

Kvasenie oligosacharidov

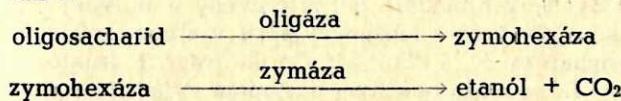
ANNA ROCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ

Katedra technickej mikrobiológie a biochemie chemickej fakulty
Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

547.458.1:577.154

Pri priemyselnom kvasení sa často používajú prirodzené prostredia a odpady obsahujúce ako základ výživy uhlíkom pre kvasinky rôzne polysacharidy, napr. jačmenný, zemiakový, kukuričný a rýžový škrob, ako vedľajšie zdroje glycogen, pektín, inulin, celulózu a mnohé oligosacharidy. Makromolekula polysacharidov je príliš veľká, než aby mohla predifundovať bunkovou blanou do vnútra bunky, a preto musí byť najprv rozložená. Môže sa rozložiť kyslou alebo enzymatickou hydrolyzou ešte prv, kým sa prostredie zakvasí. Tak sa za katalytickej účasti amyláz zo sladu môže škrob rozložiť v maltózu, maltotriózu, maltotetraózu a v dextríny. Príkladom enzymatického rozkladu škrobu je štepenie pri rmutovacom procese v pivovare [1]. Pri kvasení v pivovare sa uplatňuje najmä maltáza, pri kvasení melasových prostredí sacharóza a rafinóza, pri mliečnych kvasoch laktóza atď. Kvasinky už potom vedia skvasovať oligosacharidy pôvodne obsažené v prostredí alebo vzniklé hydrolyzou polysacharidov.

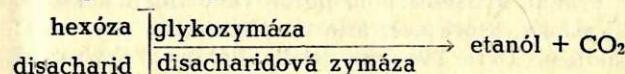
Veľmi často zaujímala biochémikov otázka, akým spôsobom sú tieto oligosacharidy skvasené. Pôvodný Fischerov názor [2], že molekula oligosacharidu musí byť rozložená na dve molekuly monosacharidu hydrolytickými enzymami z kvasničných buniek, aby mohli kvasiť, zdál sa prirodzený a správny, pretože tieto enzymy boli z kvasnej zmesi a z autolyzovaných kvasníčok izolované v aktívnej forme. Fischerov názor možno schematicky vyjádriť takto:



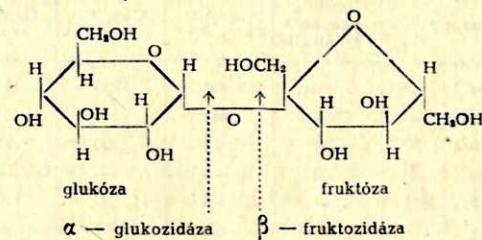
Fischerovo tvrdenie o „nepriamom kvasení“ cukrov bolo nielen všeobecne prijaté, ale udržalo sa v nepozmenenom znení dlhšie ako generáciu. Dokonca sa rozšírilo aj na výklad o spôsobu kvasenia cukrov baktériami.

Hydrolytické enzymy, napr. maltáza, invertáza (sacharáza), laktáza a druhé, boli starostlivo študované, takže sú dnes dobre známe podmienky ich optimálnej činnosti. Hydrolytické enzymy pracujú všetky v úzkom rozmezi pH, najlepšie medzi 5 až 6. Niekoľko býva pH prirodzených živných substrátov nižšie ako je dolná hranica optimálnej činnosti týchto enzymov. Očakávalo by sa vtedy, že sa zníži mohutnosť kvasenia, avšak kvasenie prebieha ne-rušene. Táto okolnosť nútila k pochybnosti o správnosti Fischerovho názoru. Willstätter [2] a jeho žiaci prví zistili, že obsah oligáz je v bunkách kvasiniek menší, než je treba k „nepriamému kvaseniu“ cukrov. Tak Willstätter a Lowry [3] udávajú, že liehovarské a pekárske kvasinky si zachovávajú schopnosť kvasiť sacharózu aj po pôsobení kyselín a alkalií, avšak extrakt z nich pripravený neobsahuje dostatočné množstvo invertázy potrebné ku

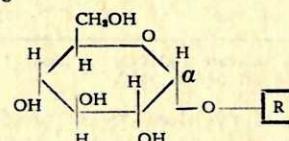
katalyzovaní rozkladu sacharózy v prostredí. Vyšloviли preto názor o „kvasení priamom“ a domnievajú sa, že k tomu účelu bunka stavia špecifické enzymy, ktoré pomenovali napr. maltozymázou, laktozymázou a pod.



