

Obsah a složení sterolů různých kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

579.121 576.3

Ing. BOŽENA BĚHALOVÁ, CSc., RNDr. ČENĚK NOVOTNÝ, CSc., Ing. JIŘÍ ZAJÍČEK, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, Ing. JIŘINA PÁSKOVÁ, CSc., Výzkumný ústav koncernu konzerváren a lihovarů, Praha, Ing. JOSEF LATI-NÁK, CSc., Ing. MILAN KOŽENÝ, Východočeské chemické závody, Synthesia, n. p., Pardubice

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae, testování kmenů, množství a složení sterolů, ergosterol*

ÚVOD

Kvasinky *S. cerevisiae* jsou klasickým zdrojem ergosterolu, sloužícího k přípravě antirachitického vitamínu D₂.

Roční spotřeba ergosterolu pro výrobu vitamínu D₂ ve Východočeských chemických závodech Pardubice se po-hybuje v rozmezí 4–5 t. Zhruba 2/3 tohoto množství se získává izolací z 1000 t lisovaného pekařského droždí. Zbývající třetina se dováží z KS oblasti, neboť omezená kapacita izolační části větší množství droždí zpracovávat neumožňuje.

Steroly z droždí se získávají po alkalické hydrolyze, extrakci organickými rozpouštědly a krystalizaci. Izolační postup byl vypracován pro běžné pekařské droždí, kde asi 1 % ergosterolu představuje přibližně 80 % sterolové frakce.

Současné produkční kmeny pekařských kvasinek, se-lektované na vysoký nárůst sušiny ve fermentorech

moderních droždáren (až 50 g l⁻¹) mají nízký obsah 5,7nenasycených sterolů (0,7–0,9 %), ve kterých je i vlastní obsah ergosterolu poměrně nízký. Jelikož se počítá s tím, že droždí pro izolaci ergosterolu bude v sa-mostatných šaržích produkováno i nadále v droždárnách, bylo nutno vybrat kulturu, která má vedle schopnosti zvýšené tvorby ergosterolu alespoň průměrné vlastnosti pekařského droždí a vysoký nárůst biomasy na melasovém médiu ve fermentorech s aeračním zařízením typu FRINKS, kterými se české droždárny po-stupně vybavují.

Obsah ergosterolu v pekařském droždí lze zvyšovat dvojím způsobem.

a) výběrem kmenů s výkonnou metabolickou dráhou syntézy sterolů a tím i ergosterolu.

b) vhodně volenými podmínkami fermentace zajistit vysoký obsah ergosterolu v biomase za současného omezení tvorby metabolicky nižších a pro výrobu ergosterolu balastních sterolů.

Složení kvasničných sterolů bylo analyzováno především z hlediska produkce ergosterolu. V buňce *S. cerevisiae* bylo dosud identifikováno asi 20 různých sterolů [1]. Za majoritní jsou považovány ergosterol a ergosta 5,7,22,24/28/tetraen-3 β -ol, neboť 24/28/dehydroergosterol, dále zymosterol, fecosterol a lanosterol [2].

Ergosterol a 24/28/dehydroergosterol jsou hlavními zástupci Δ 5,7sterolů v buňce. 24/28/dehydroergosterol je přímým prekurzorem ergosterolu, kterému se podobá struktuře molekuly i fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Ergosterol provází až po krystallizaci, kde zvyšuje nezpracovatelný podíl matečného louhu a tím snižuje výtěžek izolace.

MATERIÁL A METODY

Fermentace

Kvasničné kmeny *Saccharomyces cerevisiae* ze sbírek VÚ KOLI a MBÚ ČSAV se porovnávaly na syntetické Olson-Johnsonově půdě [3] v kultivacích v 50 ml baňkách a na melasové půdě s kukuřičným výluhem, obsahující 5 % sacharosy a zvýšený poměr C:N = 35:1 [4, 5] v 500 ml baňkách a v 75 l fermentoru.

80 ml média v 500 ml baňkách bylo zaočkováno 10 ml inokula narostlého na tekuté sladině a kultivováno při teplotě 30 °C 48 hodin na reciproké třepačce s frekvencí třepání 1,5 Hz.

75 l fermentor (Bioengineering, Švýcarsko) byl plněn 50 l média a očkován 0,6 l inokula, narostlého na Olson-Johnsonově půdě v baňkách. Kultivace probíhala 45 h při 30 °C, vzdušnění 25 l min⁻¹ a otáčkách míchadla 500 ot. min⁻¹. Počáteční pH 7 nebylo během procesu regulováno.

