Ergosterol v odpadních pivovarských kvasnicích

663.124
663.12

Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc., Ing. LENKA LÖBLOVÁ, Vysoká škola chemickotechnologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: *ergosterol, obsah, kvasnice, pekařské kvasnice, pivovarské kvasnice, dezintegrace, buňka, steroidy, extrakce, alkalická hydrolýza, cyklohexan, aerobní kultivace, zdroj, uhlík, výtěžnost, sůl.*

Předneseno na XXIII. pivovarsko-sladařském semináři ve dnech 21. a 22. 11. 1986 v Plzni

1. ÚVOD

Výroba piva představuje v ČSSR 24 miliónů hektolitrů ročně. Jako vedlejší produkt vznikají v množství 1,2—3,1 litru na hektolitr piva odpadní tekuté kvasnice, což představuje na uvedenou roční produkci téměř 3 500 tun sušiny biomasy ročně. V současné době jsou odpadní pivovarské kvasnice převážně využívány zemědělskými organizacemi jako krmivo a malý podíl se zpracovává na preparát Pangamin. Odpadní kvasnice obsahují řadu biologicky aktivních látek, jako jsou např. vitamíny, provitamíny, enzymy, aminokyseliny aj. Proto je snaha o zjištění obsahu těchto složek v odpadních pivovarských kvasnicích a o zpracování technologicky a chemicky přijatelných způsobů jejich izolace a purifikace.

Z hlediska využití ve farmaceutickém průmyslu se jeví výhodným získávání ergosterolu. Ergosterol je jedním z hlavních zástupců v tuku rozpustných vitamínů, jakožto provitamín D_2. Vitamín D_2 je důležitý při metabolismu vápníku a fosforu v těle. Jeho nedostatek se projevuje vážnými poruchami růstu kostí následkem porušeného metabolismu. Účinkem ultrafialových paprsků na ergosterol se otevře kruh se dvěma konjugovanými dvojnými vazbami a vznikne vítamín D_2. Pouze paprsky vlnové délky 256 až 313 nm jsou účinné [1, 2]. Současně během ozařování vzniká řada vedlejších produktů, jako např. lumisterol, tachysterol, prekalciferol [3]. Některé, jako toxisterol a suprasterol, mohou být toxické.

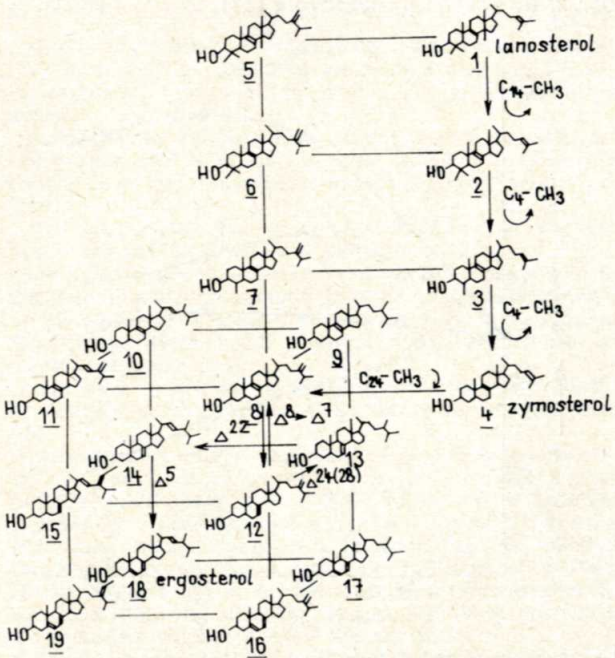
2. BIOSYNTÉZA ERGOSTEROLU

Ergosterol je nejdůležitějším sterolem z přibližně dvaceti jiných sterolů, které jsou jak meziprodukty tak i konečnými produkty biosyntézy sterolů v kvasničné buňce.

Buňky využívají steroly při tvorbě membránových struktur. Podmínky navozující zvýšenou tvorbu membrán indukují zároveň i zvýšenou tvorbu membránových komponentů [4, 5]. Proto je možno pozorovat zvýšenou tvorbu sterolů při silnější aeraci, když předtím žily kvasinky anaerobně.

