mutarotáciu α -D-glukózy na β -D-glukózu a glukózooxidázu. V neprítomnosti mutarotázy je citlivosť senzora nízka a časová odpoveď dlhá, nakoľko glukózooxidáza má nízku substrátovú špecifickosť pre α -D-glukózu a odozva elektródy je potom daná priebehom spontánnej mutarotácie. V prípade nášho senzora sme efekt mutarotázy nahradili jednoduchým urýchľovačom mutarotácie, t.j. zvýšenou koncentráciou fosforečnanov v tlmivom roztoku.

Stabilita nášho senzora je porovnateľná s trojenzymovými sacharózovými senzormi [28,29]. Po dvoch mesiacoch jeho používania sa stratilo len 5 % pôvodného signálu. Senzor bol uskladňovaný vo fosforečnanovom tlmivom roztoku pri laboratórnej teplote.

V ďalšej časti práce sme sledovali vplyv niektorých vybraných sacharidov na odozvu sacharózového senzora. Výsledky testovania sú uvedené v tab. 1. Najvýraznejší efekt sa samozrejme prejavil v prípade glukózy vďaka prítomnosti glukózooxidázy v biokatalytickej vrstve. Vplyv galaktózy a maltózy je podstatne menší, avšak v konečnom dôsledku môže viesť k pozitívnym chybám.

Tab. 1. Interferenčné vplyvy vybraných sacharidov na odozvu enzýmovej elektródy pripravenej zosieťovaním bunkových stien a glukózooxidázy

Sacharid	Koncentrácie (mol/l)	Odozva (%)
Sacharóza	0,5	100
Glukóza	0,5	447
Galaktóza	0,5	12
Maltóza	0,5	3
Rafinóza	0,5	0,5
Laktóza	0,5	0,5
Fruktóza	0,5	0,5
Arabinóza	0,5	0,5

Tab. 2. Stanovenie obsahu glukózy a sacharózy vo vybraných druhoch potravín s využitím sacharózového senzora pripraveneho zosieťovaním bunkových stien a glukózooxidázy, resp. glukózového senzora

Vzorka	Koncentrácie glukózy (mg.g ⁻¹)	Koncentrácie sacharózy	
		hydrolýza/glukóz. elektroda c(mg.g ⁻¹) ⁺ c(mg.ml ⁻¹)	sacharózová elektroda c(mg.g ⁻¹)
Dia pomerančový džús	6,6	0,0	0,0
Dia slivkový kompót	47,0	0,0	0,0
Višňový mušt	12,8	82,0	75,0
Coca-cola	0,0	101,0	86,0
Grapefruitový džús v prášku ⁺	16,4	640,0	715,0
Dia marhuľový ⁺			
džem	235,0	0,0	0,0
Med ⁺	295,0	0,0	0,0
Šumienka ⁺	0,0	262,0	260,0

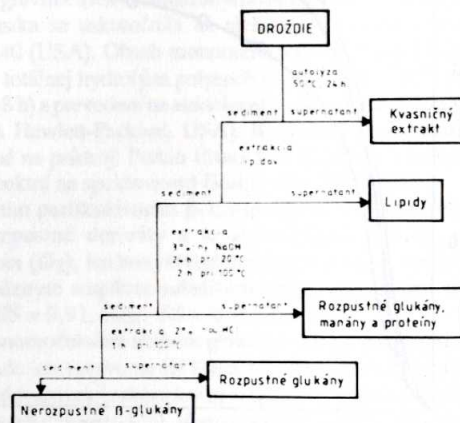
Náš sacharózový senzor bol ďalej využitý pri stanovení obsahu sacharózy v rôznych druhoch potravín. Získané obsahy sa porovnávali s obsahmi nameranými pomocou glukózovej enzýmovej elektródy po hydrolýze sacharózy invertázou pridanou do vzorky. Výsledky stanovení sacharózy spolu s nameranými obsahmi glukózy sú zhrnuté v tab. 2. Relatívne smerodajné odchýlky sa pohybovali v intervale 0,8-3 % v závislosti od

povahy vzorky a koncentrácie sacharózy. Okrem toho sa senzor použil pri stanovení sacharózy v rôznych sacharózových rafinátach a sirupoch, pričom sa dosiahla vysoká spoľahlivosť výsledkov v porovnaní s klasickými analytickými metódami.

