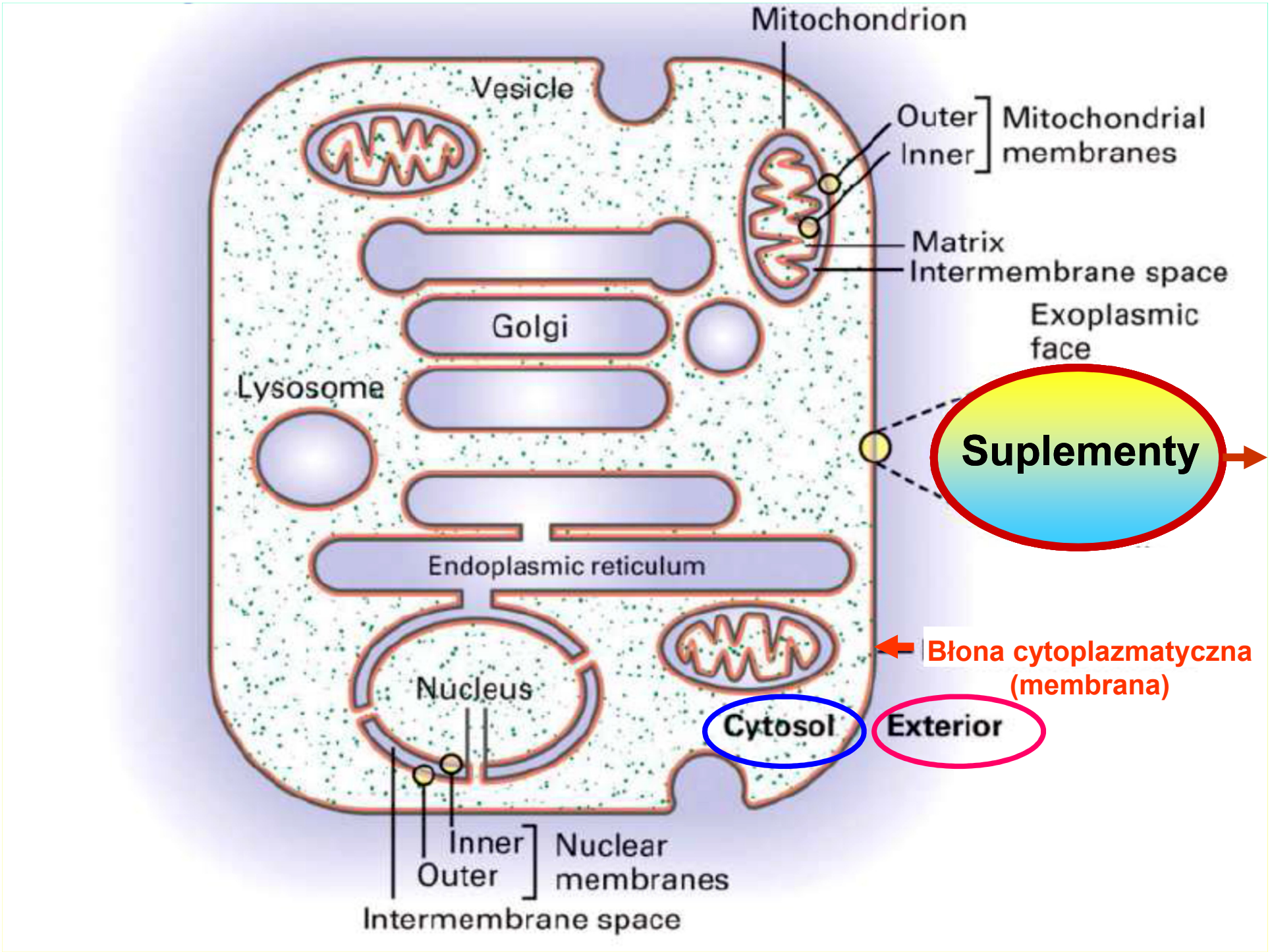
Wybrane aspekty suplementacji brzeczek

- Osmofilność -

Dr. habil. Anna Sałek
International Bio-Consulting, Germany
& Domatec GmbH, Germany

8 – 11 kwiecień 2008, Kraków


Mitochondrion
Vesicle
Outer
Inner
Mitochondrial membranes
Matrix
Intermembrane space
Exoplasmic face
Golgi
Lysosome
Suplementy
Endoplasmic reticulum
Błona cytoplazmatyczna (membrana)
Nucleus
Cytosol
Exterior
Inner
Outer
Nuclear membranes
Intermembrane space

Cecha osmofilności w drożdżach

Cechę osmofilności drożdży *Saccharomyces* sp., pożądaną

podczas suplementacji brzeczek związkami mineralnymi

i ekstraktem słodowym

należy rozpatrywać z punktu widzenia:

- **możliwości wzrostowych drożdży, tj. aktywności procesów anabolicznych różnych szczepów w warunkach o podwyższonej osmotyczności oraz**
- **zdolności fermentacyjnych, tj. aktywności procesów katabolicznych drożdży w brzeczkach HG.**

High Gravity - hypertoniczne warunki poza komórką

	OUT		IN	NET H_2O change
Isotonic	$[H_2O]_X$	⇌	$[H_2O]_X$	none
	$[solute]_Y$		$[solute]_Y$	
Hypotonic	$[H_2O]_{HIGH}$	⇌	$[H_2O]_{LOW}$	in
	$[solute]_{LOW}$		$[solute]_{HIGH}$	

