

Mikrobiální produkce glukosa-6-fosfátdehydrogenasy

663.4

Doc. Ing. BLANKA KRÁLOVÁ, Ing. PETR BASAŘ, Doc. Ing. KATEŘINA DEMNEROVÁ
Katedra biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemickotechnologická, Praha

Klíčová slova: pivo, kvasinky, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, glukosa

ÚVOD

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (D-glukosa-6-fosfát NAD(P) oxidoreduktasa E.C.1.1.1.49) je enzym, který se používá v klinické biochemii ke stanovení glukosy [1–3]. Kmeny *Saccharomyces* a *Candida* jsou v literatuře často citovány jako intracelulární producenti tohoto enzymu [4, 5]. Proto jsme věnovali pozornost některým zástupcům těchto rodů, které jsou používány jako průmyslové kmeny v pivovarech, droždárnách a při výrobě krmného droždí. Vezmeme-li v úvahu, že v ČSFR se vyrábí ročně přibližně 24 miliónů hl piva, přičemž se vyprodukuje asi 300 tun sušiny odpadní biomasy, příprava biologicky aktivních látek z tohoto materiálu by měla značný ekonomický význam, a to tím spíše, že většina enzymů pro analytické účely je dovážena z valutové oblasti.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G-6-PDH) se vyskytuje v buňkách prakticky všech mikroorganismů. V pentosovém cyklu, někdy označovaném jako hexosomonofosfátový zkrat, který je vedle glykolysy a následujícího citrátového cyklu hlavním reakčním mechanismem odbourávání sacharidů, se G-6-PDH zúčastňuje přeměny hexos v pentosy [6].

Aktivita G-6-PDH je u různých mikroorganismů rozdílná. U kvasinek je aktivita tohoto enzymu ve směs vyšší za aerobních podmínek než v anaerobním prostředí [7, 8]. Naopak u bakterií rodu *Escherichia coli* nebyla prokázána limitace aktivity kyslíkem [9]. Dále se zjistilo, že specifická ak-

tivita G-6-PDH při aerobním růstu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je na různých zdrojích uhlíku stejná, což potvrzuje, že syntéza uvedeného enzymu není pravděpodobně indukována ani reprimována glukosou.

Z dosavadních výzkumů vyplývá, že účast pentosového cyklu, jehož součástí je i G-6-PDH, na energetickém metabolismu je u různých druhů mikroorganismů rozdílná a ve značné míře závislá na komplexnosti složení fermentačního média [10, 11].

G-6-PDH kvasinek má relativní molekulovou hmotnost 102 000–128 000 [12, 13, 14]. Optimální pH pro činnost tohoto enzymu je 9,2. Enzym má ve své molekule osm SH-skupin, z nichž dvě reagují přímo, čtyři další reagují až po změně terciární struktury proteinu [15]. Enzym je vysoce specifický pro glukosa-6-fosfát, podstatně pomaleji reagují galaktosa-6-fosfát, 2-deoxy-glukosa-6-fosfát a glukosamin-6-fosfát [16].

V pivovarských kvasinkách byla G-6-PDH zjištěna v extraktu kvasnic *Warburgem* a *Christianem* [17] a označena jako mezenzym. V téže době se jejím studiem zabýval i *Cori* a *Lipmann* [18]. *Reiff* [19] popisuje nejvyšší aktivitu G-6-PDH v počátečním stadiu kvašení mladiny, tj. v době aerobního odbourávání cukrů. *Kornberg* [20] stanovil tento enzym v různých kmenech pivovarských kvasinek a izoloval jej frakcionací bílkovinného podílu biomasy.

Heyse a *Piendl* [21] studovali vliv složení mladiny na aktivitu enzymů vybraných kmenů spodních pivovarských kvasinek. Zjistili, že v koncent-

rovaných mladinách s 13,7 % a s 19,8 % extraktu dochází k represi aktivity G-6-PDH při poklesu extraktu asi 0,1 g na 100 ml fermentačního média. Maximální aktivita byla zaznamenána po utilizaci asi 3 g extraktu na 100 ml. Po zkvašení 6 g extraktu na 100 ml nastává rapidní pokles aktivity. U 12,1 % mladin se aktivita zvyšuje od počátku fermentace do doby utilizace 3 g na 100 ml extraktu, aktivita je celkově vyšší než u koncentrovanějších mladin a po dosažení maxima je pokles nejprve pozvolnější a ke konci kvašení náhle strmý. U níže procentních mladin může být inhibice aktivity způsobena již lehce zvýšeným obsahem sacharidů, aminokyselin a kovových iontů, přičemž v mladinách s vysokým obsahem extraktu se již tato inhibice neprojeví.

