

9

září 1985

ročník 31

Kvasný průmysl

ODBORNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÉM A NÁPOJOVÉM PRŮMYSLU
VYDÁVÁJÍ PIVOVARY A SLADOVNY, KONCERN, PRAHA

Z výzkumu a praxe

Syntéza ergosterolu a aktivita pivovarských kvasinek

663.12 663.13

Ing. T. GINOVA-STOJANOVA, CSC., Ing. V. JANEVA, Institut pivovarského průmyslu, Sofie

Klíčová slova: ergosterol, pivovarské kvasinky, kvasinky, glykogen, lipidy, syntéza

Mechanismus, kterým se projevuje význam kyslíku pro kvašení piva, je spojen se syntézou sterolů a nenasycených mastných kyselin kvasinkami [2, 3, 9]. Tyto lipidy jsou životně důležitými strukturálními složkami kvasničné membrány; na jejich složení a obsahu závisí aktivita pohybu živných látek a metabolitů z buňky do živného prostředí a naopak [12, 16]. Molekulární kyslík je nezbytný pro proměnu biologického prekurzoru skvalenu v ergosterol, jeden ze základních sterolů v kvasinkách [2]. Metabolismus lipidů má nepochybně velký vliv na kvašení a kvalitu piva [3, 11, 18]. V období anaerobní fáze růstu kvasinek jsou steroly hlavním růstovým faktorem.

V souvislosti s významem obsahu sterolů pro pivovarské kvasinky zkoumá tato práce syntézu ergosterolu několika kvasničnými kmeny v různých podmínkách kvašení a zejména význam nenasycených lipidů na fyziologický stav kvasinek a optimalizaci kvasného procesu.

Materiál a metody

Byly použity kvasinky ze sbírky Institutu pivovarského průmyslu v Sofii — dva průmyslové kmeny 51 a 74 a jeden sbírkový kmen č. 13. Byly zkoumány v rozmezí obsahu kyslíku v mladině 6–8 mg/l.

Zkoušky byly prováděny v kvasných válcích při teplotě 10 °C v mladině provzdušňované na obsah kyslíku 6–7 mg/l a v mladině bez doplňujícího provzdušňování po autoklávování. Inokulum bylo použito ve třech variantách:

- kultivace ve fermentoru s periodickým přísunem vzduchu,
- standardní stacionární kultivace,
- po anaerobním kvašení.

Násadní kvasnice ve formě odstředěných byly dávkovány v množství 2,5 g/l. Kromě toho byly ke sledovanému účelu pro porovnání zkoumány vzorky provozního kvašení.

Ve všech zkouškách byla sledována syntéza ergosterolu v původním inokulu, v prvních hodinách po zakvašení a v době kvašení. Současně s tím se provádělo stanovení změn množství glykogenu v kvasinkách.

Citlivost kmenů na obsah nenasycených mastných kyselin v mladině se zkoušela přidávkem detergentu Tween₈₀.

Zkoušce byly podrobeny tyto parametry metabolické aktivity kvasinek: rychlost a stupeň kvašení, pomnožení a růst kvasinek, asimilace aminodusíku, tvorba esterů.

K extrakci ergosterolu a stanovení jeho obsahu bylo použito metody *Brevika* a *Owadese* [8] a *Shawa* a *Jeffriese* [17]. Glykogen byl stanoven podle metody *Quaina* a *Tubba* [14].

Výsledky a hodnocení

Stanovení obsahu ergosterolu v násadních kvasinkách v různých podmínkách kultivace je uvedeno v tab. 1.

Výsledky potvrzují, že kvasinky rozmnožené aerobně jsou bohatší na ergosterol ve srovnání s těmi, které byly získány bez speciálního vzdušnění, avšak za přístupu vzduchu [2, 5]. Tato vysoká koncentrace sterolů v buňce násadních kvasinek snižuje či odstraňuje nutnost následného počátečního vzdušnění mladiny [6, 9]. Stupeň snížení potřeby kyslíku závisí nepochybně na obsahu sterolů a vlastnostech kmene.

Tab. 1. Obsah ergosterolu v násadních kvasinkách

Podmínky kultivace	Ergosterol [mg/g sušiny]
kultura periodicky vzdušněná po 48 h	5–6
stacionární kultura po 48 h	0,5–1,2
anaerobní kvašení	0,2–0,8

Kvasinky z anerobního kvašení jsou chudé na ergosterol, jehož obsah dosahuje limitní hodnoty, při níž ustává rozmnožování [2, 3]. Tyto kvasinky obsahují velké množství škvalenu [4].

