

Az élesztők szénhidrátjainak szétválasztása és átesoportosulásuk vizsgálata a nemzedék-váltakozással kapcsolatban

PAZONYI BÉLA és MÁRKUS LÁSZLÓNÉ

*Magyar Tudományos Akadémia Genetikai Intézete és Agrokémiai Kutató Intézet
Biokémiai Osztálya, Budapest*

Ismeretes, hogy az élesztősejtek szénhidráttartalma meglehetősen ingadozó, és szárazanyagra vonatkoztatva 20–50% között váltakozhat. Az ingadozás főoka abban rejlik, hogy a szénhidráttartalom nagymértékben függ attól, milyen természetes vagy üzemi környezetben és milyen módon éli életét az élesztő. A levegőztetéses (aerob) életmód folyamán inkább a sejt élőanyaga, a fehérjék gyarapodnak, az erjesztéses (anaerob) életmód inkább a szénhidrátok sejtben belüli felhalmozásának kedvez.

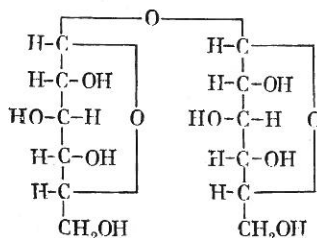
Ma már ismerjük az élesztősejtben nagyobb mennyiségben fellelhető valamennyi szénhidrátot. E szénhidrátok kutatása *Errera* [2] ama felfedezésével kezdődik, hogy az élesztősejtben jelentős mennyiségű glikogén található. Tulajdonképpen azonban a különféle szénhidrátokra vonatkozó ellentmondó adat között csak az utóbbi két évtized kutatásai alapján tudunk tájékozódni. A zavarokat főleg az okozta, hogy a különböző kutatók különböző módon elszaporított eltérő fajú, sőt más nemzetségbe sorolt élesztőket analizáltak és sem ezt, sem egymás eredményeit nem vették figyelembe; az eljárásmodok sem voltak tökéletesek s a szénhidrátok teljes szétkülönítése csak a legutóbbi időkben sikerült.

Igy pl. *Nickerson* [16] még 1949-ben is az összes hidrolizálható szénhidrát mellett csak a glikogént méri külön s a gyarapodásukból vagy csökkenésük-ből következtet a szénhidrátok változásaira.

Az élesztők szénhidrátjai és szerkezetük

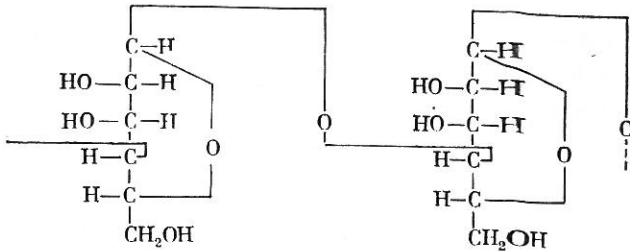
Mai ismereteink szerint az élesztősejtekben a következő szénhidrátok fordulnak elő jelentősebb mennyiségben: *Trehalóz (mikóz)*. Ezt a diszaharidát *Koch* [9] majd *Tanret* [22] találták meg az élesztőben. Mennyisége kb. a szárazanyag 10%-ára tehető.

Mannán (élesztőgumi). Az élesztősejt egyik legstabilisabban megmaradó poliszaharidája, mert éheztesítéskor mennyisége nem csökken bizonyos szint alá. Erjedéskor mennyisége ingadozik s a plazmában is és a sejtfallal kapcsolatban is kimutatható. Azt, hogy az élő sejtben is mint mannan fordul elő — és nem a kezelés hatására keletkezett műtermék *Stockhausen* és *Silbereisen* [20, 21] döntötték el. Szerkezetét *Haworth*, *Heath* és *Peat* [6] és velük szinte egyidőben *Hassid*, *Joslyn* és *McCready* [5] állapították meg.

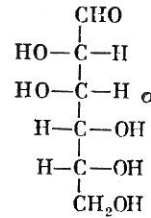


α , α —*Trehalose* (1 α *Glucosido* [1,5]—1—*Glucose* [1,5])

Az élesztő mannán d-mannopiranozid részekből van felépítve, amelyben a glikozidkötések a 4. sz. C atomhoz kapcsolódnak, mint a cellulózban, de — mint az amilopektin és a glikogén — már elágazó szerkezetű.

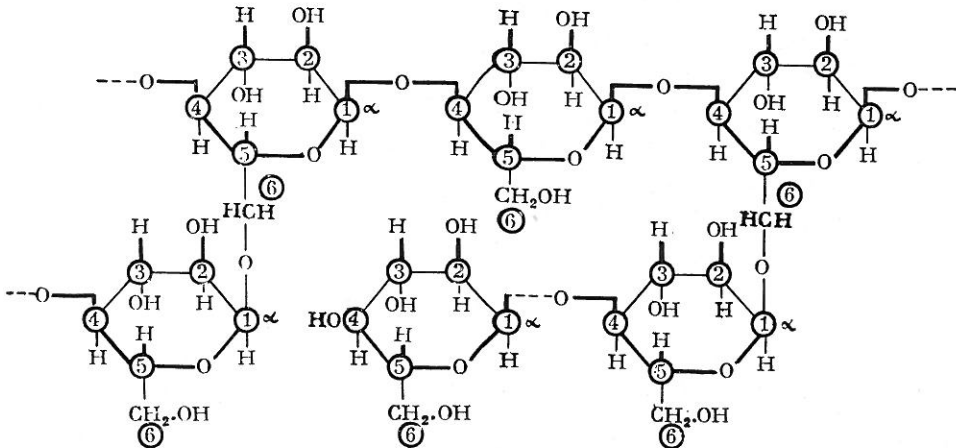


Az élesztő mannán jellemző szerkezeti részlete
Hidrolizálva d-mannózt szolgáltat.



d-mannóz, az élesztő mannán
hidrolízis terméke

Glikogén. Errera már említett felfedezése után jőideig csak citológiai úton, festési eljárással mutatták ki. Az élesztők életfolyamataiban való szerepére itt nem térhetünk ki. Ling, Nanji és Paton [13] szerint két formában található: mint könnyen oldható, könnyen mobilizálható, plazmával kapcsolatos rész és mint nehezen oldható, sejtfallal is kapcsolatban álló alkotó vegyület.