High Gravity – wysoka aktywność osmotyczna

Cecha osmofilności w drożdżach

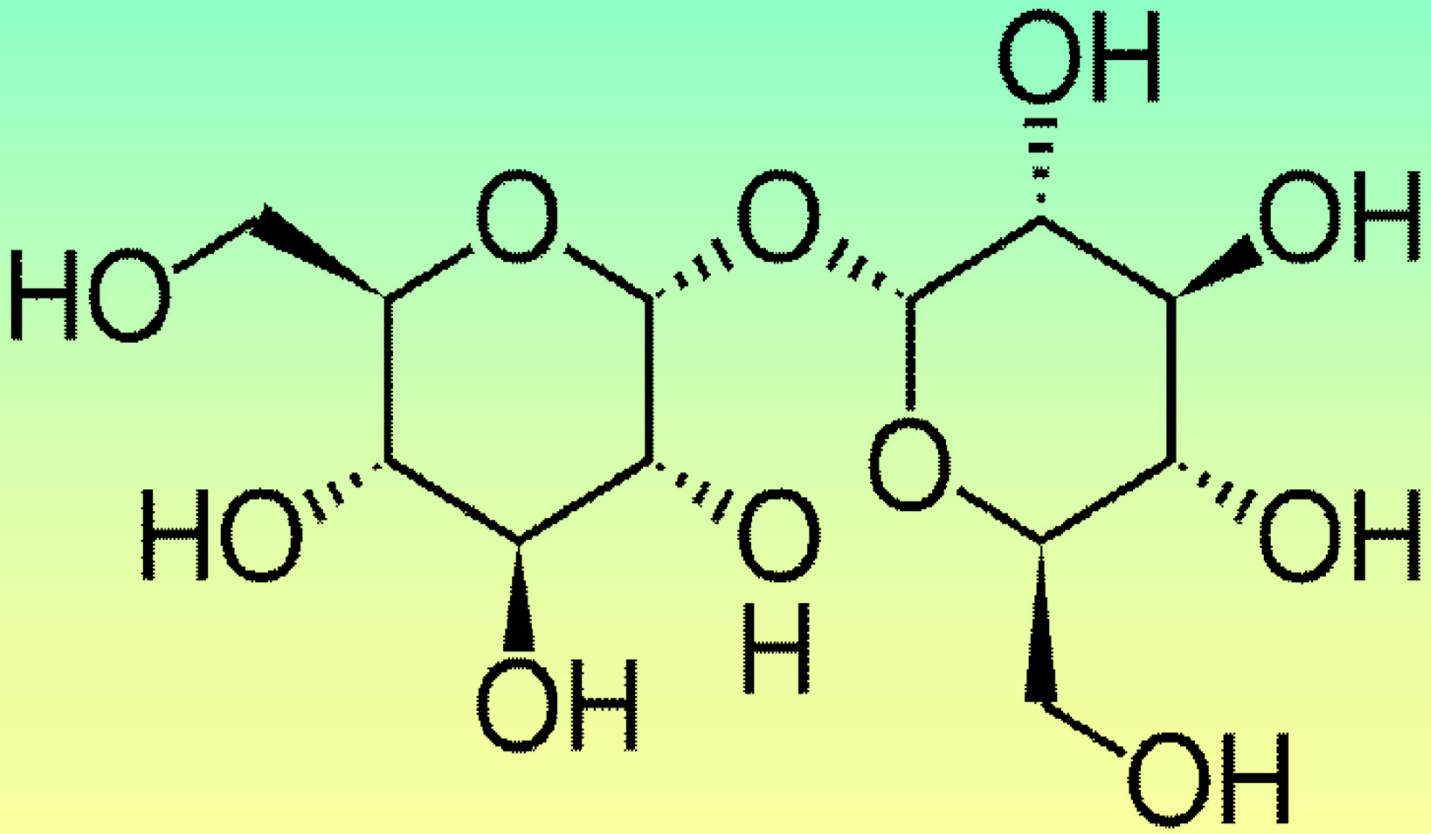
Dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zdolność do wzrostu i fermentacji w brzeczkach o wysokim stężeniu substratu (HG) jest zależna od podwyższonej koncentracji wewnątrzkomórkowych węglowodanów, którymi, z uwagi na aspekt osmofilności, są:

trehaloza & glikogen

Podwyższona zawartość trehalozy i glikogenu w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* chroni komórki przed ich autolizą, a także zwiększa ich zdolności życiowe w warunkach HG.

Induktory osmofilności w drożdżach

Trehaloza, dwucukier nieredukujący

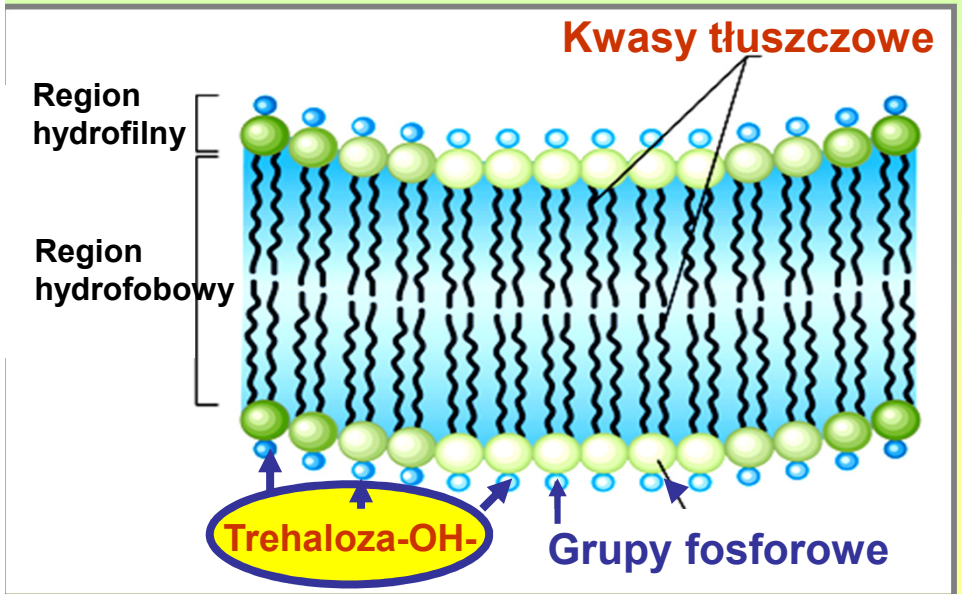


α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside (α,α 1,1- wiązania)