Po přidání kvasinek k vzdušné mladině začíná rychlá syntéza ergosterolu. Výsledky analýzy tohoto procesu se uvádějí v tab. 2.

Tab. 2. Obsah ergosterolu v kvasinkách tří kmenů v průběhu kvašení (průměrné hodnoty)

Doba kvašení [h]	Ergosterol/24,28-dehydroergosterol [mg/g sušiny]			Kyslík [mg/l]
	kmen 13	kmen 51	kmen 74	
0	0,5/0,01	0,4/0,03	0,6/0,02	6-7
po 2 h	1,9/0,02	1,8/0,3	1,8/0,08	4,5
po 5 h	9,0/0,02	7,5/0,8	9,5/0,6	1,9
po 24 h	1,1/0,0	1,0/0,02	1,4/0,08	0,1
po 48 h	0,28/0,0	0,18/0,01	0,2/0,0	

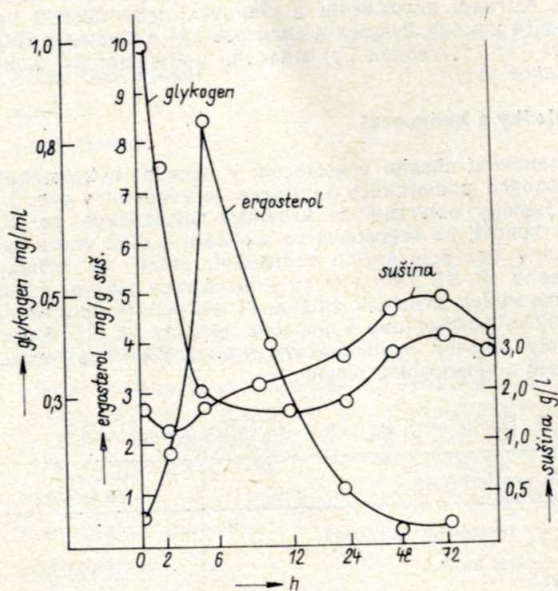
Největší množství se syntetizuje v období mezi 2 až 5 hodinami, což odpovídá rychlé spotřebě kyslíku rozpouštěného v mladině.

Podle údajů Ariese a Kirsopa [4] se spotřebovává až 15 % kyslíku na syntézu nenasycených lipidů. Přitom se steroly mění z volných (v této formě se projevují v prvních hodinách kvašení) v esterifikované. Haukeli a Lie [13] předpokládají, že 50 % kyslíku v mladině se spotřebovává pro tyto biosyntetické pochody vzhledem k tomu, že sladina je chudá na nenasycené lipidy.

Do 24 hodin se množství ergosterolu zřetelně snižuje, zůstává však vyšší než v původním inokulu. Koncentrace 24,28-dehydroergosterolu, bezprostředního prekursoru ergosterolu v biosyntetickém řetězci, se zvyšuje během druhé hodiny, mění se však v závislosti na podmínkách růstu a na kvasničném kmenu.

Vyjádření rozdílu mezi jednotlivými kmeny v množství syntetizovaného ergosterolu jsme nenalezli, avšak nejvyšší obsah (11,7 mg/g suš.) jsme zjistili u kmene 13.

Steroly, které se syntetizují v tomto počátečním období kvašení, objevují se v buňkách jako sterolový pool, jehož se využívá k tvorbě nových membrán v době následující aktivní fáze růstu kvasinek. Tato fáze začíná po 5 hodinách, jakmile se dosáhne stanovené koncentrace ergosterolu, a trvá přibližně 48 hodin. V této době se obsah sterolů snižuje přibližně na 0,2–0,3 mg/g a ustává tvorba nových buněk.