Vliv složení mladiny na aktivitu G-6-PDH, která je klíčovým enzymem pentosového cyklu [21], je v určitých směrech podobný jako u klíčového enzymu glykolisy, tj. fosfofruktokinasy (ATP: D-glukonát-6-fosfotransferasa, EC.2.7.1.11.). U obou enzymů při fermentaci mladin s vysokým obsahem extraktu se zjistila represe aktivity v prvých fázích kvašení. U G-6-PDH se při zkvašování mladin s různým obsahem extraktu zjistila maximální aktivita vždy při poklesu extraktu o 3 g na 100 ml fermentovaného média, což ukazuje, že rychlost syntézy, resp. aktivace tohoto enzymu není ovlivněna koncentrací substrátu, ale aktivita byla jednoznačně vyšší v hlavních fázích fermentace v kvasinkách z 12% mladin v porovnání s kvasinkami z 13% a 20% mladin. Na rozdíl od toho aktivita fosfofruktokinasy v kvasinkách z 12% mladiny dosáhla maxima rovněž při poklesu o 3 g na 100 ml, ale u koncentrovanějších mladin až při poklesu o 5 g na 100 ml. Přitom vliv koncentrace mladiny na celkovou výši aktivity nebyl jednoznačný.

Z krátkého přehledu literárních údajů vyplývá, že na aktivitu G-6-PDH v pivovarských kvasinkách, stejně jako na další enzymy, má vliv velké množství faktorů. Nejvýznamnější se zdá být složení a koncentrace zkvašované mladiny a vlastnosti použitého kmene kvasinek.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismy

Saccharomyces uvarum (pivovarské kvasinky) byly odebrány z výroby 12% světlého piva. Číselné označení kvasničných kmenů je podle sbírky VÚPS Praha.

Kmen č. 9 — středněhlubokopokvašující kmen, vzorky odebrány v pivovaru A z propagační stanice. Složení sypání na várky: 90 % slad, 10 % sacharosa.

Kmen č. 7 — středněhlubokopokvašující kmen, vzorky odebrány v pivovaru B — odpad ze spilky po desátém nasazení. Složení sypání na várky: 100 % slad.

Kmen č. 96 — hlubokopokvašující kmen, vzorky odebrány v pivovaru B — odpadní kvasnice ze spilky po šestém nasazení. Složení sypání na várky: 100 % slad.

Kmen č. 2 — středněhlubokopokvašující až hlu-

bokopokvašující kmen, vzorky odebrány v pivovaru C ze spilky po prvním nebo druhém nasazení. Složení sypání na várky: 82 % slad, 18 % sacharosa.

Saccharomyces cerevisiae (pekařské droždí): byly použity vzorky 3 druhů — vzorek lisovaného droždí odebraný ve výrobě, vzorek sušeného droždí, vzorek droždí z obchodní sítě.

Candida utilis: z výroby krmného droždí v Paskově.

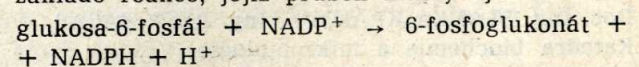
Candida lipolytica: průmyslový kmen ze sbírky VÚPP Praha.

Sušina mikrobiálních buněk byla stanovena gravimetricky.

Extrakce buněčného obsahu: buňky byly dezintegrované opakovaným zmrazením (4krát) nebo dvojnásobnou dezintegrací na X-lisu (firma Biox, Švédsko). Dezintegrovaná biomasa byla pak extrahována fosfátovým tlumivým roztokem 0,1 mol.l⁻¹ pH 7,6 v množství 2 ml na 1 g biomasy. Po 15minutovém míchání byla suspenze odstředěna při frekvenci otáček 7000 min⁻¹.

Stanovení aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy

G-6-PDH byla stanovena v buněčném extraktu na základě reakce, jejíž průběh katalyzuje:



Změny absorbance při 340 nm způsobené v průběhu reakce redukcí NADP⁺ se proměřují spektrofotometricky. Reakční směs má toto složení: 2,6 ml 0,1 mol.l⁻¹ triethanolaminového pufru pH 7,6; 0,2 ml 0,1 mol.l⁻¹ roztoku MgCl₂; 0,1 ml 11 mmol.l⁻¹ roztoku NADP⁺; 0,1 ml 35 mmol.l⁻¹ roztoku glukosa-6-fosfátu. K promíchané reakční směsi se přidá 0,1 ml extraktu. V minutových intervalech se měří absorbance vzorku při 340 nm. Aktivita G-6-PDH se pak vypočte ze vztahu [22]

$$U = \frac{3 \times \Delta A}{\epsilon \times 1,0 \times 0,01} \quad 1 U = 16,6 \text{ nkat}$$

kde U je aktivita G-6-PDH v jednotkách na 1 ml
ε — konstanta 6,22;

ΔA — aritmetický průměr rozdílů absorbancí za 1 min.