Vlastní biosyntéza ergosterolu probíhá ve čtyřech stupních [6, 7]:

1. konverze acetátu na kyselinu mevalonovou,



Obr. 1. Biosyntéza sterolů [23]

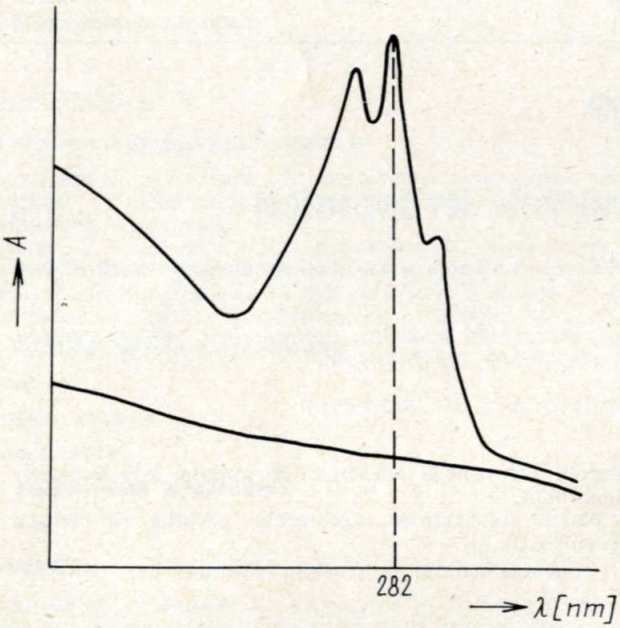
2. konverze kyseliny mevalonové na skvalen,
3. cyklizace skvalenu,
4. konverze lanosterolu na ergosterol.

Pro tvorbu ergosterolu jsou rozhodující poslední dva stupně, které vyžadují aerobní metabolismus kvasničné buňky.

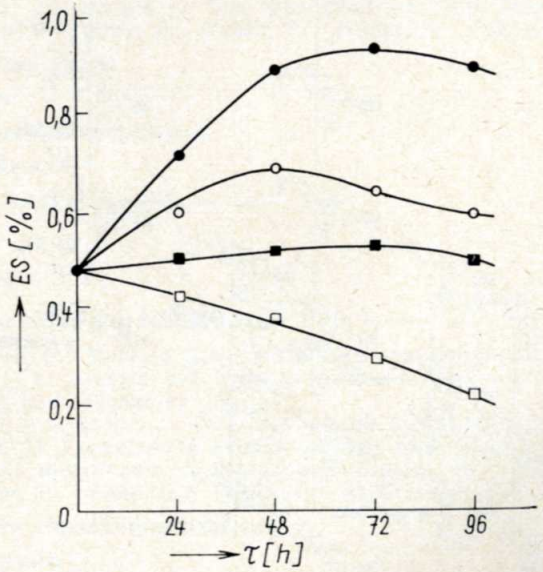
Nejvyšší hodnoty obsahu ergosterolu (2 % i více) byly zjištěny u druhů *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces uvarum* (*Sacch. carlsbergensis*) [8, 9]. Pivovarské kvasinky jsou některými autory považovány za mimořádně bohaté obsahem ergosterolu [10, 11, 12].

3. STANOVENÍ STEROIDNÍCH LÁTEK V KVASINKÁCH

Veškeré známé metody pro stanovení sterolů jsou založeny na rozrušení buněčných stěn dezintegrací, uvolnění sterolů z membrán alkalickou hydrolýzou, po které následuje extrakce do vhodného rozpouštědla. Vlastní stanovení je spektrofotometrické a využívá vysoké absorpce ergosterolu v UV oblasti světelného spektra s maximem při 282 nm.



Obr. 2. UV spektrum ergosterolu [13]



Obr. 3. Vliv následné kultivace na obsah ergosterolu v lisovaných pekařských kvasnicích

K těmto metodám patří metoda podle *Longleye* [14], *Riendela* a *Waltera* [15], metoda hydrolýzy methanolickým roztokem hydroxidu draselného [16] a metoda hydrolýzy 40% vodným roztokem hydroxidu draselného [16]. Pro stanovení celkových sterolů je možno využít *Liebermann-Burchardovu* kolorimetrickou metodu [17] nebo vážkové stanovení sterolových digitoninů [17]. Z dalších metod se využívá tenkovrstvá chromatografie [18], vysokotlaká chromatografie — HPLC [19, 20, 21], popř. plynová chromatografie [22].

Při porovnání spektroskopických metod bylo nejvyšších výtěžků dosaženo při použití metody podle *Longleye*, a proto byla používána v další práci.