Obr. 1

Vztah mezi množstvím syntetizovaného ergosterolu, tvorbou biomasy a metabolismem glykogenu, který jsme zjistili v této práci, se uvádí v grafu 1 (průměrné hodnoty). Současně s biosyntézou sterolů v prvním období po zakvašení spotřebovávají kvasinky glykogen jako základní energetický zdroj [15]. Mezi 2. a 5. hodinou, kdy ještě nedošlo k aktivnímu pomnožení, množství glykogenu se snižuje na 40–60 %, v době rozmnožovací fáze asi do 24. hodiny zůstává téměř beze změny. V době hlavního kvašení je koncentrace glykogenu nižší než v počátečním inokulu, začíná však již nová akumulace v buňkách. David, Quain a Tubb před nedávnem zjistili, že pro normální průběh kvašení je nezbytné stanovení počátečního množství glykogenu v buňkách. V opačném případě se zamezí syntéza ergosterolu. V tom spočívá funkce glykogenu jako rezervního polysacharidu v buňkách [10].

Obsah sušiny se v kvasinkách snižuje v prvních hodinách po zakvašení přibližně na 20–30 %, což odpovídá fázi endogenní spotřeby glykogenu. Po 5 hodinách začíná růst nových buněk, po 72 hodinách následuje nové snížení obsahu sušiny v souvislosti se snížením obsahu glykogenu.

Dynamika těchto procesů v provozních podmínkách je patrná z tab. 3. Systém kvašení je typu „kvašení naujato“.

Tab. 3. Obsah ergosterolu u kmene 74 v době kvašení v provozních podmínkách

Parametr	Doba kvašení					
	0	2	3	12	24	48
ergosterol [mg/g suš.]	6,6	3,6	4,9	6,8	5,0	0,28
24,28-dehydroergosterol [mg/g suš.]	0,0	0,0	0,0	0,05	0,03	0,01
kyslík [mg/l]	3,4	2,1	1,2	0,30	0,32	0,45
glykogen [mg/ml]	0,5	0,21	0,23	3,0	2,8	2,5
sušina kvasinek [g/l]	1,1		3,0	1,6	2,8	2,5

Poznámka: množství násadních kvasinek 25 × 10⁶ buněk/ml

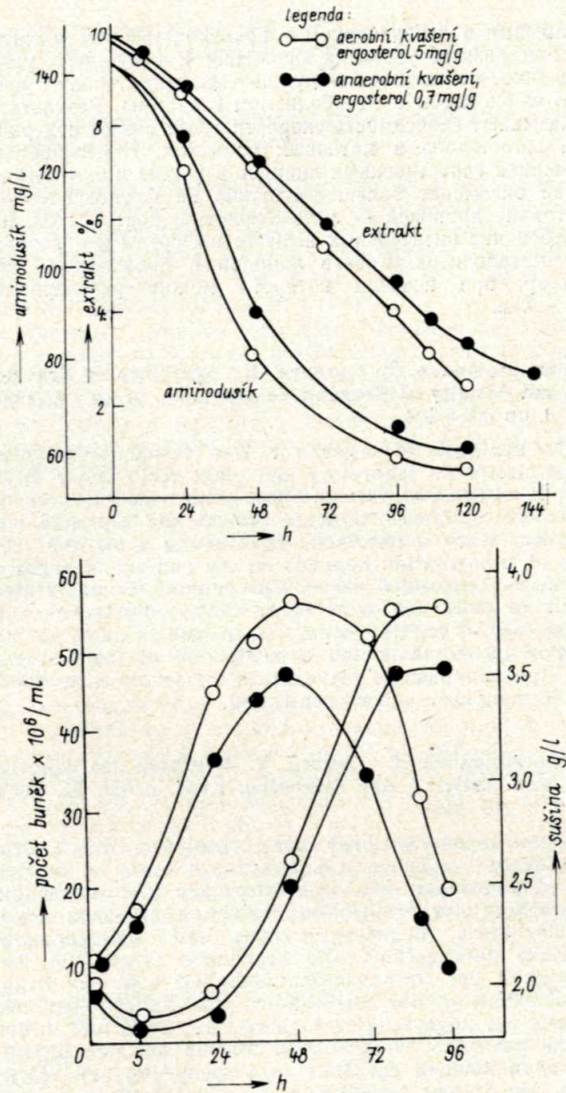
Výsledky ukazují, že rychlost tvorby ergosterolu závisí na podmínkách kvašení. Kvasinky z předcházejícího kvašení mají při vstupu do uzavřených nádob značný obsah ergosterolu. V prvních hodinách hlavního kvašení se toto množství snižuje, protože to odpovídá periodě aktivního pomnožení kvasinek. 24,28-dehydroergosterol se objevuje v buňkách po 5 hodinách. V tabulce jsou uvedeny výsledky i ostatních metabolických změn.