Stanovení sterolů

Celkové steroly byly stanoveny Liebermann-Buchardovou reakcí [6]. Obsah Δ 5,7 sterolů byl určen z hodnot UV absorbance a molárního extinkčního koeficientu pro ergosterol a 24/28/dehydroergosterol při 282 nm [7], obsah 24/28/dehydroergosterolu z hodnoty absorbance a molárního extinkčního koeficientu při 230 nm a obsah ergosterolu byl vypočten z rozdílu Δ 5,7sterolů a 24/28/dehydroergosterolu [8]. Postup hydrolyzy kvasinek a extrakce sterolů probíhal dříve popsaným způsobem [9].

Stanovení sušiny

Definovaný objem kultury byl po centrifugaci promyt a sušen při 105 °C do konstantní hmotnosti.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky testace kvasničných kmenů vybraných ze 78 kmenů *S. cerevisiae* sbírky VÚ KOLI a MBÚ ČSAV jsou shrnuti v tabulkách 1 a 2. Srovnávací 48hodinové kultivace v baňkách probíhaly na dvou typech médií. Na melasové půdě s kukuřičným výluhem, na které bylo dosaženo vysoké syntézy sterolů (indukční půda) a na syntetické Olson-Johnsonově půdě, obecně používané v laboratorních podmínkách (standardní půda).

Při kultivaci na Olson-Johnsonově půdě připadá větší-

Tabulka 1. Obsah sterolů kmenů *S. cerevisiae*, kultivovaných na syntetické Olson-Johnsonově půdě

Kmen	nS [%]	D [%]	E [%]	E/nS [%]	Celkové steroly [%]	Sušina biomasy [g . l ⁻¹]
U ₉₂	2,29	0,74	1,55	68	2,34	6,6
FET ₁	1,52	0,46	1,06	70	1,76	6,8
010/F	1,37	0,47	0,90	66	1,47	7,6
DK ₁	1,42	0,45	0,97	68	1,37	7,6
HK	1,64	0,64	1,00	61	1,50	8,8
A ₂₂	2,12	0,71	1,41	67	2,17	7,8
SAF ₁	1,69	0,65	1,04	62	1,82	7,4
F	2,40	0,83	1,57	65	2,70	6,9
MI	1,43	0,39	1,04	73	1,38	6,7
TK ₃	2,47	0,91	1,56	63	2,41	7,6

Procentní obsah 5,7nenasyzených sterolů v sušině biomasy (nS), 24/28/dehydroergosterolu (D), ergosterolu (E)

Tabulka 2. Obsah sterolů kmenů *S. cerevisiae*, kultivovaných na melasové půdě s kukuřičným výluhem

Kmen	nS [%]	D [%]	E [%]	E/S [%]	Celkové steroly [%]	Sušina biomasy [g . l ⁻¹]
U ₉₂	3,06	1,67	1,39	45	4,55	10,6
FET ₁	2,02	1,06	0,96	48	2,44	8,1
010/F	1,89	1,03	0,86	46	2,58	9,9
DK ₁	1,76	0,59	1,17	66	2,31	7,8
HK	1,76	0,89	0,87	49	2,35	9,7
A ₂₂	4,38	2,34	2,04	47	5,15	9,7
SAF ₁	1,75	0,90	0,85	49	1,83	9,1
F	2,38	1,29	1,09	46	3,15	10,5
MI	1,91	1,01	0,90	47	2,34	8,3
TK ₃	3,28	1,80	1,48	45	3,88	9,5

Procentní obsah 5,7nenasyzených sterolů v sušině biomasy (nS), 24/28/dehydroergosterolu (D), ergosterolu (E)

na obsahu celkových sterolů na Δ 5,7steroly, v nichž téměř 70 % tvoří ergosterol. Poměr ergosterolu k 24/28/dehydroergosterolu, počítaný ze spektrofotometrických dat je přibližně 2:1.

V množství syntézovaných sterolů se jednotlivé kmeny navzájem podstatně liší.

Při kultivaci na melasové půdě s kukuřičným výluhem vzniká rozdíl v syntéze sterolů jednotlivých kmenů. Zároveň klesá obsah 5,7nenasyzených sterolů v podílu celkových sterolů. Obsah ergosterolu tvoří téměř 50 % frakce 5,7nenasyzených sterolů, takže poměr ergosterolu a 24/28/dehydroergosterolu, počítaný ze spektrofotometrických dat, je při tomto typu fermentace přibližně 1:1. Z hlediska čistoty ergosterolu se v podmírkách kultivace na třepačce vymyká ze sledovaného souboru selektát DK₁, izolovaný ze sušeného droždí dovezeného do VCHZ pro izolaci ergosterolu z Dánska.