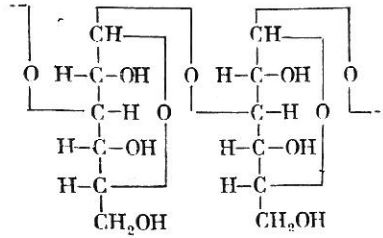


A glikogén [4]. Felső sorban a főlánc, alsóban az oldalláncok elágazása és végződése látható

Glukán (»hemicellulóz«, élesztőcellulóz). A mannán és glikogén mellett a sejtfa fő-szénhidrátja. (Természetesen e szénhidrátok mellett a sejtfaiban fehérjék és más vegyületkomplexumok is vannak.) A glukán különválasztását, összetételének megállapítását Zechmeister és Tóth [25, 26] végezték el. Eredményeiket Somogyi [19] és Haehn [4] szerint azóta többen igazolták. A glukán vízben nem oldódó poliszaharid, melynek jellegzetes közbeeső lebontási terméke egy cellobiózhoz hasonló diszaharid. Itt a glukózmolekulák 1,3 beta kötésben kapcsolódnak egymáshoz.

Az élesztők szénhidrátjainak fenti felsorolás szerinti értelmezése lényegében Neuberger [15] óta használatos, tehát mintegy 10 éves. Így érthető, hogy szétválasztásuk csak a legutóbbi időkben történt meg.

Hangsúlyoznunk kell azt is, hogy az »élesztők« szénhidrátjainak a fenti felsorolása csak a *Saccharomyces* és a *Torulopsis* nemzetségekbe tartozó fajokra érvényes, a többi nemzetségnél egyesek hiányoznak vagy más szénhidrátok jelenhetnek meg.



A glukán jellemző szerkezeti részlete

Kísérleti anyag és módszerek

A vizsgált élesztők

Vizsgálataink során a következő élesztőket használtuk: 1. Budafoki Szesz- és Élesztőgyár sütőipari élesztőjét, 2. az Erjedésipari Vállalat sütőipari élesztőjét és ennek az ún. IV-es anya-élesztőjét, 3. a *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* borélesztő Balatonfüred 2 törzsét, melyet fiziológiailag és genetikailag is meglehetősen ismerünk. A sütőipari élesztőket gyártásból való kikerülésük után vizsgáltuk, a Balatonfüred 2 borélesztőt rázógépen magunk szaporítottuk el, inkább anaerob, mint aerob körülmények között, 20% cukrot tartalmazó mustban. Mihelyt a közegből a cukor elfogyott, az élesztőt centrifugáltuk, steril desztillált vízzel többször alaposan átmostuk. Természetesen átmostuk a sütőipari élesztőket is.

A borélesztőket a vizsgálatok folyamán vegetatív sejt állapotukban ugyanúgy vizsgáltuk, mint a sütőipari élesztőket. A vegetatív sejteket azonban tömeges spóráztatásba vontuk be [17] és a spóráztatott tömeget analizáltuk.

Spóráztatás

A tömeges spóráztatás menete az előbbi hivatkozás alatt megtalálható — itt csak a legszükségesebb mozzanatokot és az azóta történt módosításokat ismer-tjük.

Ha egy élesztőtömeget tömeges spórázásra akarunk bírni, annak első feltétele, hogy tápközegétől mennél alaposabban kimossuk. Ezt steril desztillált vízzel, újabban steril foszfát, vagy biftalát pufferral végezzük. Általában háromszori mosást és ugyanannyi centrifugálást alkalmazunk.

Előkészítünk 8—10 db 2l-es főzőlombikot a spóráztatáshoz. Négybevezetéses gumidugóval és a levegő be- és kivezetéséhez, a beoltáshoz és mintakivételhez szükséges üveg- és vatta-armaturával látjuk el őket és a szokásos nátriumacetát-glukóz (0,14% acetát, 0,04% glukóz) spóráztató folyadékot öntjük bele. Az edényeket külön-külön megtöltve és sterilizve sorba kapcsoljuk és szívás, vagy nyomás segítségével erős levegőáramot hajtunk át rajtuk.

A levegőáramot leállítva olyan szuszpenzióval oltjuk be a lombikot, hogy a bennlevő egy liter közeg 1 ml-ében kb. 20 millió sejt legyen szuszpendálva.

A levegőáram erőteljes volta azért fontos, hogy a fejlődött CO₂-t kiűzze, keverjen, és hogy a sejtek nemcsak a vízben elnyelt levegővel, hanem a levegőbuborékokkal közvetlenül is érintkezhessenek.

Spórázás általában 24 óra múlva jelentkezik a jól és közepesen spórázó törzseknél 48 óra múlva a maximumot eléri.

A spórázási százalék megállapítása után az élesztőspóra (aszkus) tömeget összemossuk, alaposan kimosva frakcionálás alá vonhatjuk.

Törzsoldat készítése

A centrifugált és jól elkevert élesztőből 5 gr-ot 100-as mérőlombikban KH_2PO_4 oldatban szuszpendáljuk és jelig feltöltjük (33,5 gr $\text{KH}_2\text{PO}_4/500$ ml deszt. víz.).

Száranyag meghatározásra a törzsoldatból 10 ml-t, az élesztőből 0,5 gr-ot mérünk be és infralámpával beszáritjuk.