3.1 Příprava vzorku

Odebrané vzorky tekutých kvasnic se odstředily při 3000 ot . min^{-1} po dobu 10 minut. Vzorky se dvakrát promyly vodou a za stejných podmínek odstředily.

Vlastní hydrolýza při použití Longleyho metody se provádí takto:

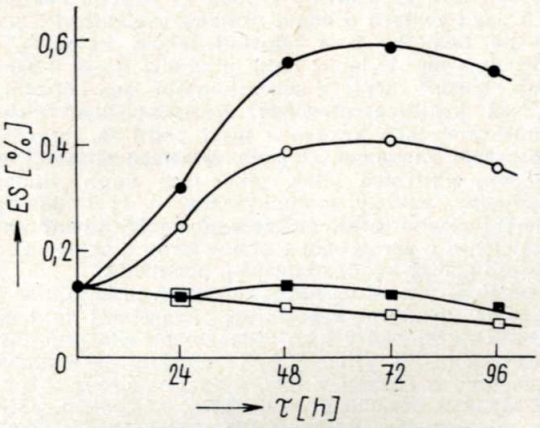
15 ml buněčné suspenze se odstředí a 2 hodiny vaří na olejové lázni při 115 až 120 °C pod zpětným chladičem s 5 ml 30 až 35% hydroxidu draselného. Po ochlazení se vzorek dvakrát extrahuje 5 ml cyklohexanu a spojené extrakty se proměřují proti čistému rozpouštědlu při čtyřech vlnových délkách. Hodnota absorbance při 282 nm se koriguje o hodnoty naměřené při vlnových délkách 294; 271,5, a 310 nm podle vzorce:

$$A_{282\,CORR} = 2513 \,.\, A_{282} + 1{,}205 \,.\, A_{294} - 2{,}327 \,.\, A_{271{,}5} - 1{,}389 \,.\, A_{310}$$

a z této hodnoty pak

$$ES = \frac{A_{282\,CORR} \,.\, V}{299 \,.\, M}$$

kde ES je bezvodý ergosterol v sušině (%)
$A_{282\,CORR}$ — korigovaná hodnota absorbance při 282 nm,
V — objem extrakčního činidla (ml),
M — hmotnost sušiny (g),
299 — molární absorpční koeficient čistého ergosterolu.



Obr. 4. Vliv následné kultivace na obsah ergosterolu v pivovarských násadních kvasnicích

3.2 Vliv dezintegrace buněk na výtěžnost ergosterolu

K zjištění vlivu rozrušení buněčných stěn na výtěžek ergosterolu byla část vzorků podrobena před hydrolýzou ještě dezintegraci na zařízení X-Press, HP-20, AB Biox (Stockholm, Švédsko).

3.3 Porovnání obsahu ergosterolu v různých typech kvasinek

Při porovnání obsahu ergosterolu v lisovaném pekařském droždí a pivovarských kvasinkách násadních a odpadních ze spilky a ze sklepa byly získány průměrné hodnoty uvedené v *tabulce 2.*

Tab. 1. Vliv dezintegrace předřazené hydrolýze na výtěžnost ergosterolu z odpadních kvasnic (po hlavním kvašení)

Vzorek číslo	Obsah ergosterolu v sušině biomasy (%)		Přírůstek obsahu ergosterolu (% rel.)
	bez dezintegrace	s dezintegrací	
1	0,164	0,197	20,12
2	0,142	0,163	14,79
3	0,168	0,198	17,86
4	0,156	0,186	19,23
5	0,210	0,253	20,48
6	0,215	0,261	21,39
Průměrné zvýšení obsahu ergosterolu v sušině biomasy 18,98 % rel.			

Tab. 2. Porovnání obsahu ergosterolu v pekařských a pivovarských kvasnicích

Vzorek	Obsah ergosterolu v sušině biomasy (%)
Lisované pekařské droždí	0,55
Pivovarské kvasnice násadní	0,12
Pivovarské kvasnice odpadní — ze spilky	0,21
Pivovarské kvasnice odpadní — ze sklepa	0,28

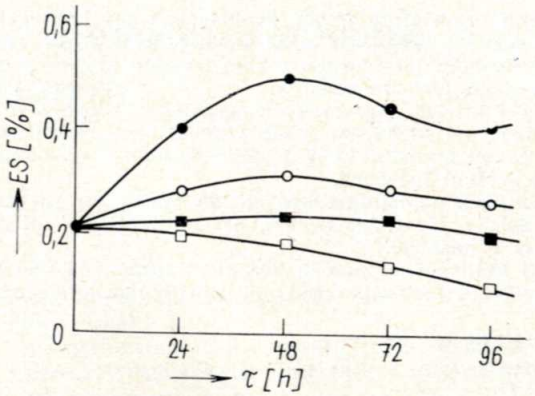
3.4 Vliv následné kultivace na obsah ergosterolu v kvasinkách

V další části práce se modelovaly podmínky pro následné zvýšení obsahu ergosterolu v kvasinkách kultivací za aerobních podmínek. Kultivace probíhala při 28 °C na laboratorní třepačce po dobu 96 hodin na čtyřech typech médií.