Induktory osmofilności w drożdżach

Trehaloza

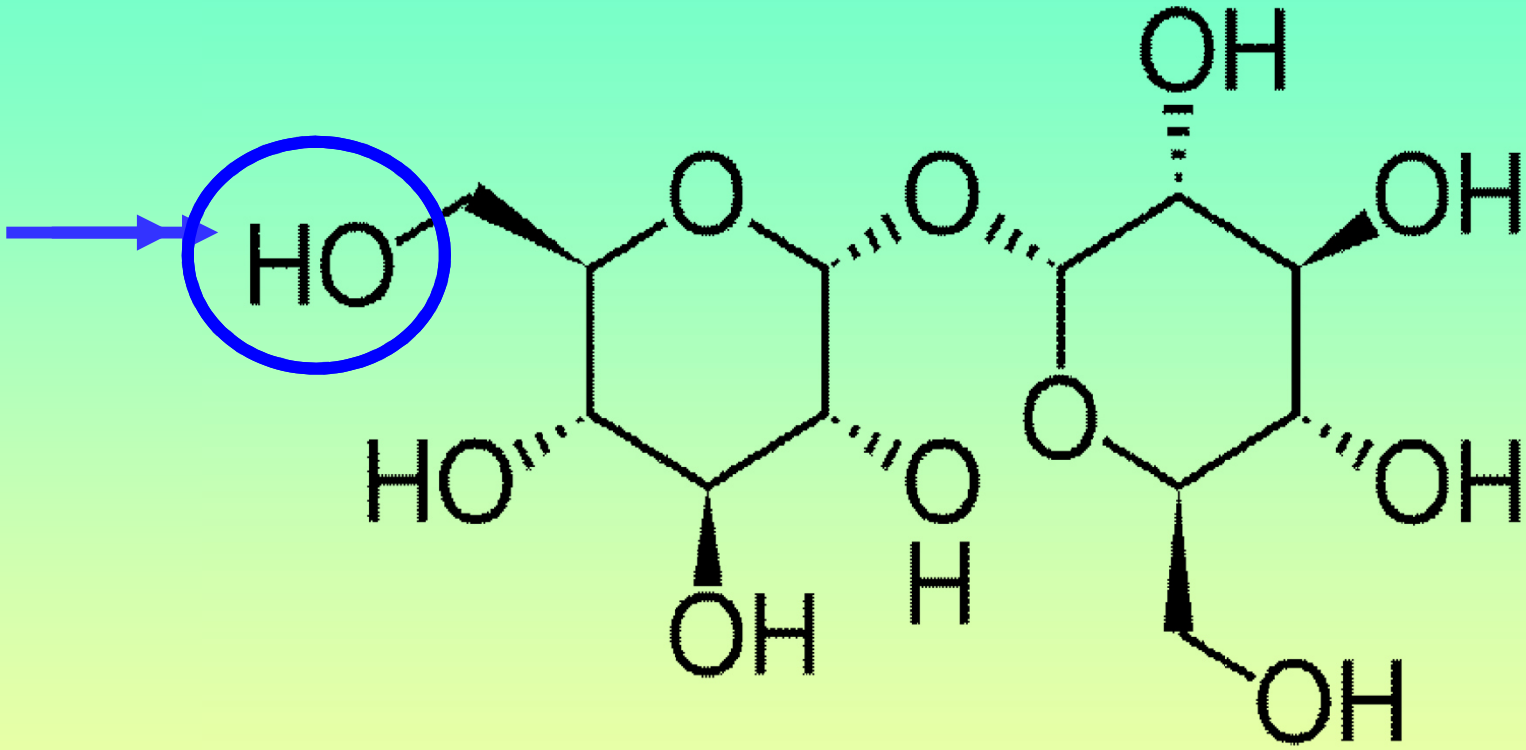
jest kumulowana wewnątrz pęcherzyków, rozmieszczonych w cytozolu komórki drożdżowej i łączy się z unilamelarną warstwą lipidową błony cytoplazmatycznej.



Grupy hydroksylowe (–OH) trehalozy są związane z grupami fosforowymi fosfolipidów, zawartych w dwuwarstwowej strukturze błony komórkowej, utrzymanej w stanie fluidalnym.

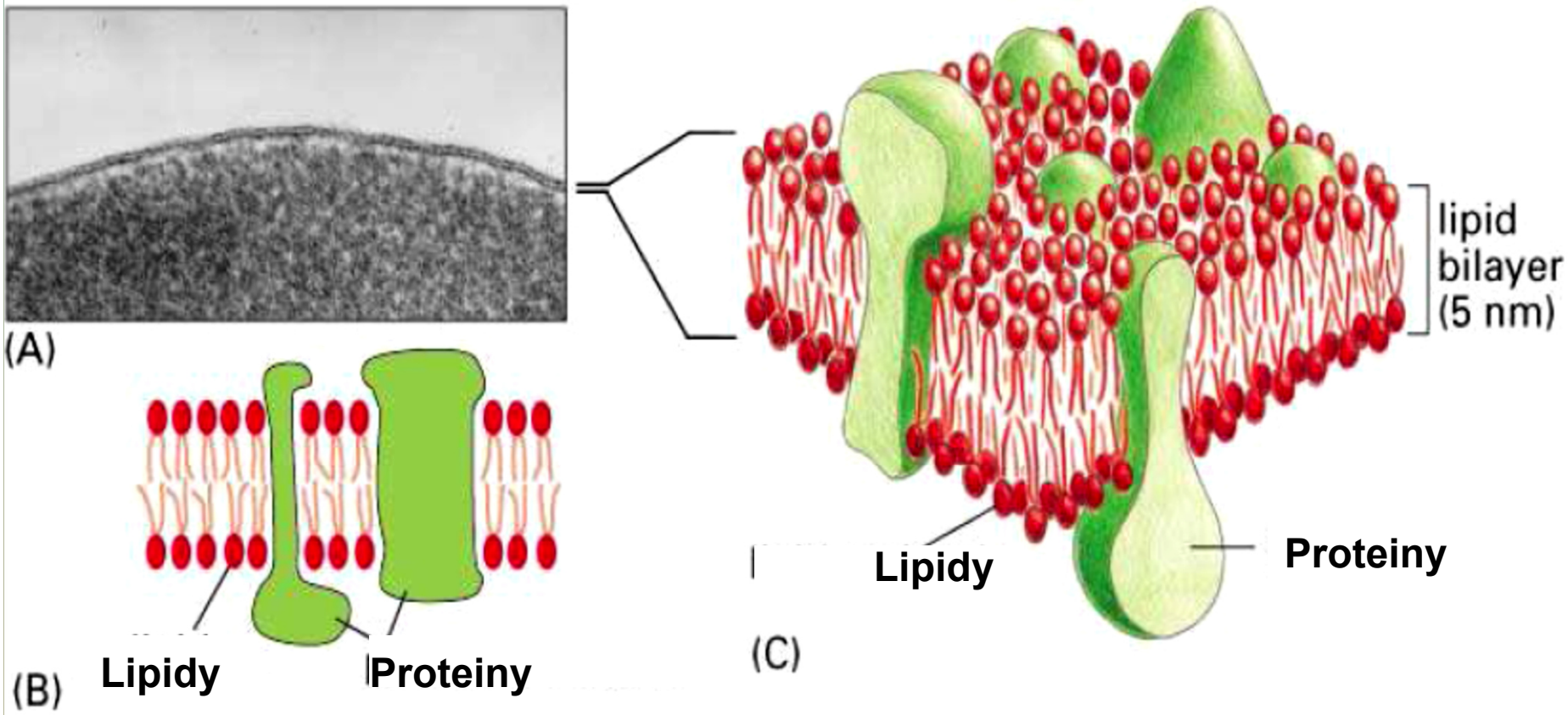
Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Induktory osmofilności w drożdżach