Összes szénhidrát meghatározása

A törzsoldatból 10 ml-t 500 ml-re hígítunk, hogy a szuszpenzió 1 ml-ben 1 mg élesztő legyen. Ebből 1 ml-t bórszilikát kémcsőbe pipettázunk antronozás céljából és jégszekrénybe helyezük.

A szénhidrátok frakcionálása

a) *Sejtenkívüli cukor elkülönítése.* A törzsoldatból 10 ml-t 15 ml-es kónikus centrifugacsőbe pipettázunk és 15 percig WIFUG szögcentrifugán ülepítjük. Kétszer 5–5 ml foszfátoldattal átmoszuk és centrifugáljuk, 25 ml-es mérőhengerbe összegyűjtve dekantáljuk és foszfátoldattal 25 ml-ig feltöltjük.

b) *A trehalóz elkülönítése.* A centrifugacsőben visszamaradt még élő élesztőanyagra 3 ml 10%-os triklórecetsavat pipettázunk, üvegbot segítségével gondosan szuszpendáljuk. 1–2 perc után 50 ml-es üveg dugós mérőhengerbe öntjük, és vízzel többször kimoszuk a csövek tartalmát. Feltöltjük, hogy a végső térfogat 50 ml legyen. Ezt a híg triklórecetsavas oldatot állni hagyjuk, közben többször megrázzuk és 15 perc elteltével 10–10 ml szuszpenziót pipettázunk ki belőle, a centrifugacsövekbe. Ezeket 10 percig centrifugáljuk és mérőhengerbe dekantáljuk. Mennyiségét feljegyezzük, mert a következő kétszeri kimosásra és centrifugálásra csak annyi mosóvizet használhatunk, hogy az eredeti térfogatot kétszeresére töltsük fel.

A triklórecetsav hexozofoszfátokat és aminosavakat pl. triptofánt is kiold a sejtekből, de ezek mennyisége olyan kicsi, hogy elhanyagolható. Vizsgálataink során ez a frakció mutatott legnagyobb ingadozást.

c) *A lúgban oldódó glikogén és mannán elkülönítése.* A trehalóz elkülönítése után a centrifugacsőben kapott maradékra 1 ml 30%-os KOH oldatot öntünk és a csöveket fémkosárba téve forrásban levő vízfürdőn fél óráig főzzük. Lehűtjük, 15 percig centrifugáljuk és 20 ml-es mérőhengerbe dekantáljuk.

A maradékot 2 ml vízzel kétszer átmoszuk, centrifugáljuk és a kapott mosóvizet az előbbi mérőhengerbe öntjük. Feltöltjük 20 ml-re és alaposan fölkeverjük. Ebből az oldatból fogjuk később leválasztani a mannánt.

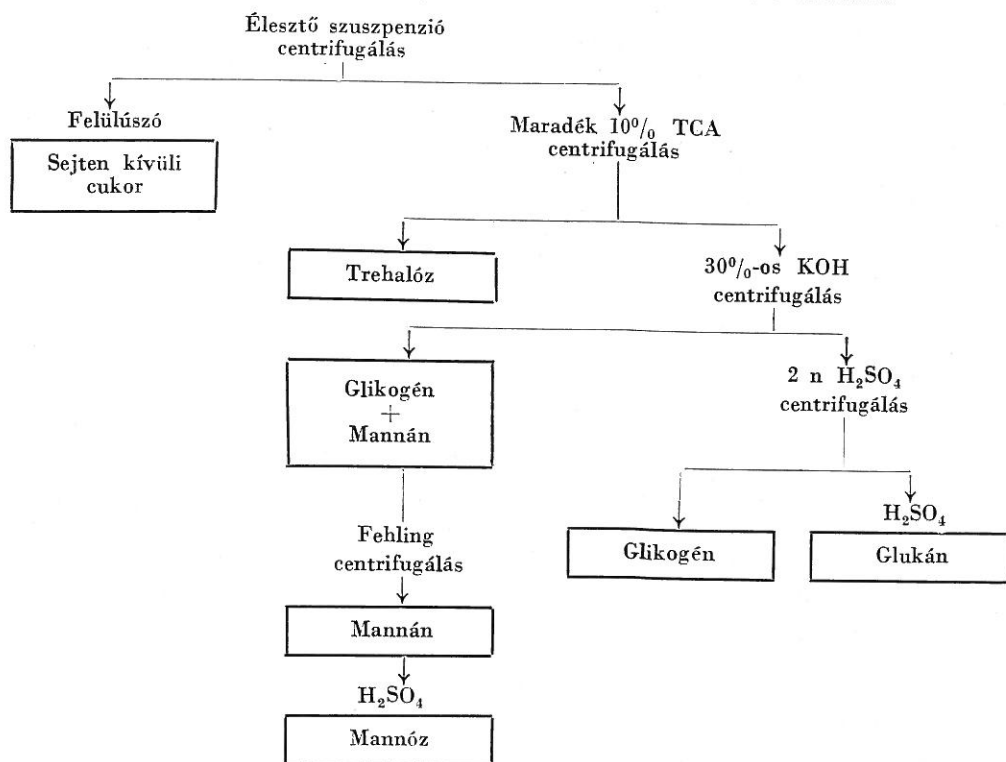
d) *A savban oldódó glikogén elkülönítése.* A centrifugacsőben levő maradék főttömege a glikogén nehezebben oldódó, a sejtfallal kapcsolatos része. Elkülönítése céljából 2 ml 2 n H_2SO_4 -ben szétrázzuk a maradékot és 15 percig 100 °C-os vízben főzzük. Hűtjük, 10 percig centrifugáljuk és 15 ml-es mérőhengerbe dekantáljuk. A maradékot vízzel ismételtelen átmoszuk és a mosóvizekkel 15 ml-re feltöltjük. Ez a frakció ülepedik a legnehezebben és dekantáláskor erre kell legjobban ügyelni.