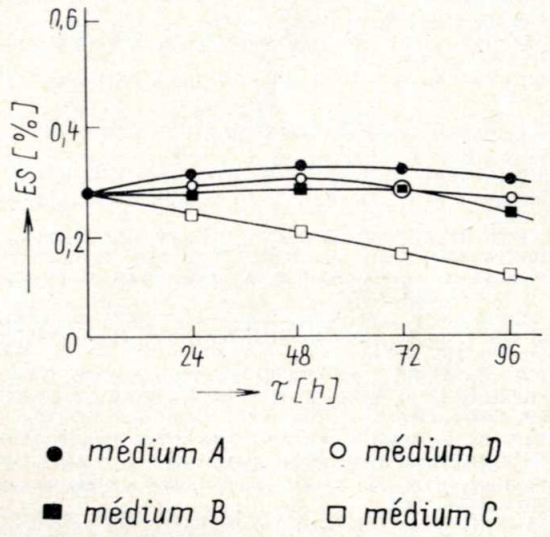
Tab. 3. Vliv následné kultivace na obsah ergosterolu v různých typech kvasnic

Druh kvasnic	Doba kultivace (h)	Médium A	B	C	D	Poznámky
Lisované pekařské	0	0,47	0,47	0,47	0,47	
	24	0,69	0,49	0,42	0,60	
	48	0,89	0,51	0,38	0,69	
	72	0,92	0,53	0,29	0,63	
	96	0,90	0,50	0,20	0,59	
Pivovarské násadní	0	0,12	0,12	0,12	0,12	kmen 9,10
	24	0,32	0,12	0,12	0,25	
	48	0,57	0,14	0,10	0,40	
	72	0,60	0,12	0,09	0,42	
	96	0,55	0,10	0,07	0,37	
Pivovarské odpadní — spilka	0	0,21	0,21	0,21	0,21	kmen 9,10 9. nasazení
	24	0,40	0,21	0,20	0,27	
	48	0,51	0,23	0,17	0,32	
	72	0,45	0,23	0,13	0,29	
	96	0,42	0,20	0,10	0,27	
Pivovarské odpadní — sklep	0	0,28	0,28	0,28	0,28	kmen 9,10
	24	0,30	0,28	0,25	0,29	
	48	0,32	0,29	0,20	0,30	
	72	0,31	0,28	0,16	0,28	
	96	0,30	0,24	0,12	0,27	

Složení médií: A — 0,5 g . l^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$
0,1 g . l^{-1} $MgSO_4$
0,2 g . l^{-1} K_2SO_4
5 % sacharosy
B — obsahovalo pouze soli jako médium A
C — čistá voda
D — obsah solí jako u A, 1% ethanolu



Obr. 5. Vliv následné kultivace na obsah ergosterolu v odpadních pivovarských kvasnicích (spilka)



Obr. 6. Vliv následné kultivace na obsah ergosterolu v odpadních pivovarských kvasnicích (sklep)

4. ZÁVĚR

Obsah ergosterolu v odpadních pivovarských kvasnicích je závislý na použitém kmenu a fyziologickém stavu kvasinek, který úzce souvisí s počtem nasazení do kvasného procesu.

Jednoznačně byl prokázán pozitivní vliv dezintegrace předřazené hydrolýze na výtěžek extrakce ergosterolu. Průměrné zvýšení výtěžnosti dosáhlo 18,98 % relativních (*tab. 1*).

Při porovnání různých typů kvasinek byl nejvyšší obsah ergosterolu zjištěn u pekařských kvasnic. Stanovený vyšší podíl ergosterolu v odpadních kvasnicích z ležáckých nádob v porovnání s násadními nebo odpadními kvasinkami ze spilky je v relaci s údaji udávanými literaturou, která uvádí zvýšený obsah ergosterolu ve starších buňkách [24].