K metodě stanovení aktivity G-6-PDH je třeba dodat, že s popsáním stanovením může interferovat aktivita 6-fosfoglukonátdehydrogenasy (6-fosfo-D-glukonát: NADP oxidoreduktasa, E.C.1.1.1.44.), která katalyzuje přeměnu 6-fosfoglukonátu na ribuloso-5-fosfát a bezprostředně navazuje na činnost G-6-PDH. Podle informací v literatuře [21] je průběh aktivity 6-fosfoglukonátdehydrogenasy během fermentace v pivovarských kvasinkách ovlivňován stejnými faktory i stejnou měrou, jako u G-6-PDH. Proto lze předpokládat, že výsledky budou zatíženy stejnou chybou. Kromě toho je do reakční směsi přidáván substrát pouze pro G-6-PDH, tedy glukosa-6-fosfát, který je teprve v průběhu reakce přeměňován na 6-fosfoglukonát. Nelze proto předpokládat, že by se v počátečních fázích reakce, kdy je aktivita měřena, druhý enzym uplatnil významnou měrou.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Aktivita G-6-PDH ve všech testovaných vzorcích *Saccharomyces cerevisiae* byla poměrně nízká a pohybovala se v rozmezí 0,5–2,1 Ug⁻¹ biomasy. Poněkud vyšší aktivita byla naměřena u biomasy *Candida utilis* z produkce krmných kvasinek (asi 4,5 Ug⁻¹ biomasy). Nejvyšší aktivitu prokazovala odpadní biomasa získaná z pivovarů, avšak naměřené hodnoty se v jednotlivých vzorcích pivovarských kvasinek značně lišily (0,17–21,2 Ug⁻¹ biomasy).

Tabulka 1 ukazuje hodnoty aktivity G-6-PDH na-

Tab. 1. Aktivita G-6-PDH (NADP) v extraktech z biomasy získané při průmyslové výrobě

Vzorek	Aktivita G-6-PDH (Ug ⁻¹ biomasy)
pivovarské kvasnice (<i>Saccharomyces uvarum</i>):	
pivovar A	3,5 — 8,5
pivovar B	15,0 — 21,2
pivovar C	1,5 — 3,9
pivovar D	6,9 — 13,4
pivovar E	0
pivovar F	0,17 — 0,49
krmné kvasnice (<i>Candida utilis</i>):	
průmyslová biomasa	4,6
sbírkový kmen	0
<i>Candida lipolytica</i> :	
průmyslový kmen ze sbírky	0
pekařské kvasnice (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>):	
čerstvé z výroby	0,9 — 2,1
z obchodní sítě	0,5
sušené z výroby	0

měřené v extraktu biomasy po dezintegraci buněk opakovaným zmrazováním.

V další práci jsme se zaměřili na tři pivovary s vysokou produkcí odpadní biomasy, které se navzájem liší technologií výroby piva, používanými kmeny a složením mladiny. Biomasa z těchto pivovarů byla dezintegrována dvojím způsobem, a to opakovaným zmrazováním a na X-lisu. Výsledky shrnuje tab. 2.

Tab. 2. Aktivita G-6-PDH (NADP) v extraktech z biomasy vyprodukované ve 3 různých pivovarech

Pivovar	Složení mladiny	Kmen č.	Aktivita G-6-PDH (U · g ⁻¹ sušiny) (U · g ⁻¹ buněk)			
			x	m	x	m
A	90% slad 10% sach.	9	94,5	23,1	23,5	8,2
B	100% slad	7	125,1	83,9	31,2	20,9
B	100% slad	96	144,3	71,2	36,1	17,5
C	82% slad 18% sach.	2 1 ×	46,4	15,6	11,6	3,9
C	82% slad 18% sach.	2 2 ×	30,1	12,6	7,5	3,1

Poznámka:

m dezintegrace opakovaným mražením
x dezintegrace na X-lisu
u kmene č. 2 je označen počet nasazení (1 × a 2 ×)

Porovnáním výsledků stanovení aktivity G-6-PDH v extraktech získaných po dezintegraci buněk dvěma různými způsoby jsme došli k jednoznačnému závěru, že způsob dezintegrace má zásadní vliv na množství uvolněné aktivity do extraktu. Této otáz-

ce je proto nezbytné při porovnávání výsledků věnovat patřičnou pozornost.