Porovnáním kultivací na dvou různých půdách se obecně potvrdilo, že pro složení sterolové frakce je volba kultivačního média určujícím faktorem.

Užší výběr nejlepších producentů se testoval ve čtvrtprovozním měřítku na melasové půdě s přídavkem kukuřičného výluhu. Pro nízkou tvorbu balastních sterolů byl společně s 5 kmeny *S. cerevisiae* zkoušen 1 kmen *Saccharomyces diastaticus*. Přehled složení sterolů uvádí tabulka 3.

Tabulka 3. Obsah sterolů kvasinek kultivovaných na melasové půdě s kukuřičným výluhem ve čtvrtprovozním měřítku

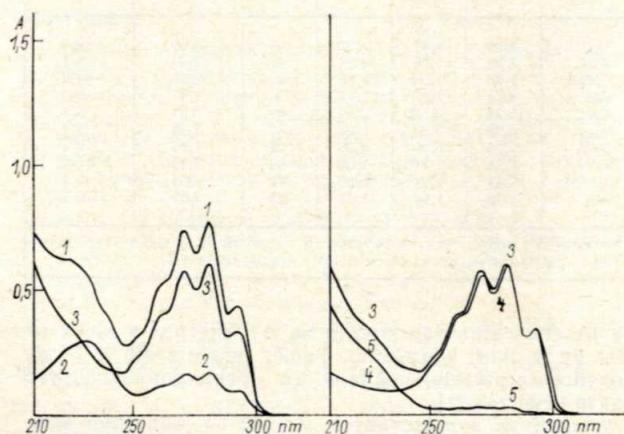
Kmen	nS [%]	D [%]	E [%]	E/S [%]	Celkové steroly [%]	Sušina biomasy [g . l ⁻¹]
A ₂₂	3,30	1,41	1,89	57	4,43	13,4
U ₉₂	2,48	1,07	1,41	57	3,95	14,7
DK ₁	2,49	1,34	1,15	46	4,64	13,3
KBD	3,52	1,58	1,94	55	4,90	12,8
10-CF	1,98	0,90	1,08	55	3,28	14,7
S. diastat.						
SD/25	1,19	0,22	0,97	82	1,21	7,7

Procentní obsah 5,7nenasyzených sterolů v sušině biomasy (nS), 24/28/dehydroergosterolu (D), ergosterolu (E)

I při kultivaci v 50 l fermentorech tvoří na melasové půdě s kukuřičným výluhem ergosterol asi 50 % frakce Δ 5,7sterolů a poměr ergosterolu a 24/28/dehydroergosterolu ze spektrofotometrických dat je 1:1. Nejlepšími producenty ergosterolu jsou kmeny *S. cerevisiae* A₂₂ a KBD. Složení sterolové frakce je obdobné jako při kultivacích v baňkách. Kmen DK₁ si při kultivaci ve fermentoru zvýšený obsah ergosterolu ve frakci Δ 5,7sterolů nepodržel. Kvasinky *S. diastaticus* mají výrazně nižší obsah sterolů i nárůst biomasy.

UV spektra sterolových extraktů vybraných kmenů byla podrobně analyzována za současného dělení kapalino-vou chromatografií. Ukázka analýzy typického spektra

z fermentace na melasové půdě s přídavkem kukuřičného výluhu je na obr. 1. V daných kultivačních podmínkách je charakteristické, že vysoká syntéza ergosterolu je doprovázena vysokým obsahem balastních sterolů, mezi nimi i 24/28/dehydroergosterolu.



Obr. 1. Kvasničný kmen A₂₂

1 — UV spektrum měřeného vzorku, 2 — spektrum 24/28/dehydroergosterolu (získaného z HPLC), 3 — diferenční spektrum I (—24/28/dehydroergosterol), 4 — spektrum standardu ergosterolu, 5 — diferenční spektrum II (diferenční spektrum I — ergosterol) pozadí

Z výsledků je patrné, že zatímco výše syntézy sterolů je vlastností kvasničného kmene, je indukce zvýšené tvorby sterolů a složení sterolové frakce závislé na podmínkách kultivačního procesu. Obecnými podmínkami zvýšené syntézy celkových i 5,7nenasycených sterolů jsou nízká růstová rychlosť, limitní živení dusíkem a aerobní metabolismus [5]. Při vzrůstající syntéze sterolů však obvykle klesá podíl 5,7nenasycených sterolů v celkovém množství sterolů i podíl ergosterolu ve frakci 5,7nenasycených sterolů.

Lektoroval Ing. J. Páca, CSc.