Následné kultivace prokázaly různé zvýšení obsahu ergosterolu v závislosti na použitém médiu a typu kvasnic.

Nejvýraznějšího zvýšení obsahu ergosterolu se dosáhlo při kultivaci kvasnic na médiu přiživeném solemi a obsahujícím jako zdroj uhlíku 5 % sacharosy. Pozitivního zvýšení bylo dosaženo též při použití média s 1% ethanolu jako zdroje uhlíku a přiživeného solemi. Médium obsahující pouze soli nepřineslo výraznější zvýšení. Obsah ergosterolu se téměř nezměnil. Při uchovávání kvasinek pod vodou došlo naopak ve všech případech k výraznému poklesu obsahu ergosterolu.

Pokud se týká jednotlivých typů kvasnic, při kultivaci lisovaných pekařských kvasnic bylo dosaženo zvýšení

obsahu ergosterolu téměř dvojnásobné při kultivaci na 5% roztoku sacharosy přiživeném solemi a při využití 1% ethanolu jako zdroje uhlíku dosáhlo zvýšení zhruba 1,5násobku původní hodnoty.

Při kultivaci pivovarských násadních kvasnic se při kultivaci na sacharose dosáhlo téměř 5násobného zvýšení obsahu ergosterolu. V případě kultivace na ethanolu bylo zvýšení 3násobné.

Kultivace odpadních kvasnic ze spilky na sacharose přinesla zvýšení 2,5násobné, při kultivaci na ethanolu pouze 1,5násobné.

Při kultivaci odpadních kvasnic z ležáckých nádob se v podstatě nedosáhlo žádných pozitivních výsledků.

Literatura

[1] BENDOVÁ, O., KAHLER, M.: Pivovarské kvasinky, SNTL, Praha, 1981.

[2] VANČURA, M et al.: Pivovarsko-sladařská analytika, SNTL, Praha 1966.

[3] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J.: Chemie potravin, SNTL, Praha, 1983.

[4] PAPAHADJOPOULOS, D., COWDEN, M., KIMERBERG, M.: Biochim. Biophys. Acta, **330**, 1973, s. 10.

[5] KARST, F., JUND, R.: Biochem. Biophys, Res. Commun, **71**, 1976, s. 535.

[6] GUNATILAKA, A. A. L.: J. Nath. Sci. Coun. Sri Lanka **4**, 1976, s. 15.

[7] MUSIL, J., NOVÁKOVÁ, O., KUNZ, K.: Biochemie v obrazech a schématech, Avicenum, Praha, 1976.

[8] DULANEY, E. L., STAPLEY, E. O., SIMPF, K.: Appl. Microbiol. **2**, 1954, s. 371.

[9] EL-REFAI, A. H., EL-KADY, J. A.: Z. All. Mikrobiol. **8**, 1968, s 355.

[10] PROSKURIAKOW, N., POPOVA, I., OSIPOV, M.: Biochimia **3**, 1938, s. 397.

[11] ELIZYAN, A. A., MAROYAN, E. A., ARUTUNYAN, T. G.: Mikrobiologia **44**, 1975, s. 632.

[12] KOSIKOV, K. V., LAPUNOVA, Z. S., RAYEVSKAYA, O. G., SEMICHATOVA, N. M., KOTSCHINA, I. B., MEIEL, M. N.: Mikrobiologia **46**, 1977, s. 86.

[13] PRAŽÁKOVÁ, H.: Diplomová práce, VŠCHT, Praha, 1985.

[14] LONGLEY, L. P., ROSE, A. H., KNIGHTS, B. A.: Biochem. J. **108**, 1968, s. 401.

[15] REINDEL, F., WALTER, E.: Ann. Chemie **460**, 1928, s. 212.

[16] Die Hefen, Band I, Verlag H. CARL, Nürnberg 1960, s. 497.

[17] DAVÍDEK, J. et. al.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, Praha, 1977.

[18] ŠARŠÚNOVÁ, M., SCHWARZ, W., MICHALEC, Č.: Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a klinickej biochemii, Osveta, Martin, 1977.

[19] BURNS, T. D., MACKEY, C., TILLMAN, J.: J. Chromatogr. **190**, 1980, s. 141.

[20] JONES, G.: J. Chromatogr. **221**, 1980, s. 27.

[21] HEFTMANN, E., HUNTER, I. R.: J. Chromatogr. **165**, 1979, s. 283.