Izolácia β -glukánov z bunkovej steny kvasiniek sa zakladá na skutočnosti, že zo všetkých komponentov sú bunky chemicky najstabilnejšou, vo vode, zriedených alkáliách a kyselinách najmenej rozpustnou zložkou. Postupným pôsobením zriedených roztokov zásad a kyselín sa odstraňuje bielkoviny, nukleové kyseliny, glykoproteíny, manány a značná časť rozpustnejších glukánov, ktoré sú funkčne i štrukturálne odlišné od fibrilárnych β -D-glukánov. Preverili sme niekoľko postupov získavania β -glukánov z bunkového sedimentu stien po autolýze. Autolýza zjednodušuje proces izolácie β -glukánov a jednorazovou alkalickou a kyslou extrakciou sa získava produkt vysokej čistoty. Ako vyplýva z tab. 3, výtlačky β -glukánov z intaktných a autolyzovaných buniek sa pohybujú medzi 5,5-6 % vzhľadom na sušinu pôvodnej biomasy.

Tab. 3. Výtlačky β -glukánu a α -manánu z 1 kg droždia (sušina 27,2 %)

	Intaktné bunky		Autolýzát			
			55 °C		50 °C; NaCl, + ctanol, lyzát	
	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
β -glukán	16,3	5,95	15,7	5,77	15,6	5,75
α -manán	7,69	2,83	4,27	1,57	3,64	1,33

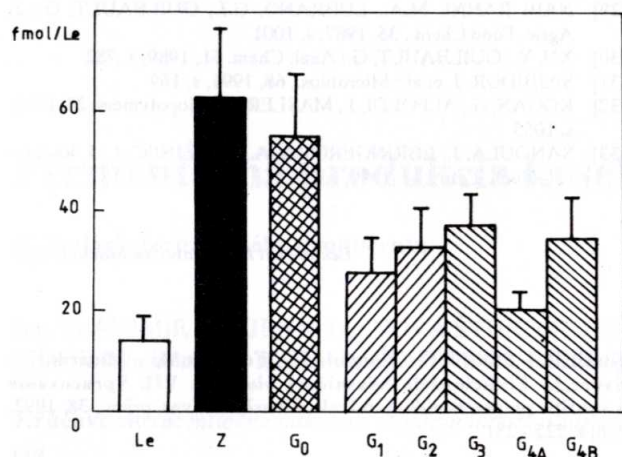


Obr. 3. Postup izolácie β -glukánov po autolýze a delipidizácii pekárského droždia

Na druhej strane výtlačok povrchového manánu po autolýze je podstatne nižší. Z intaktných buniek (1 kg droždia, sušina 27 %) sme získali 2,83 g, po autolýze (pri teplote 55 °C) klesol výtlačok temer o 50 % a po iniciovanej autolýze ešte viac. Tento fakt možno vysvetliť tým, že v priebehu autolýzy dochádza k odštiepeniu povrchových glykoproteínov, teda i manánov, vplyvom vlastných enzýmov bunkovej steny. Povrchové manány a manánproteíny sú zodpovedné za antigénne vlastnosti kvasiniek [4]. Doteraz nenašli väčšie uplatnenie v praxi, v budúcnosti sa

jeví možnosť využiť manánproteíny ako potravinárske biocmulgátory a u manánov izolovaných z pekárskeho droždía bolo v spolupráci s Ústavom experimentálnej fytopatológie a entomológie SAV v Ivanke pri Dunaji zistené, že prejavujú vlastnosti elicitora a zabraňujú vírusovej infekcii niektorých druhov rastlín (nepublikované výsledky).

Zistili sme, že β -glukány získané z intaktných buniek obsahujú 3-5 % lipidov, ktoré sú zakotvené v sieti polysacharidu. Preto pri príprave β -glukánov je výhodné sediment po autolýze delipidizovať [31], čím sa získa glukán, v ktorom je obsah lipidov prakticky nulový.