Z výsledků uvedených v tab. 2 dále vidíme, že různé kmeny vykázaly sice rozdílné hodnoty aktivity G-6-PDH, ale druh kmene se při posuzování variability výsledků nezdá být dominantním faktorem. To lze dokumentovat výsledky aktivity zjištěné v pivovaru B u kmenů č. 7 a č. 96. Ačkoliv kmen č. 7 je středněhlubokoprokvašující a kmen č. 96 hlubokoprokvašující, aktivity byly v obou případech vysoké a navzájem se příliš nelišily. Obdobné technologické vlastnosti jako kmen č. 96 má i kmen č. 2 používaný v závodě C a přitom jeho aktivita G-6-PDH oproti kmenu č. 96 je asi třetinová.

Nejvýraznější vliv na aktivitu G-6-PDH v pivovarských kvasnicích se zdá mít složení mladiny, která je příslušnými kmeny fermentována. Mladiny závodu A a B se liší od mladiny závodu C především stupněm náhrady sladu sacharosou (pivovar A — 100 % sladu, pivovar B — 90 % sladu, 10 % sacharosy, pivovar C — 82 % sladu, 18 % sacharosy). Piva ze závodu A a B jsou méně prokvašená nežli piva ze závodu C (pivovar A: 59–64 % skutečné prokvašení, pivovar B: 56–58 % skutečné prokvašení, pivovar C: 64–67 % skutečné prokvašení). Z výsledků v tab. 2 je patrné, že aktivita G-6-PDH je výrazně nižší u vzorků z pivovaru C, tzn. z fermentace s mladinou bohatou na jednoduché sacharidy a s nižší hladinou vysokomolekulárních polysacharidů, polyfenolů a hořkých chmelových látek.

Určitý vliv na aktivitu diskutovaného enzymu má pravděpodobně i technologická fáze, ze které byly kvasnice odebrány. Z provedených analýz lze předpokládat tendence snížení aktivity s počtem předešlého nasazení kvasnic do výrobního procesu (viz pivovar C kmen č. 2 nasazený 1krát a 2krát).

V literatuře [21] se udává, že maximální aktivita G-6-PDH je v 12% mladinách dosažena třetí až čtvrtý den kvašení. Po zkvašení více než dvou třetin extraktu nastává rapidní pokles aktivity G-6-PDH. V naší práci jsme však našli poměrně vysokou aktivitu i v kvasnicích sbíraných po hlavním kvašení. Domníváme se, že po sebrání kvasnic a jejich proprání studenou vodou, která je nasycena kyslíkem, dochází převodem kvasinek do aerobního prostředí k stimulaci aktivity G-6-PDH.

ZÁVĚR

Ze studovaných průmyslových kmenů *Saccharomyces* a *Candida* se jako nejlepší producenti G-6-PDH osvědčily pivovarské kvasinky.

Na aktivitu G-6-PDH v kvasnicích má vliv řada faktorů, z nichž jako nejdůležitější se ukázalo složení mladiny, tj. zkvašeného média, dalším v pořadí je použitý kmen kvasinek a posléze i počet nasazení dané biomasy v předchozích cyklech do výroby.

Poměrně vysoká aktivita studovaného enzymu byla zjištěna i v odpadních pivovarských kvasnicích (30–125 Ug⁻¹ sušiny biomasy). Ačkoliv je během závěrečných fází hlavního kvašení popisován radikální pokles [21] aktivity G-6-PDH, převodem sbíraných kvasnic se zbytky piva do aerob-

ního prostředí propírací studené vody dojde zřejmě ke zpětné stimulaci aktivity tohoto enzymu.