Literatura

- [1] RATTRAY J. B. M., SCHIBECI A., KIDBY D. K.: Bacteriol. Rev. **39**, 197, 1975.
- [2] QUAIN D. E., HASLAM J. M.: J. Gen. Microbiol. **111**, 343, 1979.
- [3] OLSON B. H., JOHNSON M. J.: J. Bacteriol. **57**, 235, 1949.
- [4] BĚHALOVÁ B.: Dizertační práce: Využití *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu kvasničného autolyzátu a ergosterolu. MBÚ ČSAV, Praha 1983.
- [5] ŠTROS F.: Získávání droždí s vysokým obsahem ergosterinu. Závěrečná zpráva výzk. úkolu č. 04.01 VÚ KOLI, 1958.
- [6] FÜRST W.: Arch. Pharm. **3000**, 353, 1957.
- [7] SHAW W. H. C., JEFFERIES J. P.: Analyst **78**, 509, 1953.
- [8] BREIVIK O. N., OWADES J. L.: Arg. Food Chem. **5**, 360, 1957.
- [9] VOTRUBA J., BĚHALOVÁ B., BERAN K.: Folia microb. ol. **31**, 1986, s. 69.

Běhalová, B. - Novotný, Č. - Zajíček, J. - Pásková, J. - Latinák, J.: Obsah a složení sterolů různých kmenů

Saccharomyces cerevisiae. Kvas. prům. **32**, 1986, č. 7—8, s. 194—196.

U vybraného souboru kmenů *Saccharomyces cerevisiae* byla testována schopnost zvýšené produkce ergosterolu. Obsah ergosterolu, Δ5,7sterolů i celkových sterolů závisí na použitém kmene i na podmínkách kultivace. Nejlepšími producenty byly kmeny A₂₂ a KBD, dosahující asi 2 % ergosterolu v sušině při fermentacích na melasové půdě s kukuřičným výluhem. Poměr ergosterolu a 24/28/dehydroergosterolu v syntetické Olson-Johnsonově půdě byl ve srovnání s fermentacemi na melasové půdě s kukuřičným výluhem dvojnásobný.

Бегалова, Б., Новотны, Ч., Зайичек, Ю., Паскова, И., Латинак, И., Кожены, М.: Содержание и состав стеролов разных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*. Квас. прум. 32, 1986, № 7—8, стр. 194—196.

У комплекса штаммов *Saccharomyces cerevisiae* проверялась способность повышенной продукции эргостерола. Содержание эргостерола, $\Delta 5,7$ стеролов и общих стеролов менялось в зависимости от применяемого штамма и условий культивирования. Наилучшими производителями являлись A₂₂ и КБД, достигающие около 2 % эргостерола сухого веса в субстрате мелассы с кукурузным щелком. Соотношение эргостерола и 24/28 дегидроэргостерола в синтетической среде Ольсон-Джонсона показало двойную величину в сравнении с ферментацией в мелассовой среде с кукурузным щелком.

Běhalová, B. - Novotný, Č. - Zajíček, J. - Pásková, J. - Latinák, J. - Kožený, M.: Level and Composition of Sterols of Various Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Kvas. prům. **32**, 1986, No. 7, pp. 194—196.

In the strain-complex of *Saccharomyces cerevisiae* the ability of increased ergosterol production was tested. The contents of ergosterol, $\Delta 5,7$ sterols and total sterols changed itself in relation to used strain and cultivation conditions.

The best producers are A₂₂ and KBD, attaining cca 2 % ergosterol in dry matter on molasses medium with corn steep. The relation of ergosterol and 24/28dehydro-ergosterol on the synthetic Olson-Johnson medium had in the comparison with fermentation on molasses medium with corn steep a twice value.

Běhalová, B. - Novotný, Č. - Zajíček, J. - Pásková, J. - Latinák, J. - Kožený, M.: Der Gehalt und die Zusammensetzung der Sterole verschiedener Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 7—8, S. 194—196.

Bei einem Komplex von *Saccharomyces cerevisiae* — Stämmen ist erhöhte Produktionsfähigkeit von Ergosterol testiert worden. Der Gehalt an Ergosterol, $\Delta 5,7$ Sterolen und Gesamtsterolen änderte sich in Abhängigkeit vom benutzten Stamm sowie von Kultivationsbedingungen. Als beste Produzenten haben sich A₂₂ und KBD erwiesen, cca 2 % Ergosterol im Trockengehalt auf Melasseboden mit Maisauslauge erreichend. Das Verhältnis von Ergosterol und 24/28Dehydroergosterol auf dem synthetischen Olson-Johnson-Medium hatte im Vergleich mit der Fermentation auf Melasseboden mit der Maisauslauge den zweifachen Wert erreicht.