Obr. 4. INT-reduktázová aktivita ľudských polymorfonukleárných leukocytov inkubovaných v prítomnosti zymozánu a rôznych preparátov β -1,3-glukánov.

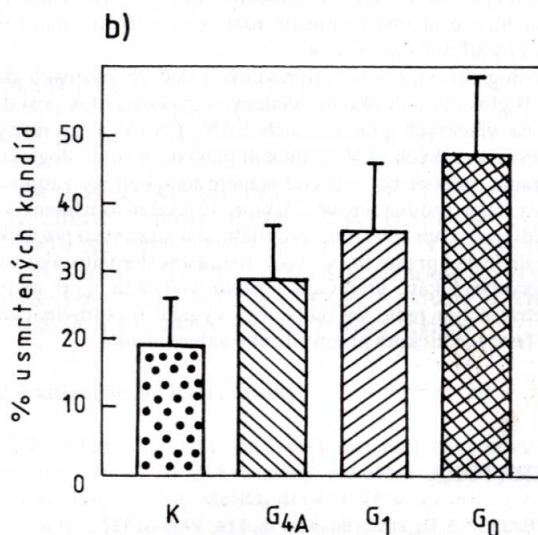
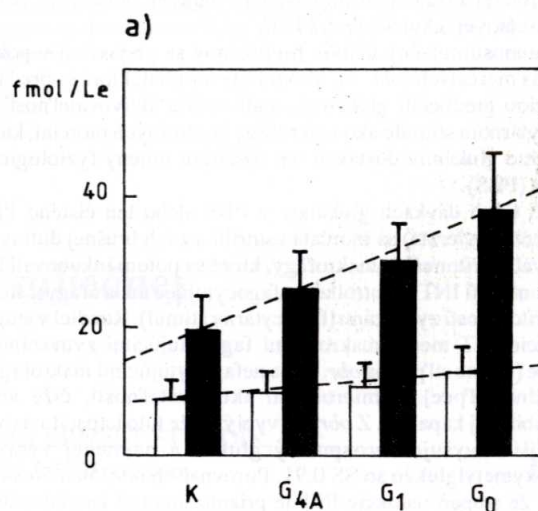
Le - čisté leukocyty, Z - zymozán, G₀ - nerozpustný glukán, G₁ - sulfoetylglukán, G₂ - sulfopropylglukán, G₃ - karboxetylglukán, G_{4A} - karboxymetylglukán so stupňom substitúcie SS 0,91, G_{4B} - karboxymetylglukán so SS 0,76. G₁ až G_{4B} sú rozpustné preparáty. Koncentrácia zymozánu i všetkých glukánových preparátov bola 0,5 ng na jeden leukocyt.

Stenový β -D-glukán, pripravený podľa postupu, ktorý je znázornený na obr. 4, je partikulárny, nerozpustný vo vode, v zriedených alkáliách a kyselinách. Vo svetelnom a elektrónovom mikroskope sa javí ako elipsoid, s veľkosťou častíc 3x6 μ m. Po totálnej hydrolýze s HCl (1 mol.l⁻¹) chromatograficky obsahuje len glukózu. Obsah dusíka je nižší ako 0,3 %, obsah popola do 0,6 %. V IČ spektre dáva charakteristický absorpčný pás pri 890 cm⁻¹. Jeho štruktúru môžeme vyjadriť všeobecným vzorcom (1-6)- β -D-gluko-(1-3)- β -D-glukán, v ktorom pomer glykozidových väzieb je približne 1:4. Primárna štruktúra bola potvrdená metylačnou analýzou a NMR spektrami [32]. Najnovšie štúdie nadmolekulovej štruktúry pomocou rozkladu γ -žiarením ukazujú, že stenový glukán vytvára sieť, v ktorej sa fibrilárne štruktúry s prevahou (1-3)- β -väzieb striedajú s amorfnou časťou, v ktorej zase prevládajú (1-6)- β -glykozidové väzby [33].

Nevyhnutnou podmienkou pre širšie uplatnenie izolovaných β -glukánov v humánnej i veterinárnej medicíne je ich vodorozpustnosť. Pripravili sme preto niektoré vodorozpustné deriváty ako karboxymetyl- a sulfoetylglukány s rôznym stupňom substitúcie [23,24]. Biologické vlastnosti týchto látok boli preverené na Lekárskej fakulte UK v Bratislave.