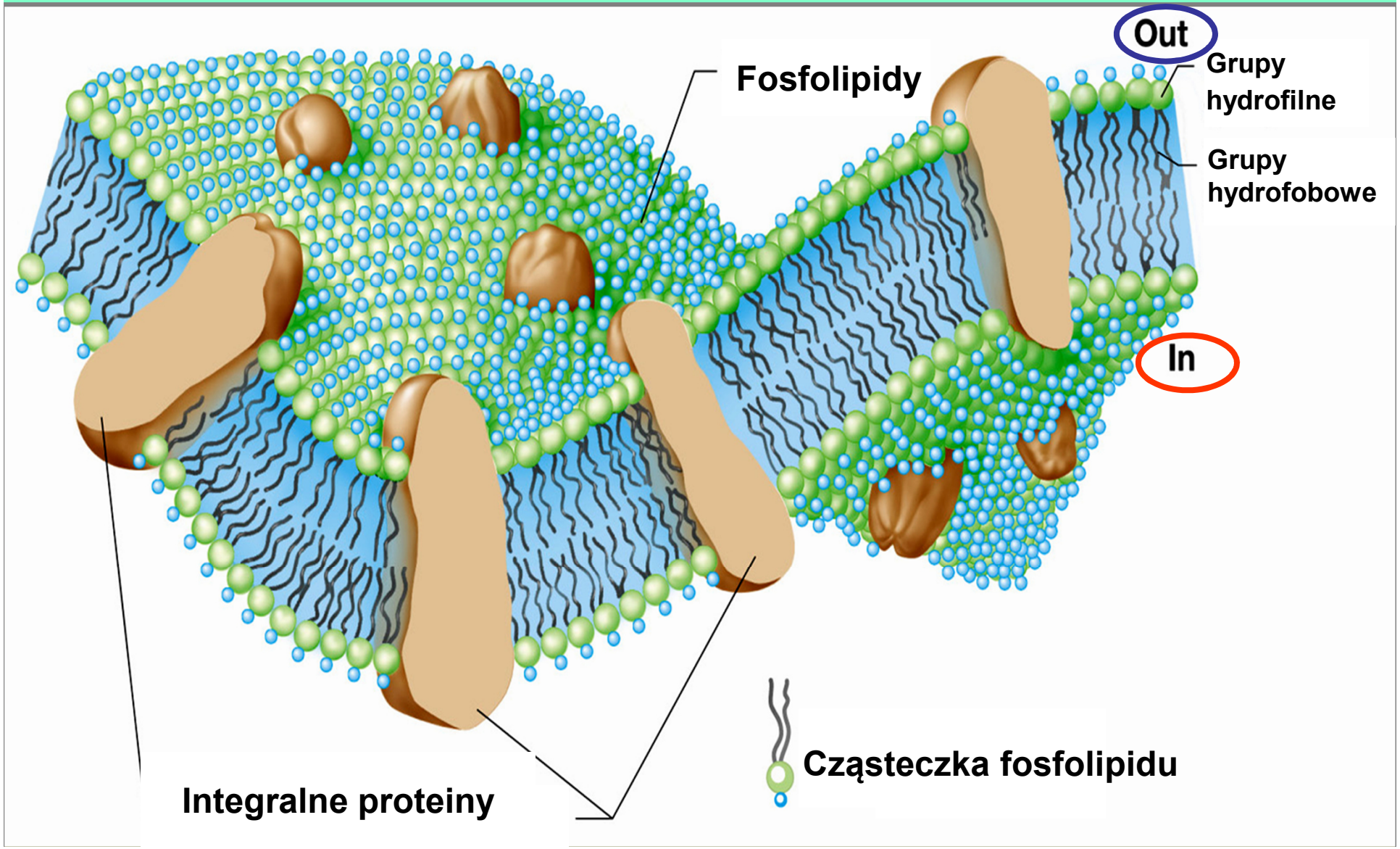
Ponadto, trehaloza w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* jest integralnym składnikiem glikolipidów, będących ważnym czynnikiem strukturalnym ściany komórkowej.