Vliv předcházející kultivace na kvasinky a vliv obsahu ergosterolu na kvašení je patrný z grafu 2. Byly použity dva druhy kultury:

1. získané propagací s periodickým vzdušněním (průměrné množství kyslíku 4,6 mg/l),

2. po kvašení.
Obsah ergosterolu v kvasinkách odpovídal 5 mg/g a 0,7 mg/g. Mladina použitá pro tyto modelové zkoušky nebyla vzdušněna po sterilaci. Získané údaje ukazují, že existuje závislost mezi rychlostí kvašení a množstvím ergosterolu v kvasinkách jako přímý důsledek tvorby sterolu za přítomnosti kyslíku, stupněm pomnožení, přírůstkem biomasy a využitím živných látek mladiny. Je rovněž zřejmé, že při aerobním pomnožení kvasinek (nebo při odpovídající předběžné úpravě uchovávaných kvasinek) není nutné vzdušnění mladiny. Jestliže se však přidávají kvasinky po kvašení s nízkým obsahem ergosterolu k mladině bez vzdušnění, vede to k útlumu pomnožování kvasinek a k snížení jejich aktivity. V literatuře se uvádí, že je to velmi důležité při kvašení vysokoextraktivní mladiny [6]. Kromě obsahu kyslíku závisí stupeň syntézy sterolů také na množství násadních kvasinek [2, 3, 13]. Optimální množství kvasinek při zakvašování zajišťuje nezbytnou koncentraci sterolů v kvasničné kultuře i nezbytný obsah glykogenu.

Druhá skupina lipidových složek, na jejichž obsahu záleží fyziologický stav kvasinek, jsou nenasycené mastné kyseliny. Zkouškami za přidání detergentu Tween₈₀ (jako monoleátu) v množství 40 mg/l a 60 mg/l byla zkoumána citlivost kvasinek na změny koncentrace této látky. Byla použita mladina bez dodatečného vzdušnění (obsah kyslíku 3 mg/l).



Obr. 2a, b

Tab. 4. Vliv přidání detergentu Tween₈₀ na pomnožení a metabolismus kvasinek kmene 13

Přidání k mladině	Přírůstek biomasy [g]	Sušina [g/l]	Asimilace aminodusíku [mg/l]	Stupeň prokvašení [%]	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	Alkohol [%]	Ergosterol [mg/l]
Bez přidání detergentu	0,0086	3,8	71,0	75,0	200,0	3,3	8,5
S přidáním	0,0107	4,1	73,0	75,0	203,0	3,4	8,0

Tab. 5. Vliv přidání detergentu Tween₈₀ na pomnožení a metabolismus kvasinek kmene 51

Přidání k mladině	Přírůstek biomasy [g]	Sušina [g/l]	Asimilace aminodusíku [mg/l]	Stupeň prokvašení [%]	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	Alkohol [%]	Ergosterol [mg/l]	Ethylacetát [mg/l]
Bez přidání detergentu	0,0088	3,7	75,0	79,3	249,0	3,5	9,6	22,0
S přidáním	0,0092	3,9	75,5	80,0	203,0	3,6	9,0	20,5

Tab. 6. Vliv přidání detergentu Tween₈₀ na pomnožení a metabolismus kvasinek kmene 74

Přidání k mladině	Přírůstek biomasy [g]	Sušina [g/l]	Asimilace aminodusíku [mg/l]	Stupeň prokvašení [%]	$Q \frac{N_2}{CO_2}$	Alkohol [%]	Ergosterol [mg/l]	Ethylacetát [mg/l]
Bez přidání detergentu	0,0092	3,5	78,0	78,0	213,0	3,4	10,0	16,4
S přidáním	0,0105	3,6	81,0	79,8	227,0	3,6	7,4	14,0