Z obr. 4 vyplýva, že všetky testované preparáty β -glukánov majú stimulačný účinok na INT-reduktázovú aktivitu ľudských

polymorfonukleárných leukocytov, čiže majú schopnosť zvyšovať pohotovosť leukocytov na usmrcovanie pohltitých mikroorganizmov a tým stimulovať aj obranyschopnosť hostiteľa proti týmto infekčným agensom. Najvyšší stimulačný účinok má nerozpustný β -glukán, ktorý je porovnateľný so zymozánom (v podstate bunkové steny *Saccharomyces cerevisiae*).



Obr. 5. INT-reduktázová (a) a kandidacídna aktivita (b) peritoneálnych makrofágov morčiat, ktoré sa predliečili rôznymi glukánmi.

K - morčiatam sa pred odberom makrofágov podal v troch dávkach fosfátom tlmený fyziologický roztok (PBS) (kontrolné zvieratá); G_{4A}, G₁ a G₀ - morčiatam sa v PBS aplikovali aj uvedené glukánové preparáty v dávke 10 mg na 1 kg živej hmotnosti. Prázdne stl'pce - redukcia INT čistými makrofágmi po 30-minútovej inkubácii pri 37 °C. Čierne stl'pce - makrofágy sa inkubovali v prítomnosti zymozánu. Kandidacídna aktivita je vyjadrená ako percento usmrtených kandid (sérozistentný kmeň *Candida albicans*) po ich 60-minútovej inkubácii pri 37 °C s makrofágmi izolovanými od glukánmi predliečených a kontrolných zvierat.

Rozpustné preparáty sú menej účinné. Z testovaných rozpustných preparátov najväčšiu stimuláciu INT-reduktázovej aktivity vykazoval karboxymetylglukán (G₃) a karboxymetylglukán so stupňom substitúcie (SS) 0,76 (G_{4B}), kým najmenšia stimulácia sa pozorovala pri karboxymetylglukáne so SS 0,91 (G_{4A}). Z uvedeného vidieť, že imunostimulačný účinok závisí nielen od typu derivatizácie, ale aj od jej stupňa. Výsledky sa udávajú vo femtomóloch farebného formazánu, ktoré vznikli redukciou jódnotetrazóliumchloridu (INT) v jednom leukocyte počas 30-minútovej inkubácie pri 37 °C.

Imunostimulačný účinok β -glukánov sa prejavil aj v pokusoch na morčatách (obr. 5). Makrofágy morčiat, ktoré sa pred ich izoláciou predliečili glukánmi, mali vyššiu aktivovateľnosť po fagocytárnom stimule ako makrofágy kontrolných morčiat, ktoré namiesto glukánov dostávali len fosfátom tlmený fyziologický roztok (PBS).

Po troch dávkach glukánov v PBS alebo len čistého PBS (kontrolné zvieratá) sa morčatá usmrtili a z ich brušnej dutiny sa izolovali peritoneálne makrofágy, ktoré sa potom inkubovali len v prítomnosti INT (kontrolné, nefagocytujúce makrofágy), alebo aj v prítomnosti zymozánu (fagocytárny stimul). Rozdiel v stupni redukcie INT medzi makrofágmi fagocytujúcimi zymozánové častice (čierne stĺpce na obr. 5a) a nefagocytujúcimi makrofágmi (prázdne stĺpce) je mierou ich aktivovateľnosti, čiže antimikrobiálnej kapacity. Z obr. 5a vyplýva, že túto kapacitu najvýraznejšie zvyšuje nerozpustný glukán a najmenej výrazne karboxymetylglukán so SS 0,91. Porovnaním obr. 5a a 5b sa dá zistiť, že stupeň redukcie INT je priamo úmerný kandidacídnej aktivite makrofágov, čiže ich schopnosti usmrcovať patogénne kandidy. Súčasne vidieť, že kandidacídnu aktivitu makrofágov najúčinnnejšie stimuluje predliečenie morčiat nerozpustným glukánom, ale aj oba testované rozpustné deriváty majú ešte významný stimulačný účinok.