Struktura membrany komórkowej

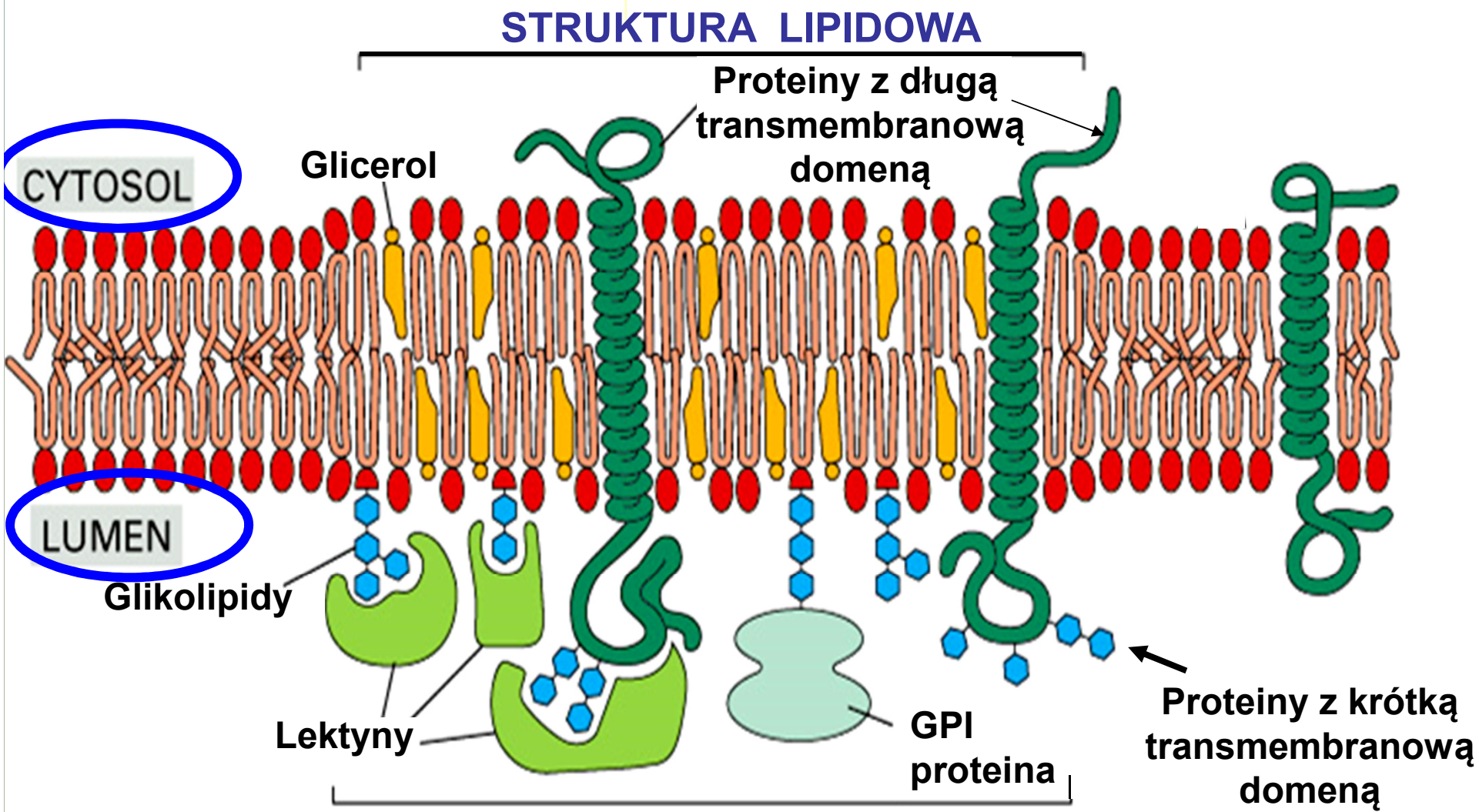


Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Struktura membrany komórkowej