e) *A glukán feloldása.* A centrifugacsőben maradó anyag a glukán, a sejtfal legellenállóbb poliszaharidja. A glukánból igen finom szuszpenziót kell készítenünk, hogy jól pipettázhassuk. 2 rész tömény H_2SO_4 és 1 rész víz elegyét adjuk hozzá cseppenként jégfürdőben, vagy hideg vízben, hűtve, keverés közben. Mihelyt a glukán feloldódott, hideg vízzel felöntjük. A kapott tejszerű szuszpenziót mérőhengerbe átmossuk és 15 ml-re feltöltjük. Ha barnulás (elszenesedés) mutatkozik, az anyag nem használható. Hogy ezt elkerüljük, figyelni kell az oldódást, és a kén-savat óvatosan kell hozzájuttatni.

f) *A mannán leválasztása.* 20 ml-nyi káliumos glikogén + mannán frakcióból 5 ml-t centrifugacsőbe pipettázunk és 2 ml 1 : 1 arányban elegyített Fehling oldattal keverjük. Forró vízfürdőn tartjuk rázogatózás közben mindaddig, míg a mannán-réz komplex pelyhes csapadék alakjában ki nem válik. Ekkor lehűtjük és 10 percig állni hagyjuk. Ennek letelte után centrifugáljuk. A felülúszót eldobjuk és az üledéket 0,1 n NaOH-val kétszer mossuk és centrifugáljuk.

A maradékot (mannán) 1–2 csepp 10 n H_2SO_4 -ban feloldjuk, és 10 ml-es mérőhengerbe átmossuk. A mannozá hidrolizált cukrot a többi frakcióhoz hasonlóan glukózra vonatkoztatva határozzuk meg. A lúgban oldódó glikogén mennyiségét a c) és f) frakció különbsége adja.

A fent közölt frakcionálási eljárást a következő vázlat szemlélteti :



Megjegyzések a frakcionálással kapcsolatban

A frakcionálásokat külön e célra kalibrált edénnyel és a metodikai előírások szigorú betartásával vittük véghez a sütőipari és borélesztőknél egyaránt.

Jelentősebb változtatásokra lett szükség akkor, amikor a spórás anyag szénhidrátjainak frakcionálását végeztük. Ismételt vizsgálat-sorozataink azt mutatják, hogy a spórás anyagnál tartósabban kell alkalmazni a triklórecetsavas kioldást és az utolsó lépésben a glukán szuszpendálásakor Trevelyan és Harrison módszerével ellentétben éppen akkor érjük el a legjobb eredményt, ha a spórafal anyagot forró kénsav és víz keverékében oldjuk és forró savas vízzel töltjük fel. Kevés gyakorlat után sikerült teljesen szenesedésmentes, jól szuszpendált glukánfrakciót kapnunk.

A közölt frakcionálással szemben a régebbi eljárásokban elhanyagolták a trehalózt és csak a forró kálilugos kezelést alkalmazták. Még olyan jó módszerben is mint a Good, Kramer, Somogyi [3] a kálilug által kioldott anyagot tekintették glikogénnek.

A szénhidrát frakciók mennyiségének meghatározása

A szénhidrátok meghatározására az antron reagenst használtuk sok előnye miatt. Az antronozás menetét és előnyeit egyikünk egy korábbi dolgozatban [14] részletesen ismertette, ezért ezzel itt nem foglalkozunk. Annyit jegyzünk csak meg, hogy 90%-os kénsavoldattal készített 0,2%-os antronoldatot készítettünk. A frakcióból 1—1 ml-t véve hozzáadtunk 1,5 ml deszt. vizet és 5 ml antron reagenst. 10 percig 100 fokos vízfürdőben tartva a kifejlődött színt Pulfrich-fotométer S 61 szűrőjén mértük. Minden vizsgálathoz külön glukóz standardot készítettünk. Eleinte trehalóz és mannóz standardot is használtunk, de amikor tökéletes egyezést láttunk minden esetben, ezeket elhagytuk.

A vizsgálatok eredményei sütőipari élesztőkön

A sütőipari élesztőkön végzett, mintegy 20 mérés átlagértékeit az 1. táblázatban tüntetjük fel.

Az összehasonlíthatóság megkönnyítése kedvéért az első két oszlopban közöljük Trevelyan és Harrison által az angol sütőipari élesztőn mért eredményeket. Az első oszlopban a közönséges foszfátpufferben tartott angol sütőipari élesztő szénhidrátspektruma szerepel; a második oszlop ugyanennek az élesztőnek a képét adja, előzőleg azonban 30 fokon 2 óráig rázatták olyan szuszpenzióban, ahol az élesztő 10 milligrammjára 2 mg glukózt adagoltak. E két táblázatból többek között látható az, hogy egy táplált élesztőnél kisebb mértékben nő a mannán és trehalóz mennyisége, de több, mint kétszeresére szaporodik a sejtkben raktározott glikogén.

Ha az első oszlopot összehasonlítjuk a 3., 4. és 5.-el akkor azonnal szembe-tűnik a magyar sütőipari élesztők szénhidrátszegénysége. Különösen feltűnő az Erjedésiipari Vállalat anyagánál, hol is a szárazanyagnak, csak 21,6%-a a szénhidrát, az angol élesztő 32,4%-ával szemben. Általában $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ résszel kevesebb a magyar élesztők szénhidrát tartalma. Az egyes frakciók is kevesebbek, különösen a trehalózé. Nem egy frakció (a glikogén) kis mennyisége oka tehát a kevesebb össz-szénhidrát tartalomnak.