[22] BIOTECHNOLOGY, Vol. 6a, Editor H. J. REHM and G. REED, Verlag Chemie Basel, 1981.

[23] KOCKOVÁ, A. KRATOCHVÍLOVÁ: Kvasinky a kvasinkové mikroorganizmy, Alfa, Bratislava 1982, s. 185

[24] PENMANN, G. S., DUFFUS, J. M.: Z. Allg. Mikrobiol. **16**, 1976, s. 483.

Lektoroval Ing. J. Šavel, CSc.

Basařová, G. - Löblová, L.: Ergosterol v odpadních pivovarských kvasinkách. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 3, s. 65—68.

Článek se zabývá orientační studií obsahu steroidních látek, resp. ergosterolu v pivovarských a pekařských kvasinkách. Odzkoušelo se 6 stanovení ergosterolu, v další práci se použila metoda podle Longleye. Zvýšený výtěžek ergosterolu se zjistil v případě předřazené dezintegrace buněk před vlastní hydrolýzou. Steroidy se izolovaly z buněčné hmoty alkalickou hydrolýzou a následnou extrakcí cyklohexanem. Pekařské kvasinky odebrané z provozu měly v průměru 2 až 5krát vyšší obsah ergosterolu v porovnání s odpadními pivovarskými kvasinkami. Následnými krátkodobými kultivacemi odpadních pivovarských kvasinek v aerobních podmínkách na různých zdrojích uhlíku s přídavky solí se zjistilo, že lze zvýšit obsah ergosterolu 3 až 5krát.

Басаржова, Г. - Лэблова, Л.: Эргостерол в отходных пивоваренных дрожжах. Квас. прум. **33**, 1987, № 3 с. 65—68.

Статья занимается ориентировочным изучением содержания стероидных веществ, или же эргостерола в отходных и хлебопекарных дрожжах. Было испытано шесть определений эргостерола. В дальнейшей работе был применен метод по Лонглею. Повышенный выход эргостерола был установлен в случае проведения дезинтеграции клеток перед собственным гидролизом. Стероиды изолировались из клеточной массы при помощи основного гидролиза и последующего экстрагирования циклогексаном. Хлебопекарные дрожжи, отобранные из производства, отличались в среднем 2—5 раз высшим содержанием эргостерола по сравнению с отходными пивными дрожжами. При последующем проведении кратковременного культивирования отходных пивных дрожжей в аэробных условиях на разных источниках углерода с добавкой солей было найдено, что можно повысить содержание эргостерола в 3—5 раз.

Basařová, G. - Löblová, L.: Ergosterol in Brewing Yeasts. Kvas. prům. **33**, 1987 No. 3, pp. 65—68.

An information study of ergosterol content in brewing and baker's yeasts was made. Six methods for the ergosterol determination were tested. As a result the Longley method was used in further work. When a cell desintegration was made prior to the cell hydrolysis a higher ergosterol yield was found. Steroids were isolated from the cell mass by the alkaline hydrolysis with a following extraction by cyclohexane. The ergosterol content in bakers yeast was about 2 to 5 times higher than that in brewing yeasts. It was found that the ergosterol content in brewing yeasts can be 3 to 5 times increased by the following short-term cultivation in salt media with various carbon sources.

Basařová, G. - Löblová, L.: Ergosterol in der Abfallhefe der Brauereien. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 3, S. 65—68.

Der Artikel befaßt sich mit der Studie des Gehalts steroider Substanzen, bzw. des Ergosterols in Brauerei- und Backhefe. Es wurden sechs Methoden zur Ergosterolbestimmung erprobt; in der weiteren Arbeit wurde die Methode nach Longley appliziert. Eine erhöhte Ergosterolausbeute wurde im Fall der Vorschaltung der Zelldesintegration vor die eigentliche Hydrolyse festgestellt. Die Steroide wurden aus der Zellmasse durch alkalische Hydrolyse und nachfolgende Extraktion mittels Cyklohexan isoliert. Die aus dem Betrieb entnommene Backhefe wies im Durchschnitt einen 2 bis 5mal höheren Ergosterolgehalt im Vergleich mit der Abfallhefe aus der Brauerei auf. Es wurden nachträgliche kurzzeitige Kultivationen der Brauerei-Abfallhefen in aeroben Bedingungen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und Zugaben von Salzen durchgeführt und es wurde festgestellt, daß auf diesem Weg der Ergosterolgehalt auf das 3 bis 5fache erhöht werden kann.