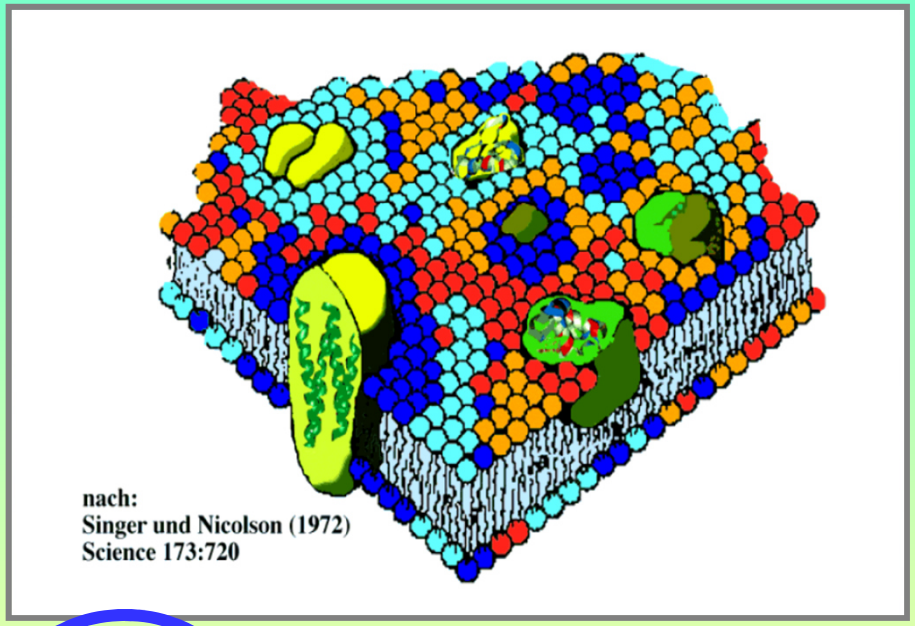


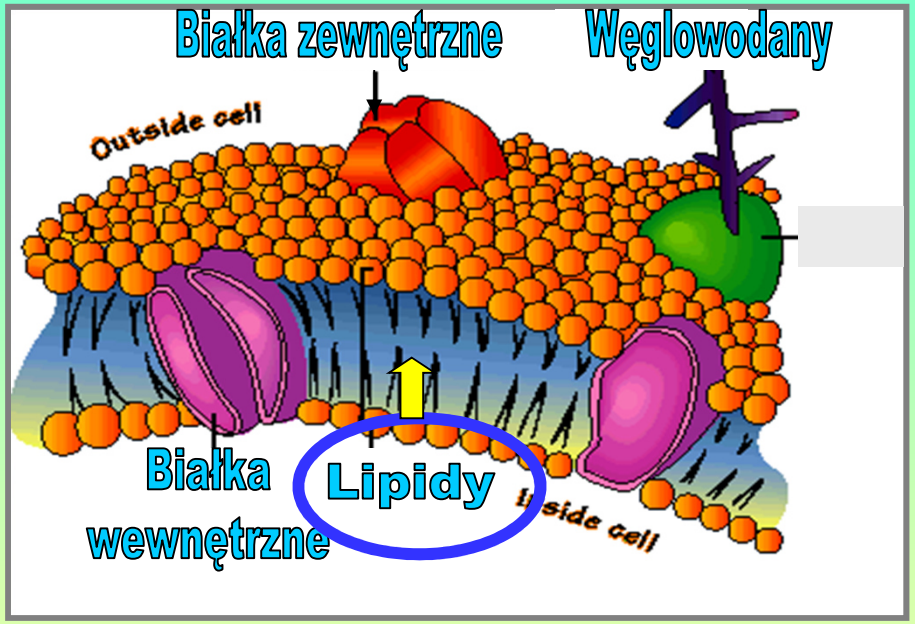
Struktura membrany komórkowej

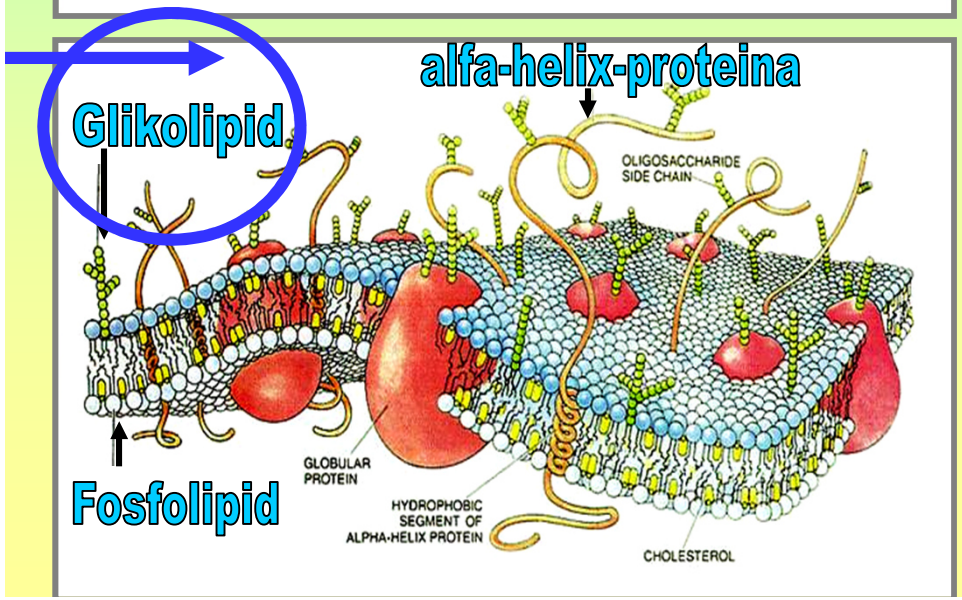


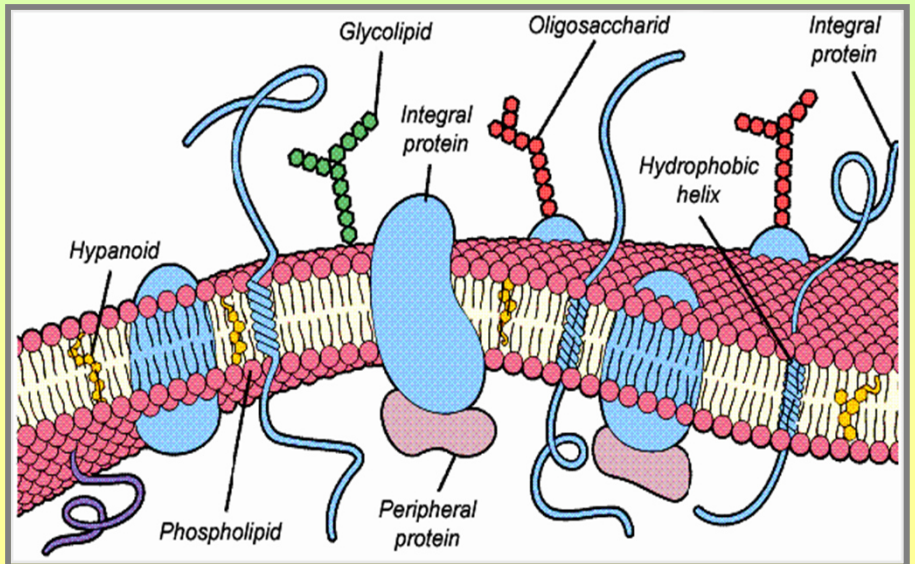
Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Budowa membran komórkowych Eucaryota