Sajnos az angol szerzők nem közölnek adatokat az általuk vizsgált élesztő fehérje és zsírszerű anyagairól és így a két ország gyártmányainak összehasonlítása csupán szénhidrátok alapján nem reális. — Ismerjük azonban Henneberg [7] által megállapított és azóta többek által megerősített (Schönfeld [18], Betsle [1]) összefüggést az élesztők glikogén — illetőleg szénhidrát — tartalma

és fehérjetartalma között. Eszerint, ha a tenyésztés irányításával fokozzuk a szénhidrát-tartalmat: csökken a fehérjemennyiség, s fordítva is áll ez a tétel.

Valószínű ezek szerint, hogy a magyar sütőipari élesztő, ha szénhidrátban szegényebb is, mint az angol, fehérjében gazdagabb. Az eltérés okát nem ismerjük. Közrejátszhat itt a technológiában levő eltérés, vagy az, hogy ott cukornádmelazon, nálunk pedig répamelazon szaporítják az élesztőt. Mindenesetre érdekes lenne a fehérjedúsabb és a szénhidrátban gazdagabb élesztők közt az eltarthatóságban mutatkozó esetleges különbséget megvizsgálni.

1. táblázat

Az angol és a magyar sütőipari élesztők szénhidrátjainak összehasonlítása. 10 mg nedves élesztőben talált szénhidrát (γ) és a szárazanyagra (2,5–2,8 mg-ra) számított szénhidrát %

Szénhidrátok	(1)		(2)		(3)		(4)		(5)	
	Trevelyan & Harrison angol péklesztő				Budafoki péklesztő		Erjedésiipari Vállalat			
	élesztetett		táplált				IV. sz. anyaelesztője		péklesztője	
	Talált szénhidrát γ	2,5 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,5 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,5 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,8 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,8 mg szárazanyagra számított %
Sejtenkívüli cukor	8	0,0	50	2,0	5	0,0	3	0,0	10	0,3
Trehalóz	230	9,2	246	9,8	180	7,0	150	5,3	180	6,0
Mannán	190	7,6	224	8,9	148	5,8	168	6,0	160	5,6
Glikogén	175	7,0	385	15,5	190	7,4	180	6,3	140	4,6
Glukán	160	6,4	174	6,9	130	5,1	190	6,7	110	3,6
Frakciók összege	763	30,2	1079	43,1	653	25,3	691	24,3	600	20,1
Mért összes szénhidrát	810	32,4	1178	47,1	710	28,4	710	25,0	650	21,6
Együttesen, ill. külön mért szénhidrátok különbsége (hiány) .	47	2,2	99	4,0	57	3,1	19	0,7	50	1,5

Tapasztalataink és az eredmények azt mutatják, hogy az antron reakcióval kevés anyagon igen pontos eredmények érhetők el, alkalmazása pedig finom és érzékeny. Kevés módosítással — megítélésünk szerint — e módszer alkalmasnak mutatkozik más mikroszervezetek szénhidrátjainak frakcionálására és mérésére is. Természetesen előzőleg az illető szervezet szénhidrátjainak minőségi feltárása szükséges.

A vizsgálatok eredményei borélesztőn

Amikor az élesztősejt — természetes élete során, vagy különleges kísérleti feltételek között külső és belső okok miatt — vegetatív életmódját beszünteti, plazmájában mélyreható változások játszódnak le.

A plazma, amint azt a legtöbb megfigyelő egybehangzóan leírja, elveszti vakuolumos, nagyszemcsés, erősen fénytörő, jellegzetes szerkezetét és szürkés-opákká változik. Tudjuk, hogy ezidő alatt folyik le a sejt belsejében a számcsökkentő magosztódás: a redukció. A diploid vegetatív sejtből, haploid kromoszómaszámú spóra lesz. Kialakulnak a haploid kromoszómaszámot tartalmazó spóra-

magok s az eredeti sejt plazmája kb. annyi részre osztddik, ahány spóramag képződött. Az esetek legnagyobb részében a spóraszám igen ingadozó, külső-belső tényezők határozzák meg és leginkább 1, 2, 3 vagy 4 lehet. A spóramagok köré, mint csomósodási központok köré a spórák plazmái vastag spórafalat képeznek a borélesztők esetében. Nem kétséges, hogy a folyamatok igen sok energiát igényelnek s jelentős anyagelhasználódással járnak.

Ma már tisztázott dolog, hogy akkor spórázik jól az élesztő, ha spórázásához a közegbe minimális szénhidrát tápanyagot adunk. Egy olyan szuszpenzióhoz, mely milliliterenként húsz millió sejtet tartalmaz, általában 0,04% glukózt és 0,14% vízmentes nátriumacetátot szoktak adni. Ha többet adunk, az élesztő plazmagyarapításba fog és sarjadzani kezd, ha nem adunk semmit, nem spórázik. Ezek után felvetődhet az a kérdés, hogy honnan veszi a sejt — a beadott kevés szénhidrátot is tekintetbe véve — azt a sok energiát, ami a spórázáshoz szükséges? A közegbe adott szénhidrátokat — előzetes vizsgálataink alapján — a sejtek pár óra alatt beépítik, vagy ellégnak, viszont a spórázás végbemeneteléhez még a legújabb és leggyorsabb módszerrel is 24 óra szükséges.

Kutatásaink most közölt szakasza, egy része vizsgálatsorozatunknak, annak tisztázására, hogyan használja fel az élesztősejt a spórázás folyamán a környezetből kapott szénhidrátokat és mi történik a sejt belsejében levő anyagokkal.

Kohl [10], Hennenberg [8], Lindner [12], Zikes [27] megfigyelték, hogy spórázás előtt a vegetatív sejtek glikogén tartalma megnövekszik. Miután ezt követőleg azt észlelték, hogy az egész sejt tartalom homogenizálódik s a glikogénfestési, reakciójuk erősen gyöngül, ebből arra következtettek, hogy a glikogénnek fontos szerepe van a spórázáskor.