Literatura

- [1] Boehringer, Mannheim Methods of Enzymatic Analysis, 1984.
 - [2] Sigma, St. Louis, Katalog firmy, 1988.
 - [3] Brautechnische Analysemethoden, Band III, Mebak, Freising-Weihenstephan 1982, s. 580.
 - [4] WANG C. H., GREGG C. T., FORBUSCH I. A., CHRISTENSEN B. E., CHELDELIN V. H.: J. Am. Chem. Soc., **78**, 1956, s. 1869.
 - [5] LEVY H. R.: Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol., **48**, 1979, s. 97.
 - [6] BENDOŤOVÁ, O., KAHLER, M.: Pivovarské kvasinky, SNTL, Praha, 1981, s. 71.
 - [7] CHAPMAN C., BARTLEY W.: Biochem. J., **107**, 1968, s. 455.
 - [8] OURA E.: The Effect of Aeration in the Growth, Energetics and Biochemical Composition of Baker's Yeast, Alko, Helsinki 1972.
 - [9] SCOTT D. B. M.: Biochem. J., **63**, 1956, s. 587
 - [10] CHEN S. L.: Biochem. Biophys. Acta, **32**, 1959, s. 470.
 - [11] LANGUAS R., CANCEDO J. M.: Eur. J. Biochem., **37**, 1973, s. 90.
 - [12] ANDREUS P.: Biochem. J., **96**, 1965, s. 595.
 - [13] YUE R. H., NOLTMANN E. A., KUBY S. A.: Biochemistry, **6**, 1967, s. 1174.
 - [14] DOMAGK G. F.: Z. physiol. Chem., **350**, 1969, s. 626.
 - [15] DOMSCHKE W., HINUEBER C., DOMAGK G. F.: Z. physiol. Chem., **361**, 1970, s. 194.
 - [16] DEMNEROVÁ K. et al.: Mikrobiální enzymy pro analytiku [Výzkumná zpráva HS 82238/20/85], VŠCHT, Praha 1985.
 - [17] WARBURG O., CHRISTIAN W.: Biochem. J., **287**, 1936, s. 440.
 - [18] CORI O., LIPMANN, F.: Nature, **138**, 1936, s. 588.
 - [19] REIFF E. et al.: Die Hefen, Band I, Hans Carl, Nürnberg 1960, s. 553.
 - [20] KORNBERG H.: J. Biol. Chem., **182**, 1950, s. 805.
 - [21] HEYSE K. U., PIENDL A.: Wall. Lab. Comm., XXXV. 1972, s. 35.
 - [22] Boehringer, Mannheim Biochemical Information, 1987, s. 30.
- Králová, B. - Basař, P. - Demnerová, K.: Mikrobiální produkce glukosa-6-fosfátdehydrogenasy.** Kvas. prům., **37**, 1991, č. 1, s. 1—4.
- V různých průmyslových kmenech kvasinek byla stanovena aktivita glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (dále G-6-PDH). Nejlepším zdrojem tohoto enzymu z testovaných mikroorganismů byly pivovarské kvasnice. Biomasa z různých pivovarů se však v aktivitě G-6-PDH značně lišila. Výše enzymové aktivity byla závislá na technologickém procesu, na složení mladiny a na použitým produkčním kmenu.
- Кралова, Б. - Басарж, П. - Демнерова, К.: Микробіальная продукция глюкоза-6-фосфатдегідрогеназы.** Квас. прум., **37**, 1991, № 1, стр. 1—4.
- V разных промышленных штаммах дрожжей была определена активность глюкоза-6-фосфатдегідрогеназы (далее G-6-PDH). Наилучшим источником этого энзима из исследуемых микроорганизмов были пивоваренные дрожжи. Биомасса из разных пивоваренных заводов однако по активности G-6-PDH значительно отличалась друг от друга. Величина энзимной активности зависела от технологического процесса, состава охмеленного сусле и от примененного штамма.
- Králová, B. - Basař, P. - Demnerová, K.: Microbial Production of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase.** Kvas. prům., **37**, 1991, No. 1, pp. 1—4.
- The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) was determined in various industrial strains of yeasts. From microorganisms tested the best resource of this enzyme was brewing yeast. However, the activity of G-6-PDH varied in yeasts from different breweries. The enzyme activity was dependent on the technology used, on the wort composition and the production strain.
- Králová, B. - Basař, P. - Demnerová, K.: Mikrobiāle Produktion der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase.** Kvas. prům., **37**, 1991, Nr. 1, S. 1—4.
- In verschiedenen industriellen Hefestämmen wurde die Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (weiter G-6-PDH) bestimmt. Als beste Quelle dieses Enzyms hat sich die Bierhefe gezeigt. Die aus verschiedenen Brauereien stammende Hefe wies jedoch beträchtliche Unterschiede in der G-6-PDH-Aktivität auf. Die Höhe der Enzymaktivität hing von dem technologischen Prozeß, von der Zusammensetzung der Würze und von dem angewandten Produktionsstamm ab.