Biologické vlastnosti pripravených vodorozpustných derivátov β -glukánu boli okrem uvedených experimentov posudzované na viacerých pracoviskách SAV, ČSAV a na rôznych katedrách vysokých škôl farmakologického a imunologického zamerania, pričom boli zistené viaceré terapeuticky zaujímavé aktivity (napr. protinádorové,...), ktoré sú predmetom intenzívneho štúdia s cieľom aplikačného dotiahnutia získaných poznatkov do medicínskej praxe. Iné vo vode rozpustné deriváty, ako napr. hydroxyetylglukán, prejavujú vysokú viskozitu i pri malých koncentráciách a preto by mohli byť využité v potravinárskom alebo farmaceutickom priemysle ako zahusťovadlá.

LITERATÚRA

- [1] BACON, S.D., et al.: *Biochem. J.*, **114**, 1969, s. 557
- [2] MANNERS, D.J., MASSON, A.J., PATTERSON, J.C.: *Biochem. J.*, **135**, 1973, s. 19
- [3] BALLOU, C.E., RASCHKE, W.C.: *Science*, **184**, 1974, s. 127
- [4] ŠANDULA, J., VOJTKOVÁ-LEPŠÍKOVÁ, A.: *Folia microbiol.*, **19**, 1974, s. 94
- [5] LARNE, F., et al.: *Connais. Vigne Vin* **19**, 1985, s. 41
- [6] WILLIAMS, D.L., DI LUZIO, N.R.: *Science*, **208**, 1980, s. 27
- [7] TRNOVEC, T., et al.: *Farmaceut. obzor*, **56**, 1987, s. 271
- [8] KÉRY, V., et al.: *Int. J. Biochem.*, **22**, 1990, s. 1203
- [9] DARVILL, A.D., ALBERSHEIM, P.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 1984, s. 243
- [10] KOPP, M., et al.: *Plant Physiol.*, **90**, 1989, s. 208
- [11] KOVALENKO, A.G., et al.: *Voprosy virusologii*, 1988, s. 732
- [12] CAMERON, D.R., COOPER, D.G., NEUFELD, R.J.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **54**, 1988, s. 1420
- [13] MINÁRIK, E., JUNGOVÁ, O.: *Wein-Wiss.*, **44**, 1989, s. 154
- [14] PV ČSFR 3944 86
- [15] ŠTURDÍK, E., et al.: *Kvas. prům.*, **35**, 1989, s. 74
- [16] KOLLÁR, R., et al.: *Kvas. prům.*, **36**, 1990, s. 304
- [17] KOLLÁR, R.: *Kvas. prům.*, **37**, 1991, s. 12
- [18] ŠAJBIDOR, J., et al.: *Kvas. prům.*, **35**, 1989, s. 242
- [19] AO ČSFR 259 289
- [20] AO ČSFR 259 288
- [21] PV ČSFR 768 88
- [22] DAVÍDEK, J., et al.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, SNTL, Praha 1981
- [23] PV ČSFR 3945 86
- [24] PV ČSFR 8091 87
- [25] FERENČÍK, M.: *Bratisl. lek. listy*, **89**, 1988, s. 424
- [26] KOTULOVÁ, D., ŠTEFANOVIČ, J.: *J. Hyg. Epid. Microb. Immunol.*, **27**, 1983, S: 253
- [27] ŠTURDÍK, E., et al.: *Kvas. prům.*, **34**, 1988, s. 241
- [28] POSÁDKA, P., MACHOLÁN, L.: *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **44**, 1979, s. 3395
- [29] NABI RAHNI, M.A., LUBRANO, G.J., GUILBAULT, G.: *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1987, s. 1001
- [30] XU, Y., GUILBAULT, G.: *Anal. Chem.*, **61**, 1989, s. 782
- [31] ŠAJBIDOR, J., et al.: *Microbios.*, **68**, 1991, s. 169
- [32] KOGAN, G., ALFÖLDI, J., MASLER, L.: *Biopolymers*, **27**, 1988, s. 1055
- [33] ŠANDULA, J., EBRINGEROVÁ, A., PRUŽINEC, J.: *J. Radioanal. Nucl. Lett.*, **144**, 1990, s. 287

Lektoroval Ing. František Machek, CSc.