Amikor a nemzedékváltakozással kapcsolatos kísérleteinkhez hozzáfogtunk, magunk is azzal a munkahipotézissel dolgoztunk, hogy a glikogén mint könnyen mobilizálható szénhidrát valószínűleg az az energiataartalék, amit az élesztő ennél a folyamatnál kiaknáz. E gondolatmenet következtében a spórázás után a glikogén és általában a szénhidrát mennyiség erősebb csökkenését vártuk.

Dolgozatunk első részében ismertett módszerrel meghatároztuk az elszaporított »Balatonfüred 2« borélesztő szénhidrátösszetételét. Az anyagot azután spóráztattuk és a spóratömeget ismét analizáltuk. A spóráztatás 70, egyes esetekben 90%-ban sikerült és az eltérő jellegű anyag kezelésénél a felmerült nehézségeket is sikerült leküzdenünk.

A mintegy 20 mérésből a 2. táblázaton két jellegzetes példát közlünk. Az első két rovatban rázatással elszaporított vegetatív sejtek szénhidrátösszetétele látható, a harmadik és negyedik rovatban ugyanezen élesztők spóráztatott tömegének 100%-os spórázásra korrigált adatai szerepelnek.

A két táblázat adatait összevetve az feltűnő, hogy a rázatással szaporított borélesztők mennyivel gazdagabbak szénhidrátokban, mint a sütőipari rokonaik.

Még feltűnőbb az 1, 2 illetve a 3, 4 rovatok összehasonlításából az, hogy a spórás anyag szénhidrátjainak mennyisége jelentősen megnövekedett. Az összes mérések átlagértékét szárazanyagszázalékra számítva a 3. táblázat mutatja.

Tulajdonképpen munkahipotézisünk értelmében egyedül a spórafalat alkotó glukán mennyiségének megnövekedése volt a várható, emellett azonban erősen nőtt a trehalóz, a mannán mennyisége is, míg a glikogéntartalom változatlan maradt.

A második táblázat ötödik oszlopa a kizárólag erjesztéssel szaporított »Balatonfüred 2« borélesztő szénhidrátösszetételét mutatja. Ha e rázatás nélküli — *kizárólag anaerob eljárással szaporított* — borélesztőt hasonlítjuk össze a levegőztetett sütőipari élesztő szénhidrátjaival (v. ö. az 1. táblázat 3, 4, 5 rovatát a 2. táblázat 5 rovatával) láthatjuk, hogy az erjesztéses úton előállított élesztőtömeg szénhid-

ráttartalma a szárazanyag 45%-át teszi, szemben a sütőipari élesztő 25–30%-os arányával. Ezt a különbséget a tenyésztésmódokkal még széjjelebb is húzhattuk volna, de nem ez volt a cél. Az erjesztéssel előállított tömegben a fő különbség a glikogénben mutatkozott, ami két-háromszorosa a pékélesztőnél talált %-arányának.

2. táblázat

A »Balatonfüred 2« jelzésű borélesztő szénhidrát összetétele spóráztatott és vegetatív alakban 10 mg élesztőre, illetve 2,3–2,8 mg szárazanyagra számítva

Szénhidrátok	(1) Bf ₂ rázatással szaporítva		(2) Bf ₂ rázatással szaporítva		(3) Bf ₂ spóráztatott		(4) Bf ₂ spóráztatott		(5) Bf ₂ erjesztéssel szaporítva	
	Talált szénhidrát γ	2,6 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,4 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,8 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,3 mg szárazanyagra számított %	Talált szénhidrát γ	2,6 mg szárazanyagra számított %
Sejtenkívüli cukor ...	5	0,0	0	0,0	0	0,0	5	0,0	0	0,0
Trehalóz	200	7,7	164	6,8	310	10,7	130	5,0	220	8,7
Mannán	244	9,4	184	7,6	272	9,9	200	9,6	180	7,0
Glikogén	420	16,2	340	14,2	412	14,2	380	17,5	509	19,8
Glukán	180	6,9	207	8,5	306	10,6	275	14,2	146	5,7
Frakciók összege.....	1049	40,2	895	37,1	1300	45,4	990	46,3	1055	41,2
Mért összes szénhidrát Együttesen, ill. külön mért szénhidrátok különbsége (hiány)	1125	43,3	950	39,5	1500	51,8	1025	48,0	1150	45,0
	76	3,1	55	2,4	200	6,4	35	1,7	95	3,8

3. táblázat

A vegetatív és spóráztatott élesztők szénhidrát frakciói % átlagának összehasonlítása 2,5 mg szárazanyagtartalomra számítva

Szénhidrátok	Százalék-átlagának összehasonlítása	
	Vegetatív tömeg	Spórázott tömeg
Sejtenkívüli cukor	0,0	0,0
Trehalóz	7,3	8,4
Mannán	7,5	9,6
Glikogén	15,0	15,0
Glukán	7,8	12,6
Frakciók összege.....	37,6	45,6
Mért összes szénhidrát	40	50
Hiány	2,4	4,4

Amikor ezt a vegetatív sejttömeget spóráztattuk kiderült, hogy csak 15–20%-ban spórázik. A magas glikogéntartalom tehát nemcsak a vegetatív sejt fiziológiai viselkedésében idéz elő »alvást«, működéscsökkenést (L i n d e g r e n, [11]), hanem valószínűleg a spórázást is lecsökkenti.

Miután Kohl, Henneberg, Lindner és Zikes a glikogén kimutatására nem annak mérését, hanem jódjódkáliumos festésén alapuló becslését alkalmazták, érthető, hogy tévedésbe eshettek. A plazma és a benne lévő cseppek homogenizálódása egész természetesen a glikogénfestés erejének csökkenését vonta maga után. Csak természetes, hogy ebből a glikogénmennyiség fogyására következtettek.