Názor Willstättera a jeho spolupracovníkov sa prehľbil, keď sa náležite vziať predstava o glykozidickej povahе oligosacharidov. Začala sa tiež pripisovať hydrolytickým enzymom špecifickosť podľa toho, akú glykozidickú väzbu štepia a nie jednoducho podľa cukru, na ktorý pôsobia. Tak napr. maltáza je považovaná za α -glukozidázu, invertáza (sacharáza) za β -fruktozidázu a pod.



Známe sú pokusy Leibowitzte a Hestrina [4, 5, 6] s α — metylglukozidom na dôkaz maltázy.



$R = \text{CH}_3$ u $a = \text{metylglukozidu}$, $R = \text{glukóza}$ u matlózy, fruktóza u sacharózy a pod. R sa všeobecne nazýva „aglykon“.

Zistili, že α — metylglukozid preniká do kvasných buniek a je skvasený ak tvorí bunka maltázu. V prítomnosti maltázy je α — metylglukozid hydrolyzovaný v glukózu a metanol. Našli sa však také kvasinky, ktoré α — metylglukozid neskvasovali, avšak skvasovali maltózu. To bol ďalší dôvod k tomu, že sa mohli domnievať, že kvasenie disacharidov prebieha inou ako nepriamou cestou. Gottschalk [7] začal pochybovať o správnosti Fischerovho názoru, akonáhle zistil, že α — metylglukozid môže byť inhibítorm maltázy a predsa u pivovarských a pekárskych kvasiniek neinhibuje kvasenie maltózy.

Kvasenie rafinózy sa môže použiť ako indikátor aktivity sacharázy u živých intaktných kvasiniek. Podľa Kuhna [8] a Josephsona [9] je sacharáza identická s rafinázou a rozdiel v ich činnosti je v tom, že sacharáza je hydrolyzovaná 16krát rýchlejšie ako rafinóza. Preto kvasenie rafinózy je riadené koncentráciou sacharózy. Pozorovalo sa, že α — metylglukozid vystupuje ako inhibitor sacharázy, inhibuje kvasenie rafinózy, avšak neovplyvňuje kvasenie sacharózy. To poukazuje na skutočnosť,

že rafinóza musí byť najprv hydrolyzovaná, zatiaľ čo sacharóza je skvasovaná priamo. Kvasenie sacharózy prebieha u pekárských kvasiniek pri pH 2,2–7,3, avšak kvasenie rafinózy sa riadi podmienkami hydroláz. Obidve kvasenia sa môžu preto oddeliť, keď sa kvasinky vyperú v 0,25 N H₂SO₄. Takto kyselinou vyprané kvasnice kvasia sacharózu, avšak nie rafinózu. Toto je ďalší dôkaz toho, že sacharóza je skvasovaná mechanizmom nezávislým na sacharáze.

Priamé kvasenie bolo pozorované tiež u laktózy. Kvasinky, ktoré nekvásia maltózu môžu skvasovať laktózu. Tieto kvasinky vedia dokonca skvasovať rýchlejšie laktózu ako jej monosacharidové zložky, ako uvádzajú Leibowitz a Hestrin. Preskúšali sme niektoré kvasinkovité mikroorganizmy skvasujúce rôzne cukry a pritom sme zistili, že *Candida pseudotropicalis* (tiež uvádzaná ako *Saccharomyces fragilis*) skvasuje galaktózu a laktózu rovnou mierou.

Spôsob skvasenia niektorých kandid

Cukor	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida krusei</i>
glukóza	874	854	254	111
mannóza	739	663	215	113
galaktóza	235	86	30	21
sorbóza	31	—	—	—
arabinóza	—	—	—	—
maltóza	—	68	47	—
laktóza	235	—	—	—
sacharóza	786	640	234	—
rafinóza	339	25	75	—

Hodnoty v tabuľke udávajú 1 μl CO₂, vylúčené 1 mg sušiny kvasinek za dobu 1 hod pri teplote 30°C.

Zdá sa nám, že rýchlosť kvasenia disacharidu a jeho zložiek závisí na spôsobe, akým bol daný kmeň pestovaný pred kvasnou skúškou. Naše kmeňe sme pestovali dlho pred tým na prostredí s maltózou, ako je napr. *Saccharomyces fragilis* bol objavený *Candida pseudotropicalis* neboli privyknutý na výživu laktózou ani galaktózou. Kmeň *Saccharomyces fragilis*, ktorý použili Leibowitz a Hestrin bol pred tým pestovaný na prostredí s laktózou. Tento názor potvrdzuje tiež de Smedt [10], keď udáva, že 1% roztok sacharózy a maltózy kvásia kvasinky z obilných záparov rovným dielom, zatiaľ čo kvasinky z melasy skvasujú sacharózu o veľa rýchlejšie.

