

AZ AEROB ÉS AZ ANAEROB ELŐKEZELÉS HATÁSA AZ ÉLESZTŐK ALKOHOLTŰRÉSÉRE

ZSOLT JÁNOS

(Érkezett: 1952 november 15-én)

Általánosan ismert, hogy az élő szervezetek milyen nagy mértékben függenek a külső körülményektől és hogy ez a befolyás az élesztőknél és általában a mikroorganizmusoknál, melyek olyan szorosan kapcsolódnak környezetükhöz, még sokkal erősebb. Ha egy tulajdonságot, legyen ez mondjuk az élesztők alkoholtűrése, számszerűen jellemezni akarunk, mindig figyelembe kell vennünk a külső körülmények döntő befolyását. Egy WARBURG-manométerben kapott erjesztési értékből semmi komolyabb következtetést sem vonhatunk le, mert — tapasztalat szerint — egy óra múlva ugyanazon az anyagon egészen más értéket kaphatunk. Ez nem azt jelenti, hogy hibásan mértünk, hanem azt, hogy már nem ugyanazt az anyagot vizsgáltuk. A sejtek állás közben ugyanis megváltoztak.

Alább ismertetett kísérleteimben az alkoholtűrés ilyen megváltozásának felderítéséhez igyekeztem adatokat gyűjteni.

Kísérleti anyag és módszer

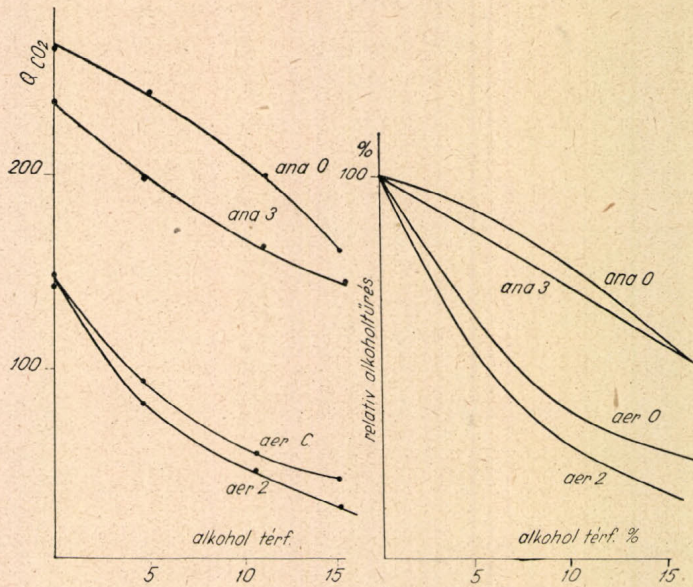
Vizsgálataimhoz pékélesztőt és a Szőlészeti Kutatóintézet gyűjteményének (SOÓS, ÁSVÁNY, 1952) *Ménes I* és *Dreher A* jelzésű törzseit használtam.

Az alkoholtűrésre WARBURG-manométerekben 30 fokon, m/20 KH_2PO_4 oldatban 1% glukóz és különböző alkoholkoncentrációk mellett kapott erjesztési értékekből következtettem. A grafikonokon feltüntettem 1 mg szárazanyagra vonatkoztatva az 1 óra alatt termelt CO_2 normálköbmilliméterket (Q_{CO_2}) és külön az erjesztési értékek %-os csökkenését (»relatív alkoholtűrés«), minden sorozatban 100%-nak véve a 0% alkohol mellett kapott értéket.