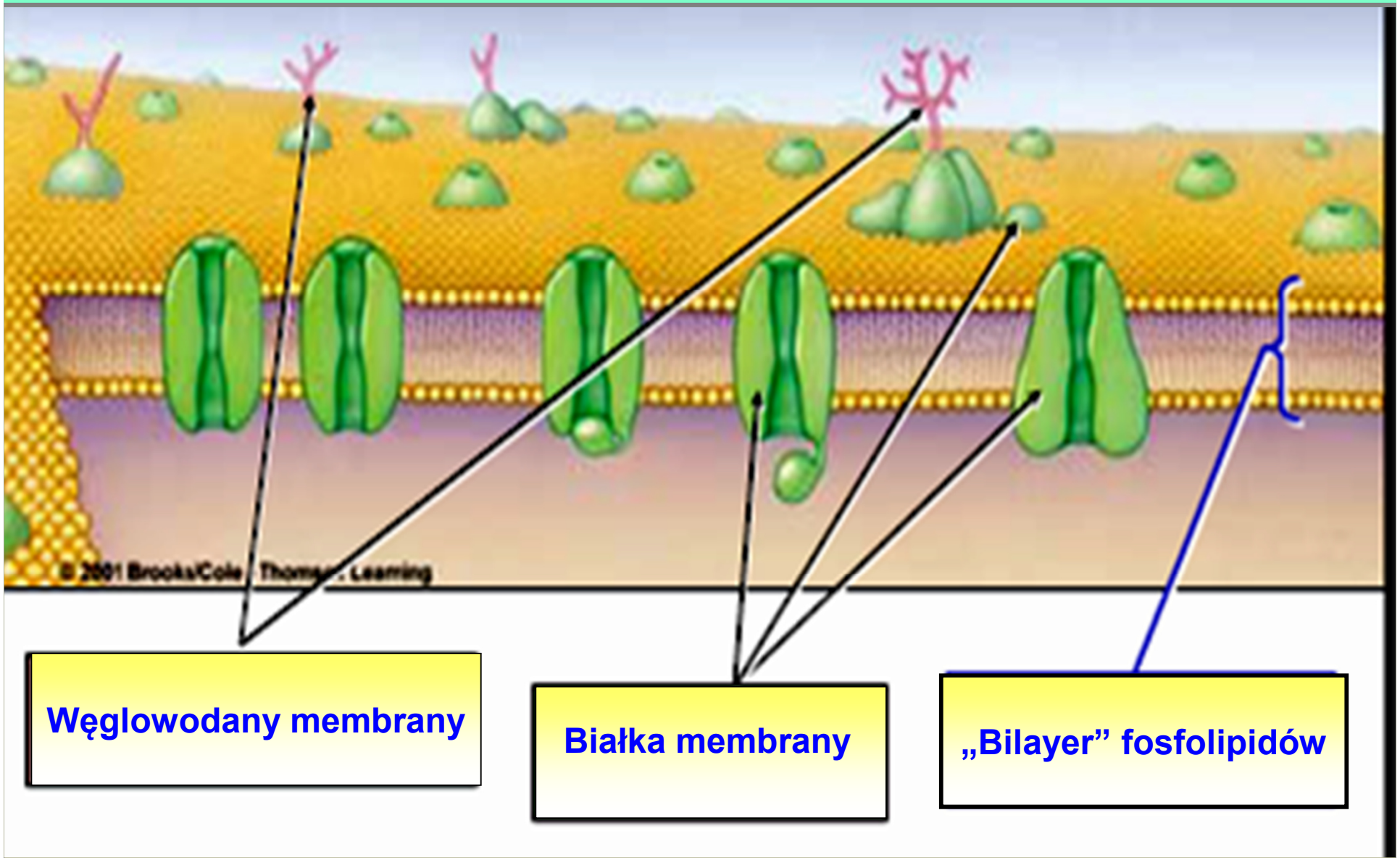






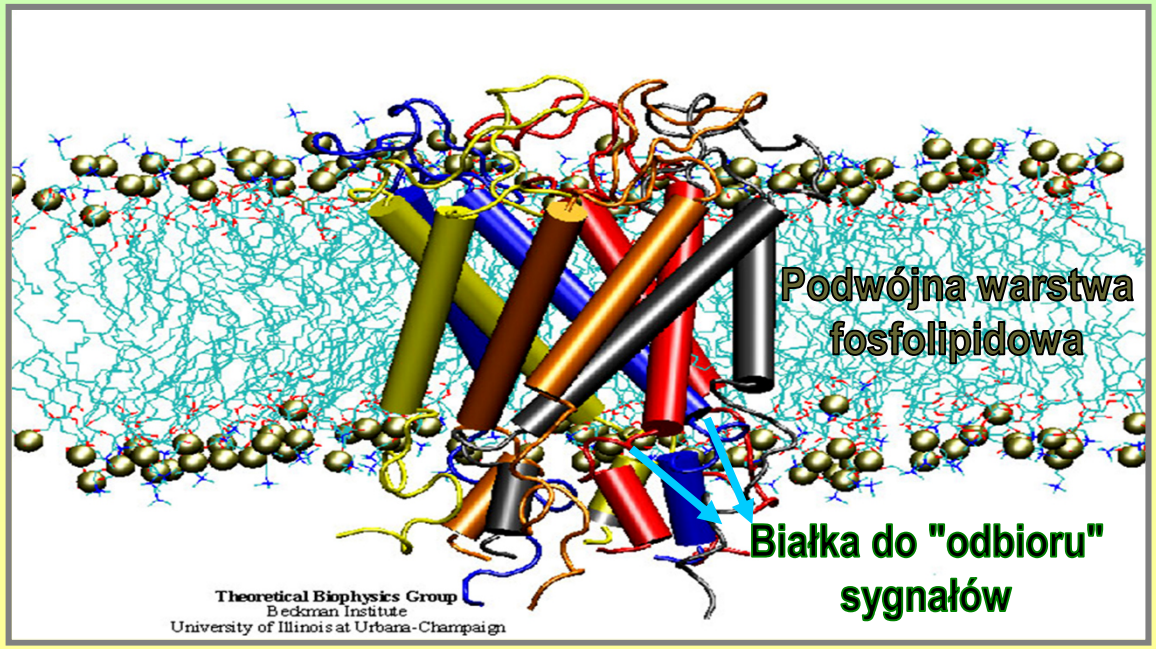


Struktura membrany komórkowej



Osmofilność - białka sygnalne

W aspekcie fizjologii komórki, z cechą osmofilności wiąże się „odbiór” i „przekazywanie” sygnałów o podwyższonym ciśnieniu osmotycznym, za co odpowiedzialne są specyficzne białka membranowe i wewnątrzkomórkowy system genetyczny.