A kísérleteinkből és méréseinkből egyébként a glikogén szerepének fontossága valóban kiderült, de nem úgy, ahogy régebben gondolták, hanem olyan értelemben, hogy ha nagyobb mennyiségben van jelen, akkor valószínűleg gátol. Hogy mennyi az optimális mennyisége, továbbá, hogy a normálisnál kisebb mennyiség hátráltat-e, ezekre nézve nincs elegendő kísérleti adatunk.

Megemlítjük, hogy a nemzedékváltozással kapcsolatban nemcsak a szénhidrátok sorsát figyeljük a diploid és haploid generációban, hanem a fehérjék és zsírnemű és zsírszerű anyagokét is. Elegendő vizsgálati tényünk egyelőre e téren még nincs.

Összefoglalás

Magyar sütőipari élesztők és egy borélesztő szénhidrátösszetételét és szénhidrátjainak változásait vizsgáltuk. A szénhidrátokat Trevelyan és Harrison [23, 24] módszerével szétválasztottuk és a frakciókat antron reagens segítségével glukózra vonatkoztatva megmértük. A frakcionálás során a vegetatív sejteknél is, a spórás anyagnál is trehalóz, mannán, glikogén és glukán frakciókat kaptunk s ezeket a Márkusné [14] által már leírt módon antronoztuk.

A vizsgálatok során a magyar sütőipari élesztők szénhidrát tartalmát viszonylag alacsonynak találtuk. Nemcsak a glikogén, hanem a trehalóz, mannán és a glukán mennyisége is alacsony.

A megvizsgált »Balatonfüred 2« nagyrészben anaerob módon szaporított borélesztő vegetatív sejtömegének is megmértük szénhidrát tartalmát. Ezután a tömeget átspóráztattuk és a spóratömeget is analizáltuk.

A vegetatív sejtömeg és a spóratömeg szénhidrát tartalmának összehasonlításából az derült ki, hogy a spóratömeg szénhidrát tartalma magasabb, mint a vegetatív sejté. Megnövekszik kisebb mértékben a trehalóz, nagyobb mértékben a mannán és glukán mennyisége s változatlan marad a glikogéné.

A glikogénben dúsított (kb 20% glikogéntartalmú) vegetatív sejtömeg spórázási aránya feltűnő mértékben lecsökken.

A mérési eredményekből és a kísérletekből az következtethető, hogy a glikogénnek nincs olyan fontos szerepe a spórázáskor, amelyet régebben tulajdonítottak s ha nagyobb mennyiségben van jelen — valószínűleg gátló hatású.

Az alkalmazott frakcionálási és antronozási módszer igen érzékeny, gyors és kevés változtatással más mikroszervezetek vizsgálatára is kiterjeszhető.

Érkezett : 1955. május 12.

Irodalom

- [1] Baetsle, M.: Ann. de la Brass. et de la Dest. 26. 1928.
- [2] Errera, L.: L'epiplasma des ascomycetes. Bruxelles. 1882.
- [3] Good, C. A., Kramer, H. & Somogyi J. C.: J. Biol. Chem. 100. 485. 1933.
- [4] Haehn, H.: Biochemie der Gärungen. Walter de Gruyter & Co. Berlin, 1952.
- [5] Hassid, W. Z., Joslyn, M. A. & McCready, R. M.: J. Amer. Chem. Soc. 63. 295. 1941.
- [6] Haworth, W. N., Heath, R. L. & Peat, S.: J. Chem. Soc. (London) 833. 1941.

- [7] Henneberg, W.: Z. f. Spiritusindustrie. 378. 1902.
 [8] Henneberg, W.: Gärungbakteriologisches Praktikum. P. Parey. Berlin. 1909.
 [9] Koch, R.: Chem. Zbl. 2. 1495. 1925.
 [10] Kohl, F. G.: Die Hefepilze etc. Quelle und Meyer. Leipzig. 1908.
 [11] Lindegren, C. C.: The Yeast Cell etc. Educ. Publish. S. Louis. 1949.
 [12] Lindner, P.: Mikroskopische Betriebskontrolle etc. P. Parey. Berlin. 1909.
 [13] Ling, A. R., Nanji, D. R. & Paton, F. J.: J. Inst. Brew. 31. 316. 1925.
 [14] Márkus, L.: Agrokémia és Talajtan. 3. 227. 1954.
 [15] Neuberg, G.: Ann. Rev. Biochem. 15. 435. 1946.
 [16] Nickerson, W. J.: Experientia 5. 202. 1949.
 [17] Pazonyi, B.: Acta Microbiol. 1. 49. 1954.
 [18] Schönfeld, F.: Wo. f. Brauerei, 29. 393. 1912.
 [19] Somogyi, J. C.: Z. Vitaminforsch. 4. 8. 1944.
 [20] Stockhausen, F. & Silbereisen, H.: Wo. f. Brauerei, 349. 1933.
 [21] Stockhausen, F. & Silbereisen, H.: Biochem. Z. 287. 276. 1936.
 [22] Tanret, C.: C. R. Acad. Sci. (Paris) 192. 1056. 1931.
 [23] Trevelyan, W. E. & Harrison, J. S.: Biochem. J. 50. 298. 1952.
 [24] Trevelyan, W. E., Forrest, R. S. & Harrison, J. S.: Nature 170. 262. 1952.
 [25] Zechmeister, L. & Tóth, G.: Biochem. Z. 270. 309. 1934.
 [26] Zechmeister, L. & Tóth, G.: Biochem. Z. 284. 137. 1936.
 [27] Zikes, H.: Zbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II. Abt. 353. 1919.