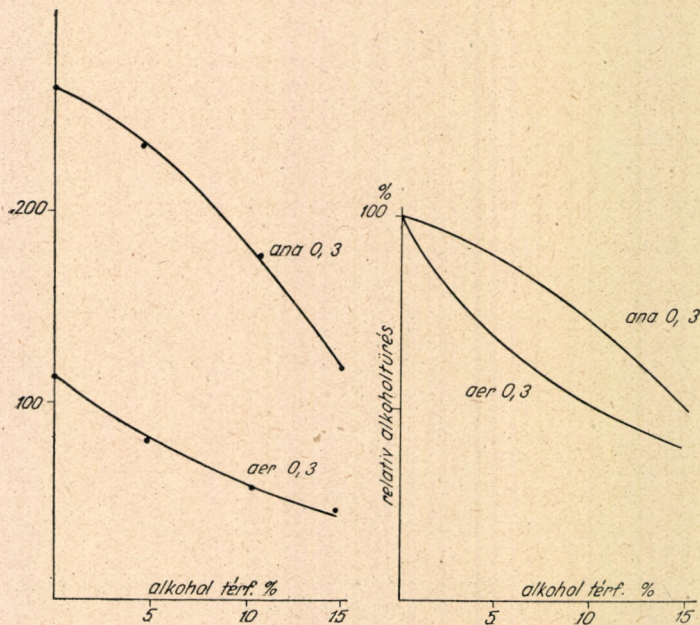
Kísérleti eredmények

Kísérletek Ménes 1-gyel és Dreher A-val

5—5 g melaszos táptalajban nevelt, mosott élesztőt szuszpendáltam 100—100 ml m/10 KH_2PO_4 -ben. Adtam hozzá 2—2 g glukózt és színig telt szűknyakú mérőlombikban, illetve széles Erlenmeyer-lombikban rázógépen inkubáltam őket 24 órát. Utána centrifugáltam őket és 1% glukózt tartalmazó m/10 KH_2PO_4 -ben szuszpenziót készítettem belőlük. Ezt kevertem különböző



1. ábra. Kísérletek Ménes 1-gyel. Magyarázat a szövegben



2. ábra. Kísérletek Dreher A-val. Magyarázat a szövegben

koncentrációjú alkohololdatokkal és mértem az erjesztőképességet. Az eredményeket és a belőlük számított relatív alkoholtűrési értékeket az 1. és a 2. ábra tünteti fel. A görbék aer., ill. ana. jelzése az aerob, ill. anaerob inkubációra vonatkozik, a melléjük írt számok pedig a szuszpenzió készítésétől az illető sorozat vizsgálatának kezdetéig eltelt időt mutatják órákban.

Kísérletek pékélesztővel

Élesztőszuszpenziókat (5 g 100 ml m/10 KH_2PO_2 -ban) részben aerob, részben anaerob körülmények között inkubáltam 3 óra hosszat. Ezután vizsgáltam erjesztőképességüket levegőben és nitrogénben. Az eredményeket a 3. ábra mutatja.

18 órán át aeroban, ill. anaeroban inkubált szuszpenziókat m/1000 töménységben KCN-nel mérgezve, kaptam az ugyancsak a 3. ábrán feltüntetett eredményeket.

Frissen készített szuszpenzió (2 g 100 ml-ben) egyik felét m/1000 töménységben p-nitrofenollal mérgeztem, másik fele kontrollként mérgezetlen maradt. A méréseket azonnal elkezdtem és 3 óra múlva újra megmértem a glukózos szuszpenziók erjesztőképességét. Az eredmények a 4. ábrán láthatók.

Az eredmények megbeszélése

Az eredményekből mindenekelőtt az tűnik ki, hogy a WARBURG-manolméterben mért erjesztési értékek felhasználásában nagyon óvatosan kell eljárunk. Nemcsak arról van itt szó, hogy egy élesztő különböző összetételű táptalajokon nevelve egészen eltérő értékeket ad (CSIK, PÁZONYI, ZSOLT, 1951), hanem arról is, hogy az élesztősejt akkor is változik a külső körülmények szerint, ha közben nem szaporodik. Az élesztősejt élő szervezet, mely a külső körülmények és a kezelés által meghatározott állapot szerint állandóan változik, és ennek eredményeképpen az anyagcserefolyamatok megváltozása sokszor 1–2 óra alatt is komoly méretű lehet.

A megváltozások törvényszerűségeit még nem ismerjük pontosan. LINDEGREN (1946) a sejtekben felhalmozott tartalékoknak tulajdonít nagy fontosságot, főleg a glikogénnek. A glikogéndús sejtek anyagcsereje lassú, a tartalékok eltávolításával viszont meggyorsul. LINDEGREN eredményeivel ellentézetet vall HENNEBERG (1926), aki a glikogént ebből a szempontból lényegtelennek tartja. LINDNER (1922) kísérletei viszont LINDEGREN nézetét támogatják. WEIS (1949) azt írja, hogy a frissen szuszpendált élesztők erjesztési értékei kezdetben rohamosan, később lassabban csökkennek. Összehasonlító értékek nyerése érdekében javasolja, hogy az élesztőt 25 fokon 12 órára 1% glukózt tartalmazó m/20 KH_2PO_4 -ben szuszpendáljuk. Hogy a dolog nem olyan egyszerű, mutatják saját vizsgálataim. Ezekből kiderül, hogy glukózos pufferban állva a sejtek erjesztőképessége nem mindig esik. Így pl. a Dreher A erjesztési értékei nem csökkentek a megfigyelés 3 órája alatt, ugyanakkor a Ménes I-nél az anaeroban előkezelt sejtek erjesztési értéke csökkent, az aeroban előkezeltké változatlan maradt kb. ugyanennyi idő alatt. A mondottak az alkoholmentes közegben mért erjesztési értékekre vonatkoznak. Ezeket a méréseket levegőben végeztem!