Dôkazom laktázy v bunkách môže byť tiež schopnosť dýchať v jej prítomnosti, ako ukázali Kluyver a Custers [11] u *Blastodendron intermedium*. Mikroorganizmus dýchal dobre v prítomnosti glukózy v prostredí, avšak nedýchal v prítomnosti laktózy. Keby bola prítomná laktáza, prebiehalo by dýchanie aj v prítomnosti laktózy.

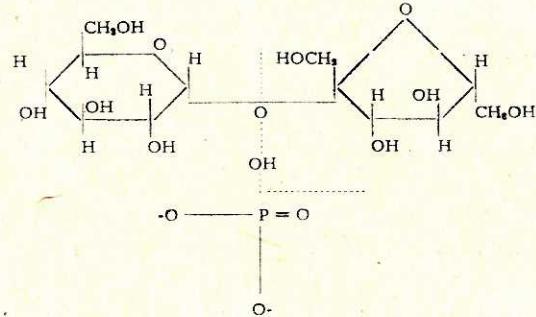
U kvasinek schopných kvasiť laktózu a galaktózu, ako je napr. *Saccharomyces fragilis* bol objavený ešte jeden zvláštny hydrolytický enzym, ktorý umožňuje rozklad oligogalakturonidov a kyseliny pektovej. Demain a Phaff [10] ho nazývajú polygalakturonidáza. Je to konstitučný typ enzymu produkovaný mimo bunku. Jeho optimálna aktívita je pri pH 4,4 a už pri pH 5 sa jeho účinnosť spoma-

luje na 48 %. Výsledkom jeho činnosti je zmes tridi-, a monogalakturónovej kyseliny. Umožňuje týmto kvasinkám napadať pektínom bohatú cukrovú repu a stekucovať repné rezky a tak tieto cukornaté substráty sprístupniť ďalšiemu využitiu.

Myrbäck [12] a Myrbäck a Oertenblad [13, 14, 15] skúmali tiež kvasenie trehalózy a jej vznik v kvasinkách. Domnievajú sa, že nie je priamo skvasovaná, iba za účasti trehalázy. Optimum pH trehalázovej aktivity je 5–6. Trehaláza je podľa nich viazaná v bunke na nerozpustných štrukturách a jej štatibilita je väčšia ako u maltázy. Kvasivu schopnosť u glukózy, maltózy a trehalózy udávajú v pomere 100 : 25 : 4. Leibowitz a Hestrin pripútajú tiež možnosť priamého kvasenia trehalózy. Trehalóza však vzniká v kvasičných bunkách vo veľmi malom množstve, čo zapríčinilo, že nebola bližšie študovaná tak, aby mechanizmus jej tvorby a rozkladu bol doteraz riadne objasnený.

Mechanizmus, akým priame kvasenie oligosacharidov prebieha, vysvetľujú bližšie štúdie biosyntézy oligosacharidov, ktoré uverejnili Doudoroff a jeho spolupracovníci [16, 17, 18]. Previedli je s kmeňmi baktérií, *Pseudomonas saccharophila*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Escherichia coli*. Biosyntéza sacharózy prebieha na základe fosforylačného pochodu. V živnom prostredí s glukózou a fruktózou sa najprv fosforyluje glukóza v prítomnosti adenozintrifosfátu a hexokinázy. Tak vzniklý glukózo-6-fosfát je v prítomnosti glukózovej izomerázy prevádzaný v Coriho⁴⁾ ester, glukózo-1-fosfát. Tento ester slúži pri výstavbe sacharózy ako t. zv. „receptor“, ktorý môže prijímať fruktózu a spolu s ňou poskytovať sacharózu za uvoľnenia kyseliny ortofosforečnej. Enzym, katalyzujúci túto biosyntézu bol nazvaný sacharofosforylázou a z uvedených baktérií bol pripravený v aktívnej forme. Celý proces možno vyjádriť vratnou rovnicou: sacharóza + H₃PO₄ ⇌ Coriho ester + fruktóza

Tak sa môže opáčnym postupom vyjádriť aj priame kvasenie sacharózy. Za účasti kyseliny fosforečnej a sacharofosforylázky vzniká Coriho ester a fruktóza:

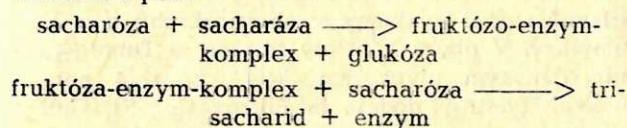


Coriho ester je ďalej metabolizovaný už známym spôsobom podľa Emden-Meyerhofovho schematu kvasenia, alebo po prevedení na glukózo-6-fosfát môže preísť celý mechanizmus na oxydativný spôsob fosforylacie, ktorého prým medziproduktom je kyselina 6-fosfoglukónová. Táto kyselina je potom

⁴⁾ Coriho ester je pomenovaný podľa známych vedeckých pracovníkov, manželov Ferdinanda a Terézy Coriových, ktorí sa presne pred 60 rokmi narodili v Prahe. Ich vedecké práce sa týkajú väčšinou biochémie fosforylačných pochodov.

východzou látkou pre tvorenie biologicky dôležitých cukrov, ribulózy, ribózy, desoxybózy a pod. Funkcia glukózo-1-fosfátu ako receptorového substrátu môže byť omedzovaná súfaživou prítomnosťou α -metylglukozídu, α -fenylglukozídu, ba dokonca aj samou glukózou. Práve uvedený príklad biosyntézy sacharózy a jej rozkladu je len obdobou premeny maltózy a rôznych kombinovaných oligosacharidov, ktoré podrobne popisujú Doudoroff a jeho spolupracovníci.

Takto by sa zdalo, že prítomnosť hydrolytických enzymov by bola vlastne nadbytočná. Avšak v poslednej dobe sa zistilo, že vedľa hydrolyzačnej schopnosti majú hydrolázy oligosacharidov ešte schopnosť prenášať zvyšky jednotlivých monosacharidov, napr. sacharáza fruktózu, maltáza glu-kózu, laktáza galaktózu a pod. Slúžia teda rovnako ako transfruktozidáza, transglukozidáza, transgalaktozidáza a pod.:



Wallenfels, Aronson a Pazur [19, 20] pozorovali, že pri kvasení laktózy a sacharózy vznikajú tiež nové oligosacharydy. Tieto sú výsledkom transgalaktozidačnej a transfruktozidačnej činnosti obidvoch enzymov. Takto vzniklé malé množstvá cukrov sa môžu dokázať papierovou chromatografiou. Vzniká napr. pri laktózovom kvasení galaktózo-1,6-glukóza, galaktózo-1,6-galaktóza, galaktózo-1,6-galaktózo-1,4-glukóza, galaktózo-1,6-galaktózo-1,6-glukóza. Tak tiež White [21, 22] zistil, že sa pri hydrolýze sacharózy za biokatalytickej prítomnosti sacharázy z medu vytvorí šesť nových oligosacharidov a za účasti kvasničnej sacharázy päť.

Tak vytvorené oligosacharydy môžu byť základom („receptorovou molekulou“) pri výstavbe makromolekulárnych polysacharidov slúžiacich v bunkách kvasiniek ako rezerva výživy, ako zpevňovacie substancie v bunkovej blane alebo ako ochranné slizy a púzdra, obalujúce bunku. Niektoré cukry, prítomné v prirodených prostrediaciach, môžu výstavbu dlhých reťazí polysacharidov brzdiť tým, že samy prijímajú prenášené zvyšky cukrov, ktoré sa majú pripojovať k reťazi a ju predĺžovať. Sú nazývané ako „glukozylové akceptory“. Môže to byť napr. maltóza alebo izomaltóza pri výstavbe ochranných slizovitých púzdier. „Glukozylové akceptory“ tvoria pritom nové receptorové molekuly ako základy k tvorbe nových reťazí. Tak jednotlivé reťaze nedosahujú takej dĺžky ako keď ich výstavba nie je rušená.

Ak má syntetická činnosť fosforylačného procesu riadne prebiehať, musí byť aktivita hydrolázového systému utlumená. Preto sa tiež u živých intaktívnych buniek javí aktivita hydroláz menšia ako mohutnosť priamého rozkladu alebo syntézy. Pri použíti enzymatických prípravkov sa môže k inhibícii použiť α -metylglukozíd, 10^{-4} M roztok AgNO_3 alebo niektorý z enzymov, napr. peroxydáza. Tak napr. Sizer zistil, že kvasničnú sacharázu výborne inhi-

buje chreňová peroxydáza. Vysvetluje to tým, že prítomnosť peroxydázy môžu byť okysličené niektoré amínokyseliny v bielkovinnej časti sacharázy, napr. tyrozín, cystein alebo tryptofán.