ИЗУЧЕНИЕ РАЗДЕЛЕНИЯ И ПЕРЕГРУППИРОВКИ УГЛЕВОДОВ ДРОЖЖЕЙ В СВЯЗИ С ЧЕРЕДОВАНИЕМ ПОКОЛЕНИЙ

Б. Пазони и Г. Маркуш

Институт Генетики Академии Наук Венгрии и Научно-Исследовательский Институт Агрохимии, Отдел Биохимии, Будапешт (Венгрия)

Резюме

Изучали состав и изменение углеводов Венгерских Хлебопекарных дрожжей и одной винной дрожжи. Углеводы были разделены по методу Trevelyan & Harrison [23, 24], а фракции измерили при помощи реагента антрон в пересчете на глюкозу. В ходе фракционирования и у вегетативных клеток и у спор получили фракции трехалоза, манана, гликогена и глюкана, которые антронировали по описанному Маркуш [14] способу.

В исследованиях нашли сравнительно низкое содержание углеводов в венгерских хлебопекарных дрожжах. Содержание не только гликогена но и трехалоза, манана и глюкана было низким. Определили содержание углеводов вегетативной клеточной массы изучаемого нами и выращенного главным образом анаэробных условиях штамма винной дрожжи «Балатонфюред 2». Потом вынудили вегетативные клетки образовать споры и анализировали массу спор.

При сравнении содержания углеводов в массе вегетативных клеток и спор выяснилось, что споры содержат больше углеводов, чем вегетативные клетки. Содержание трехалоза в меньшей мере, содержание манана и глюкана в большей мере увеличивается, а содержание гликогена остается неизменным.

Выход спор у масс вегетативных клеток обогащенных гликогеном (около 20% гликогена) снижается заметным образом. Из результатов измерения опытов можно делать такой вывод, что гликоген не играет такую важную роль при размножении спор, которая была ему приписана и если присутствует в большем количестве, наверно имеет тормозящее действие.

Применяемый способ фракционирования и антронирования очень чувствительный и быстрый и с небольшим изменением может быть использован для изучения других микроорганизмов.

Табл. 1. Сравнение углеводов английских и венгерских хлебопекарных дрожжей. Найденный углевод в 10 Мг сырой дрожжи (2) и углевод в %, пересчете на сухое вещество (2,5–2,8 мг) (1) Trevelyan и Harrison английские хлебопекарные дрожжи голодающие. (2) Те же, кормленные. (3) Хлебопекарные дрожжи от Будафок. (4) Маточные дрожжи № IV. Предприятия Бродильной Промышленности. (5) Хлебопекарные дрожжи Бродильной Промышленности.

Табл. 2. Состав углеводов винной дрожжи «Балатонфюред 2» в форме вегетативных клеток или спор. В пересчёте на 10 мг сырой дрожжи или 2,3—2,8 мг сухое вещество. В № (1) и (2) разведенные при помощи взбалтывания; (3) и (4) при разведении спор; (5) разведенные при брожении.

Табл. 3. Сравнение среднего % фракций углеводов вегетативных и споро-образовавших дрожжей в пересчёте на 2,5 мг. сухого вещества.

Separation of the Carbohydrates of Yeast and Examination of their Rearrangement in Connection with the Alternation of Generations

B. PAZONYI and Mrs. L. MÁRKUS

Institute for Genetics of the Hungarian Academy of Sciences, and Biochemical Department of the Agrochemical Research Institute, Budapest (Hungary)

Summary

The composition of and changes in the carbohydrates of a wine yeast and of yeast used in the Hungarian baking industry were subjected to examination. After separating the carbohydrates with the method of Trevelyan and Harrison [23, 24], the fractions were assayed with reference to glucose by means of the anthrone reagent. Both in the vegetative and the sporulated substance the fractionation yielded trehalose, mannan, glycogen and glucan which fractions were then treated with anthrone in the manner as described by L. Márkus [14].

The Hungarian bakers' yeasts were found to be relatively poor in carbohydrates, containing but small quantities not only of glycogen but of trehalose, mannan and glucan as well.

The vegetative cell mass of the wine yeast «Balatonfüred 2», mostly propagated anaerobically, was also tested for carbohydrates. The mass was then allowed to undergo sporulation, and the spore mass likewise analysed.

On comparing them, the spore mass was found to be richer in carbohydrates than the vegetative cell mass. It contained somewhat more trehalose, considerably more mannan and glucan, while the glycogen remained unchanged.

On enriching the vegetative cell mass with glycogen (to about 20% glycogen in the dry substance) a marked drop in the rate of sporulations was observed.

The results obtained from the measurements and tests seem to justify the conclusion that glycogen has a lesser role to play in sporulation than was generally believed until recently, and that if present in greater amounts it probably exercises an inhibitory effect.

The method of fractionation and treating with anthrone as adopted in the present experiments was found to be very sensitive, quick and, with a slight modification, suitable for the examination of other microorganisms as well.

Table 1. Comparison of the carbohydrates of yeasts used in the British and Hungarian baking industries, respectively. Carbohydrates found in moist yeast ($\mu\text{g}/10\text{ mg}$) and in (2,5 to 2,8 mg of) dry substance (in percent), respectively. (1) Trevelyan and Harrison's British baking yeast, starved, (2) the same, nourished. (3) Baking yeast from Budafok (near Budapest). (4) Mother yeast No. IV of the Undertaking for Fermentation Products. (5) Baking yeast of the Undertaking for Fermentation Products.

Table 2. Carbohydrate content of sporulated and vegetative «Balatonfüred 2» wine yeast. Carbohydrate found in 10 mg. of moist yeast (in μg), and in (2,3 to 2,8 mg. of) dry substance (in percent), respectively. (1) and (2) multiplied by shaking; (3) and (4) sporulated; (5) multiplied by fermentation.

Table 3. Comparison of average percentage of carbohydrate fractions of vegetative and sporulated yeasts, referred to 2,5 mg of dry substance.