Mindez szükségessé teszi, hogy újból hangsúlyozzam a warburgozással kapott értékek elbírálásának nehézségeit. Általános érvényű, mechanikusan alkalmazható eljárást összehasonlító értékek nyerésére nemigen fogunk találni. Ha azonban a vizsgálatok kiszélesítésével sokkal nagyobb anyagot fogunk megismerni ebből a szempontból, reményünk lehet bizonyos összefüggések felfedezésére a törzsek eme tulajdonságai és anyagcseretípusuk között.

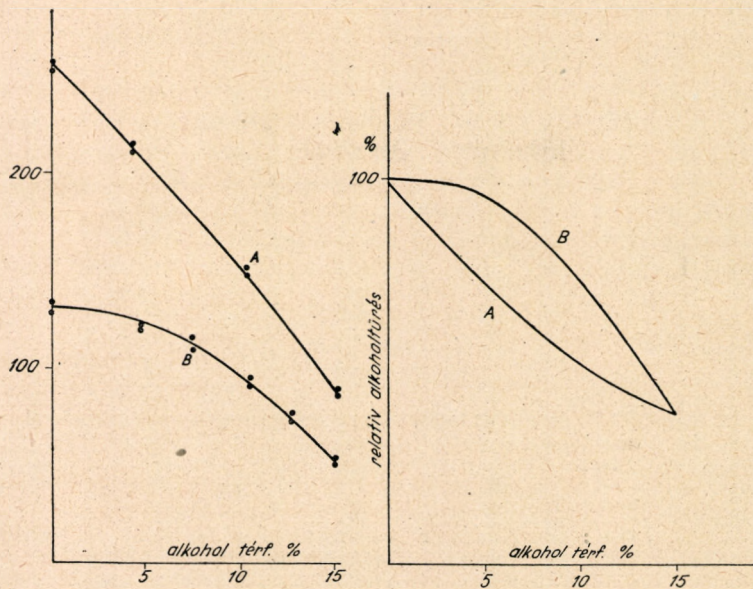
Ami az alkoholtúrést illeti, általános érvényű szabálynak látszik, hogy az aeroban előkezelt sejtek érzékenyebbek alkohollal szemben, mint az anaeroban előkezelték. Grafikusan ábrázolva az előbbi esetben konkáv, az utóbbi esetben konvex görbét kapunk. Az alkoholtúrés észrevehetően csökkenhet már 1—2 óra alatt is, ha a szuszpenzió nagyobb felületen érintkezik a levegővel. Az aerob előkezelés, ami alatt a sejtek enzimrendszerüket oxidatív anyagcserére építik át (WARBURG, 1927), az alkoholtúrést csökkenti. Ez a csökkenés természetesen függ az élesztő fajtájától. A *Dreher A*-nál nem olyan nagy a különbség az aeroban, ill. anaeroban kezelt sejtek alkoholtúrése között, mint a *Ménes I*-nél. Nevezetes mármint, hogy a *Dreher A* sörélesztő, melynek oxidatív enzimrendszere jelentéktelen. A *Ménes I* borélesztő, jóval fejlettebb lélegző-apparátussal. Az alkoholtúrésben mutatkozó különbséget az aerob előkezelés után a kezelés alatt különböző intenzitással folyó lélegzés, illetve az ennek következtében oxidatív irányban eltolódó anyagcsere okozhatja. Ezt mutatja az is, hogy aerob viszonyok között állva a *Ménes I* szuszpenziójában az alkoholtúrés aránylag rövid idő alatt is tovább csökken, míg a *Dreher A*-nál nemigen változik.

Az eddig tárgyalt alkoholtúrési görbéket levegőben mért erjesztési értékekből vezettem le. Más lesz a helyzet, ha erjesztés közben a sejteknek nincs alkalma lélegzeni. Nitrogénben, vagy m/1000 KCN jelenlétében az aeroban, ill. anaeroban előkezelt sejtekkel ugyanazokat a görbéket kaptam. Így természetesen alkoholtúrésben sem mutatkozik különbség. A cianidos és nitrogénés kísérletek közti különbség természetesen még magyarázatra szorulna. Hogy a cianid bizonyos fokig bénítja az erjedést, már régóta ismeretes (WARBURG, 1925). Viszont az alkoholtúrésben határozottan mutatkozó különbség a cianidos szuszpenziók javára további vizsgálatokat kíván. Gondolhatunk itt metodikai hibára is. A WARBURG-készülék megtöltése oxigénmentes nitrogénnel komoly probléma, és tudjuk, hogy már 1% oxigén is komoly hibákat okozhat (KREBS, 1929).