Výsledky jsou uvedeny v tab. 4 až 6, jako průměrné hodnoty, protože nebyly stanoveny rozdíly v činnosti těchto dvou koncentrací. Rovněž u tří kmenů přidání detergentu Tween₈₀ urychluje kvašení a zvyšuje množství alkoholu v pivo. To souvisí se zvýšením stupně pomnožení a přírůstku biomasy a aktivnějším využitím aminodusíku z prostředí. Existuje však rozdíl mezi kmeny v těchto ukazatelích. Tak u kmenů 13 a 51 přidání detergentu Tween₈₀ nezvyšuje fermentační schopnost na

maltóze $\left(Q \frac{N_2}{CO_2} \right)$; u kmene 74 lze pozorovat obdobný

efekt, avšak pouze při vyšší z obou zkoumaných koncentrací. Je zajímavé si povšimnout, že syntéza ergosterolu jeví tendenci ke snížení, to je zvláště jasné u kmene 74. Tento kmen ukazuje v nejvyšší míře zvýšení celkové aktivity kvasinek při zvýšeném obsahu kyseliny olejové v prostředí. Tyto rozdíly mezi kmeny lze vysvětlit některými různostmi v požadavcích kvasinek na koncentraci kyslíku v mladině [9]. V těchto podmínkách se mění vlastnosti buněčných membrán a aktivita acetyl-CoA-karboxylázy vede k biosyntetickým pochodům [19], čímž je možno vysvětlit pokles syntézy esterů [7]. Taylor et al. zjišťují, že přidáním extraktu lipidů k mladině se zvyšuje obsah nenasycených mastných kyselin v buňkách po kvašení. Autoři tím vysvětlují stimulační působení lipidů a jejich vliv na kvalitu piva [18].

Našími zkouškami jsme zjistili, že přidáním detergentu Tween₈₀ se dosáhne hlubšího prokvašení mladiny, zakvašené kvasinkami s nenormálně zvýšenou rychlostí flokulace. Za těchto podmínek probíhá kvašení velmi pomalu, avšak lipidy zvyšují přírůstek nových buněk — 3,6 g/l až 3,1 g/l a tím současně i stupeň prokvašení po 122 hodinách kvašení — 54,7 % a 48,1 %.

Všechny údaje ukazují, že vliv ergosterolu a kyseliny olejové na kvasinky je velmi podobný. Anderson a Kirsop [7] však předpokládají, že dodatečný přírůstek biomasy, která se tvoří po přidání detergentu Tween₈₀, se kvalitativně liší od biomasy získané přidáním ergosterolu k mladině. V prvním případě vznikají převážně strukturální a rezervní složky, kdežto v druhém případě se projevuje vliv na enzymovou aktivitu kvasinek.

Výsledky tohoto výzkumu ukázaly, že změny obsahu lipidů v buňkách a v mladině mají velký vliv na různé stránky metabolismu. Syntéza sterolů, resp. ergosterolu je pochodem určujícím stupeň pomnožení kvasinek a jejich fyziologickou aktivitu v dalších technologických úsecích. Snížení rychlosti kvašení je možné v mnoha případech spojit se změnou stupně a rychlosti syntézy

sterolů v závislosti na podmínkách a vlastnostech kmenů. Způsob předběžné kultivace násadních kvasnic je faktorem ovlivňujícím složení lipidů v buňkách a využití potenčních možností lipidů pro regulaci a optimalizaci kvašení.

Lektoroval Ing. J. Čepička, CSc.

Literatura

- [1] KOTEL'NIKOVA, A. - ZVJAGIL'SKAJA, P.: Biochimija droževich mitochondrij, Izd. „Nauka“, Moskva 1974
- [2] ARIES, V., KIRSOP, B.: J. Inst. Brewing, 1978, **84**, č. 2, 118
- [3] ARIES, V., KIRSOP, B.: J. Inst. Brewing, 1977, **83**, č. 4, 220
- [4] ARIES, V., KIRSOP, B., TAYLOR, G.: Proc. EBC, 1977, 255
- [5] AHVENAISEN, J.: J. Inst. Brew., 1982, **88**, č. 6, 367
- [6] AHVANAINEN, J., MÄKINEN, V.: Proceedings EBC, 1981, 285
- [7] ANDERSON, R., KIRSOP, B.: J. Inst. Brew., 1974, **80**, č. 1, 48
- [8] BREWIK, D., OWADES, J.: J. Agricultural Food Chem., 1957, **5**, č. 5360
- [9] DAVID, M., KIRSOP, B.: J. Inst. Brew., 1973, **79**, č. 1, 20
- [10] DAVID, M., QUAIN, D., TUBB, R.: MBAA Technical Quarterly, 1982, **19**, č. 1, 29
- [11] DILLEMANS, M., MASSCHELEIN, C.: Cerevisia, 1981, **6**, č. 4, 195
- [12] HAUKELI, A., LIE, S.: Proceedings EBC, 1979, 461
- [13] HAUKELI, A., LIE, S.: J. Inst. Brewing, 1976, **82**, č. 3, 161
- [14] QUAIN, D., TUBB, R.: J. Inst. Brewing, 1983, **86**, č. 1, 38
- [15] QUAIN, D., THURSON, P., TUBB, R.: J. Inst. Brewing, 1981, **87**, č. 2, 108
- [16] SUOMALAINEN, H., NURIMINEN, T.: J. Inst. Brewing, 1976, **82**, č. 4, 216
- [17] SHAW, W., JEFFERIES, P.: The Analyst, 1953, **78**, č. 9, 514
- [18] TAYLOR, G., THURSON, P., KIRSOP, B.: J. Inst. Brewing, 1979, **85**, č. 4, 219
- [19] THURSON, P., TAYLOR, G.: J. Inst. Brewing, 1981, **87**, č. 1, 92v