Kollár, R. - Šturdík, E. - Šandula, J. - Ferencík, M. - Minárik, E. - Švorc, J.: *Frakcionácia kvasničnej biomasy. VII. Spracovanie a využitie polysacharidových frakcií droždia*. *Kvas. prům.*, **38**, 1992, č. 8, s. 225 - 231

V rámci programu komplexnej frakcionácie pekárskeho droždia bol vypracovaný postup prípravy bunkových stien a β -glukánov zo sedimentovateľnej frakcie autolýzátu popri súčasnom získavaní kvasničného extraktu, invertázy, ergosterolu a fosfolipidov. Získaný preparát bunkových stien stimuloval kvasenie "problematických" hroznových muštov tak v laboratórnom ako aj v priemyselnom meradle. Vzhľadom na značnú invertázovú aktivitu bol tiež úspešne využitý pri konštrukcii enzýmovej elektródy na priame stanovenie sacharózy. Izolované natívne a modifikované preparáty β -glukánu boli otestované čo do imunomodulačného účinku na experimentálnych zvieratách, pričom boli zistené pozitívne aktivity.

Коллар, Р. - Штурдик, Е. - Шандула, Я. - Ференчик, М. - Минарик, Е. - Шворц, Я.: *Фракционирование биомассы дрожжей. VII. Переработка и использование полисахаридных фракций дрожжей*. *Квас. прум.*, **38**, 1992, № 8, стр. 225 - 231

В рамках программы фракционирования хлебопекарных дрожжей был разработан способ получения клеточных стенок и β -глюканов из осаждаемой фракции автолизата при одновременном получении дрожжевого экстракта, инвертазы, эргостерола и фосфолипидов. Полученный препарат клеточных стенок стимулировал брожение "проблемных" виноградных соков как в лабораторном, так и промышленном масштабе. Ввиду значительной инвертазной активности он был также применен успешно при конструировании ферментного электрода для прямого определения сахарозы. Изолированные нативные и модифицированные препараты β -глюкана были подвержены испытанию по иммуномодуляционному действию на подопытных животных, причем были найдены положительные активности.

Kollár, R. - Šturdík, E. - Šandula, J. - Ferencík, M. - Minárik, E. - Švorc, J.: *Fractionation of Yeast Biomass. VII. Treatment and Application of Polysaccharide Fraction of Yeast*. *Kvas. prům.*, **38**, 1992, No. 8, pp 225 - 231

A procedure for a preparation of cell walls and β -glucane from the sedimentation fraction of yeast autolysates was developed. This preparate stimulated the fermentation of grape must both on a laboratory scale as well as on a production scale. With respect to a high invertase activity this

preparate was used for a construction of enzyme electrode for the saccharose determination. Isolated native and modified preparates of β -glucane were tested on experimental animals with respect to their immunochemical effect. Also these results were positive.

Kollár, R. - Šturdík, E. - Šandula, J. - Ferencík, M. - Minárik, E. - Švorc, J.: Fraktionierung der Hefebiomasse. VII. Verarbeitung und Ausnützung der Polysaccharide-Fractionen der Backhefe. Kvas. prům. 38, 1992, Nr. 8, S. 225 - 231

Im Rahmen des Programms der komplexen Backhefe-Fraktionierung wurde ein Verfahren zur Aufbereitung der Zellwände und β -Glukane aus der sedimentierbaren Autolysat-Fraktion bei gleichzeitiger Gewinnung von Hefextrakt, Invertase, Ergosterol und Phospholipiden ausgearbeitet. Das gewonnene Zellwände-Präparat stimulierte die Gärung von "problematischen" Traubenmosten sowie im Labor- als auch im Betriebsausmas. Mit Hinsicht auf seine hohe Invertaseaktivität wurde das Präparat mit Erfolg auch bei der Konstruktion der Enzymelektrode für die direkte Saccharose-Bestimmung appliziert. Die isolierten nativen und modifizierten β -Glukan-Präparate wurden an Versuchstieren auf ihre Immunmodulationswirkung getestet, wobei positive Aktivitäten festgestellt wurden.