Z práve uvedeného možno súdiť, že kvasinky používajú nepriamé kvasenie oligosacharidov len ako núdzovú výpomoc za kvasenie priamé. Pozorovali sme rozdiel medzi kvasením disacharidu u kvasinky dobre kvasiacej, *Candida robusta*, a u kvasinky len slabko kvasiacej, *Candida albicans* [23]. *Candida robusta* skvasuje maltózu o veľa rýchlejšie ako *Candida albicans*, takže priemerný zvyšok maltózy v prostredí o pH 4,5, kde kandidy žili, tvorí po desiatich dňoch u *Candida robusta* len 6,5 % a u *Candida albicans* ešte 82 % z pôvodného množstva maltózy. Tiež sa pri porovnaní optimálnej koncentrácie maltózy pre rozmnožovanie uvedených dvoch druhov kandid prejavil rozdiel vo spôsobu metabolizmu glycidov. Optimálne rozmnožovanie *Candida albicans* bolo v 0,5 % roztoku maltózy a *Candida robusta* v 10 % roztoku. *Candida albicans* kvasí maltózu slabko, pretože nemá schopnosť skvasovať jej molekulu priamo, alebo má túto schopnosť vyvinutú len nepatrne. Podľa svojho spôsobu života posunuje fažisko metabolizmu na látky dusíkaté. *Candida robusta* však skvasuje maltózu priamo a podobá sa svojim metabolizmom technickým kvasinkám, napr. *Saccharomyces cerevisiae*, ktorej je pravdepodobne imperfektnou formou. Pri podrobnom sledovaní celkového metabolizmu sa ukázalo, že *Candida albicans* nahráža nedostatočnú schopnosť kvasiť maltózu priamo oxydatívnym procesom. Ak sa zabráni dýchaniu blokovaním organoželezitých pigmentov kyanovodíkom, zväčšia sa bunky, ktoré túto otravu prežijú, a podobajú sa bunkám *Candida robusta*, pri čom java tiež lepšiu schopnosť kvasiť. Zdá sa, že k priamemu kvaseniu disacharidov dochádza predovšetkým u kvasiniek s prevážne anaeróbnym spôsobom látrovej výmeny. Tiež pri nedostatočnej výžive dusíkatými látkami môže dojsť k prevedeniu metabolizmu na oxydatívnu fosforyláciu. Tomuto úkazu sa hovorí „hexázomonofosfátový šunt“.

Literatúra

- [1] R. WINKLER: Kvasný průmysl 2, (1956), 196
- [2] LEIBOWITZ J., HESTRIN S.: Advances in enzymology 5 (1945), 87
- [3] WILLSTATTER R., LOWRY C.: Ztschr. physiol. Chemie 150 (1925), 287
- [4] LEIBOWITZ J., HESTRIN S.: Nature 141 (1938), 552
- [5] LEIBOWITZ J., HESTRIN S.: Enzymologia 6 (1939), 15
- [6] LEIBOWITZ J., HESTRIN S.: Biochem. Jour. 36 (1939), 772
- [7] GOTTSCHALK A.: Zeitschr. physiol. Chemie 152 (1926), 132, 153 (1926), 215
- [8] KUHN R.: Zeitschr. physiol. Chemie 125 (1904), 28
- [9] JOSEPHSON F. H.: Science 94 (1941), 200
- [10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A.: Kvasinky, v tlači
- [11] KLUYVER A., CUSTERS M.: Ant. v. Loewenh. J. microb. serol. 6 (1940), 121
- [12] MYRBÄCK K.: Biochem. Ztschr. 307 (1941), 440
- [13] MYRBÄCK K., OERTENBLAD B.: Biochem. Ztschr. 228 (1936), 329
- [14] MYRBÄCK K., OERTENBLAD B.: Biochem. Ztschr. 291 (1937), 61
- [15] MYRBÄCK K., OERTENBLAD B.: Biochem. Ztschr. 292 (1937), 230
- [16] DOUDOROFF M., HASSID J. M., PUTMAN E. W.: J. biol. chem. 179 (1949), 921
- [17] DOUDOROFF M., WIAME J. M., WOLOCHOW A.: J. bact. 57 (1949), 423
- [18] HASSID W. Z., DOUDOROFF M.: Advances in enzymology 10 (1950), 123
- [19] PAZÚR H. J.: biol. chem. 208 (1954), 439
- [20] PAZÚR H. J.: biol. chem. 216 (1955), 531
- [21] WHITE J. W.: Arch. Biochem. Biophys. 39 (1952), 239
- [22] WHITE J. W.: Arch. Biochem. Biophys. 42 (1953), 360
- [23] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A.: Zborník prác zo zjazdu chemikov v B. Štiavnici, Bratislava 1954