Ginova-Stojanova, T. - Janeva, V.: Syntéza ergosterolu a aktivita pivovarských kvasinek. Kvas. prům., **31**, 1985, č. 9, s. 201—204.

Byla provedena syntéza ergosterolu třemi kvasničnými kmeny v laboratorních zkouškách i v provozu za různých podmínek kvašení a posouzení stanoveného vztahu mezi syntézou ergosterolu, přírůstkem biomasy a metabolismem glykogenu. Výsledky ukazují závislost rychlosti kvašení na množství ergosterolu v násadních kvasinkách. Změna obsahu nenasycených lipidů v buňce a v mladině má velký vliv na fyziologický stav kvasinek — pomnožení a růst buněk, využití živných látek z prostředí a tvorbu metabolitů. Složení lipidů v kvasinkách je faktor, jímž lze regulovat kvašení.

Гинова-Стойанова, Т., Янева, В.: Синтез эргостерола и активность пивных дрожжей. Квас. прум. **31**, 1985, № 9, стр. 201—204.

Был проведен синтез эргостерола тремя дрожжевыми

штаммами в лабораторном и производственном масштабе при разных условиях брожения и обсуждено установленное отношение между синтезом эргостерола и приростом биомассы и метаболизмом гликогена. Результаты показывают зависимость скорости брожения от содержания эргостерола в маточных дрожжах. Изменение содержания ненасыщенных липидов в клетке и охмеленном сусле оказывает большое влияние на физиологическое состояние дрожжей — размножение и рост клеток, использование питательных веществ из среды и образование метаболитов. Состав липидов в дрожжах — это фактор, при помощи которого можно регулировать брожение.

Ginova-Stojanova, T. - Janeva, V.: Synthesis of Ergosterol and Activity of Brewing Yeasts. Kvas. prům. **31**, 1985, No. 9, pp 201—204.

The synthesis of ergosterol was tested with three yeast strains on laboratory and plant scale under different conditions of fermentation. The relations among ergosterol synthesis, biomass growth and glycogen metabolism were determined. The results show that the rate of fermentation depends on the content of ergosterol in the inoculated yeasts. The content of unsaturated lipids in cells and wort significantly affects the cell physiology — multiplication and growth of cells, an utilization of nutrients and a production of metabolites. The lipid composition of yeasts is the factor with whom the fermentation can be controlled.

Ginova-Stojanova, T. - Janeva, V.: Synthese des Ergosterols und Aktivität der Bierhefen. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 9, S. 201—204.

Es wurde die Synthese des Ergosterols durch drei Hefestämme in Laborversuchen sowie auch im Betrieb bei verschiedenen Gärungsbedingungen und weiter die Auswertung der ermittelten Beziehung zwischen Ergosterolsynthese, Biomasse-Zuwachs und Glykogenmetabolismus durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen die Abhängigkeit der Gärungsgeschwindigkeit von dem Ergosterol-Gehalt in der Anstellhefe. Die Änderungen des Gehalts der ungesättigten Lipide in der Zelle und in der Würze hat einen wesentlichen Einfluß auf den physiologischen Zustand der Hefe — Vermehrung und Wachstum der Zellen, Ausnützung der Nährstoffe aus dem Milieu und Bildung von Metaboliten. Die Zusammensetzung der Lipide in den Hefen stellt den Faktor dar, durch den die Gärung reguliert werden kann.