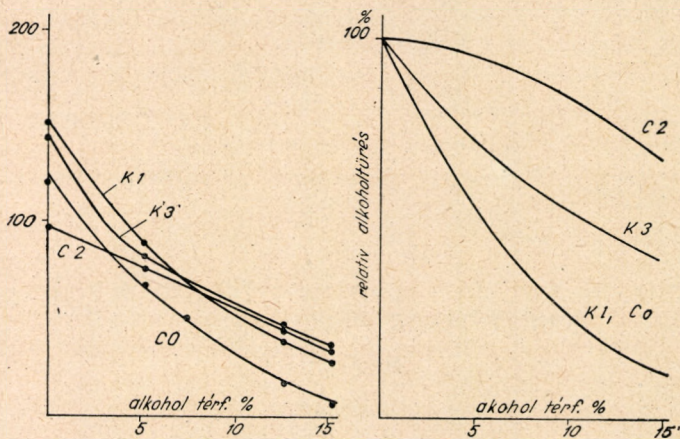
PASTEUR-reakció néven ismeretes az a jelenség, hogy lélegzés hatására az erjesztő anyagcsere háttérbe szorul. MEYERHOF (1950) kísérletei szerint ezt a reakciót a p-nitrofenol specifikusan gátolja, azaz p-nitrofenol jelenlétében az erjesztési értékek ugyanazok nitrogénben is, mint levegőben, bár közben utóbbi esetben a lélegzés tovább folyik. Saját kísérleteim szerint a p-nitrofenol ugyan megemelte az abszolút erjesztési értékeket, a relatív alkoholtúrés azonban csökkent. Tekintve, hogy ezeket a méréseket levegővel töltött edényekben végeztem, a sejtek közben zavartalanul lélegezhetek. Úgy látszik tehát, hogy az alkoholtúrés mindig csökken, mikor a sejteknek lehetőségük van a lélegzésre, és az előkezelés hatása a lélegző apparátus különböző mértékű kialakításában rejlik.

Meg kell még itt emlékeznünk GRAY (1948) vizsgálatairól, aki összefüggést talált a sejtek zsírtartalma és alkoholtúrésük között. Kísérletei szerint a magasabb zsírtartalmú sejtek alkoholtúrése kisebb. Saját eredményeim azt mutatják, hogy az alkoholtúrést a lélegzés befolyásolja. A zsírtartalom emel-

kedése az aeroban előkezelt sejtekben ettől függetlenül jöhet létre az aerob körülmények hatására (LINDEGREN, 1946).



3. ábra. Kísérletek pékélesztővel. Aeroban és anaeroban előkezelt élesztővel kapott alkoholtűrés görbék. »A« nitrogénben, »B« cianid mellett



4. ábra. Kísérletek pékélesztővel. »K« p-nitrofenol jelenlétében, »C« anélkül

Összefoglalás

Fent ismertetett kísérleteimben vizsgáltam egy anyagcserejelenségnek, az élesztők erjesztőképességének alakulását emelkedő alkoholkoncentrációk mellett a lélegzés és erjesztés szempontjából különböző típusú élesztőszusz-

penziókban. A különböző anyagcseretípusú szuszpenziókat részben már eredetileg különböző típusú élesztőből (sör-, bor-, ill. pékélesztőből) állítottam elő, részben pedig a szuszpenziók különböző előkezelésével módosítottam ugyanazon törzsön belül az anyagcserét. Az előkezelésnek lényege a lélegzés/erjesztés arány különböző irányú eltolása volt. Ezt aerob, ill. anaerob inkubációval, ill. enzimmérgekkel (KCN, p-nitrofenol) értem el.

Az eredmények alapján fordított viszonyt állapítottam meg a sejtek lélegzése és alkoholtűrésük között. Minden kezelés, mely a lélegzőapparátust fejleszti, csökkenti az alkoholtűrést. Az alkoholtűrés csökkenéséhez azonban szűk séges a sejtek tényleges lélegzése is erjesztés közben.

Vizsgálataim a környezet hatásai szerint állandóan módosuló élő szervezetként mutatják be az élesztőket és támpontot nyújtanak a WARBURG-metodikában közismerten nehéz reprodukálhatóság problémájának megoldására.

IRODALOM

- CSIK L., PAZONYI B., ZSOLT J. (1951): Lélegzési és erjesztési vizsgálatok a *Saccharomyces cerevisiae anamensis* élesztőgombán. *Annal. Biol. Tihany* **20**. 249.
- GRAY, W. D. (1948): Further studies on the alcohol tolerance of yeast: its relationship to cell storage products. *J. Bact.* **55**. 53.
- HENNEBERG, W. (1926): Handbuch der Gärungsbakteriologie.
- KREBS, A. (1929): Methode der manometrischen Messung von Atmung und Gärung in Oppenheimer, C., Pincussen, L.: Die Methodik der Fermente.
- LINDEGREN, C. (1946): Additional and corrected data on the respiratory and fermentative activity of yeasts containing stored reserves. *Arch. Biochem.* **9**. 353.
- LINDNER, P. (1922): in Fuhrmann, F. (1926): Einführung in die Grundlagen der technischen Mykologie. p. 224.
- MEYERHOF, O., FIALA, S. (1950): Pasteur effect in dead yeast. *Biochim. et Biophys. Acta* **6**. 1.
- SOÓS I., ÁSVÁNY Á. (1952): A magyar borélesztők morfológiai és fiziológiai vizsgálata. *Szőlészeti Kutatóintézet Évkönyve* **10**. 255.
- WARBURG, O. (1925): Über die Wirkung der Blausäure auf die alkoholische Gärung. *Biochem. Zeitschr.* **165**. 196.
- WARBURG, O. (1927): Über den Stoffwechsel der Hefe. *Biochem. Zeitschr.* **189**. 350.
- WEIS, J. (1949): Beitrag zur Methodik von Stoffwechselfersuchen mit Hefe. *Wien. Z. inn. Med.* **30**. 75.

ВЛИЯНИЕ АЭРОБНОЙ И АНАЭРОБНОЙ ОБРАБОТКИ НА СПИРТОУСТОЙЧИВОСТЬ ДРОЖЖЕЙ

Я. Жолт

Р е с ю м е

В приведенных выше опытах автор изучал ход одного явления обмена веществ у дрожжей, в частности сбраживающую способность при повышающихся концентрациях спирта, в различных по типу дыхания и сбраживания дрожжевых суспензиях. Дрожжевые суспензии с различным типом обмена веществ были приготовлены отчасти уже из оригинально различных типов дрожжей (пивные, виноградные и пекарные дрожжи), а отчасти различной обработкой автор изменил обмен веществ у дрожжей того же самого штамма. Сущность предварительной обработки представляет собой сдвиг в различное направление соотношения дыхания брожения. Это достигалось аэробной или же анаэробной инкубацией и воздействием ферментативными ядами (KCN, п-нитрофенол).

На основании полученных результатов автор установил между дыханием и спиртоустойчивостью клеток обратную зависимость. Всякая обработка, развивающая дыхательный аппарат клеток, понижает их спиртоустойчивость. Однако, для понижения спиртоустойчивости необходимо и настоящее дыхание клеток в процессе брожения.

В свете исследований автора, дрожжи представляют собой живые существа, постоянно изменяющиеся в зависимости от влияния окружающей среды. Проведенные исследования дают основание для решения общеизвестно трудной проблемы воспроизведения в методике Варбурга.

THE EFFECT OF AEROBIC AND ANAEROBIC PRE-TREATMENT ON THE ALCOHOL TOLERANCE OF YEASTS

J. ZSOLT

Summary

In the above experiments the development of a metabolic phenomenon, the fermentation capacity of yeasts, was investigated, in yeast suspensions of various types, from the standpoint of respiration and fermentation, using rising concentrations of alcohol. The various metabolic types of suspension were prepared partly from yeasts originally of different types (beer, wine or bakers' yeasts), partly by modifying the metabolism within one and the same strain by various pre-treatments of the suspensions. The essential of the pre-treatments was a shift in different directions of the respiration fermentation ratio. This was achieved by aerobic or anaerobic incubation, or by enzyme poisoning (KCN, p-nitrophenol).

The results showed that an inverse ratio exists between the respiration of the cells and their alcohol tolerance. Any treatment which develops the respiratory apparatus reduces the alcohol tolerance. To reduce alcohol tolerance, however, some actual respiration of the cells during fermentation is necessary.

These studies show the yeasts as living organisms constantly modified by environmental circumstances and provide a basis for surmounting the well-known difficulties in reproducing by the Warburg method.