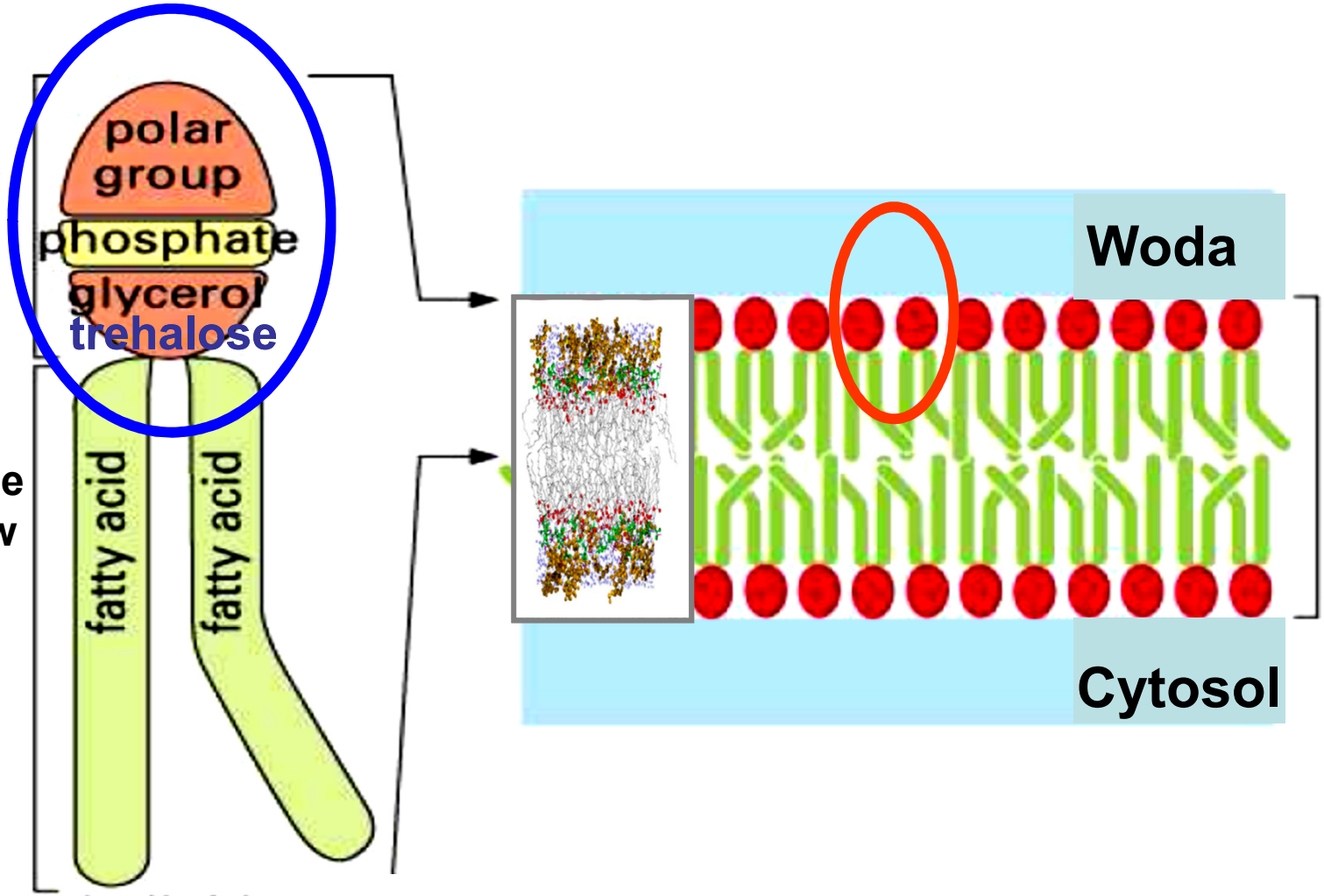
Osmofilność - przepuszczalność membrany

Właściwości błony cytoplazmatycznej drożdży determinują jej przepuszczalność, która zależy od ilości i rodzaju łańcuchów kwasów tłuszczowych, umieszczonych w podwójnej warstwie fosfolipidowej

Dwuwarstwowa struktura membrany

Część hydrofilna

Dwa hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych



Cząsteczki fpsfolipidów

..olecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Przepuszczalność membrany - rola fosfolipidów

Podwyższony poziom nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej zwiększa jej przepuszczalność.

Ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach membrany wzrasta, gdy proces hodowli przebiega w warunkach tlenowych, co związane jest z pewnym stopniem hydaratacji łańcuchów tłuszczowych oraz z ich luźniejszym ułożeniem.

Fosfolipidy - przepuszczalność membrany

Skład fosfolipidów błon komórkowych drożdży determinuje szybkie przenikanie związków rozpuszczalnych w wodzie do komórek namnażanych tlenowo.

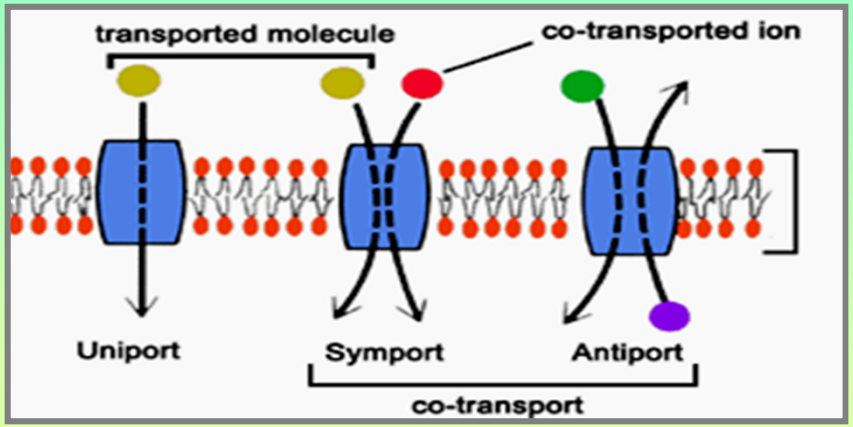
W hodowlach na brzeczkach HG, istotna jest więc:

przepuszczalność membran komórkowych drożdży i aktywny transport substancji przez błony za pośrednictwem specyficznych białkowych przenośników lub na zasadzie dyfuzji.

Przepuszczalność membrany - transport

Dla prawidłowego funkcjonowania komórek ważny jest

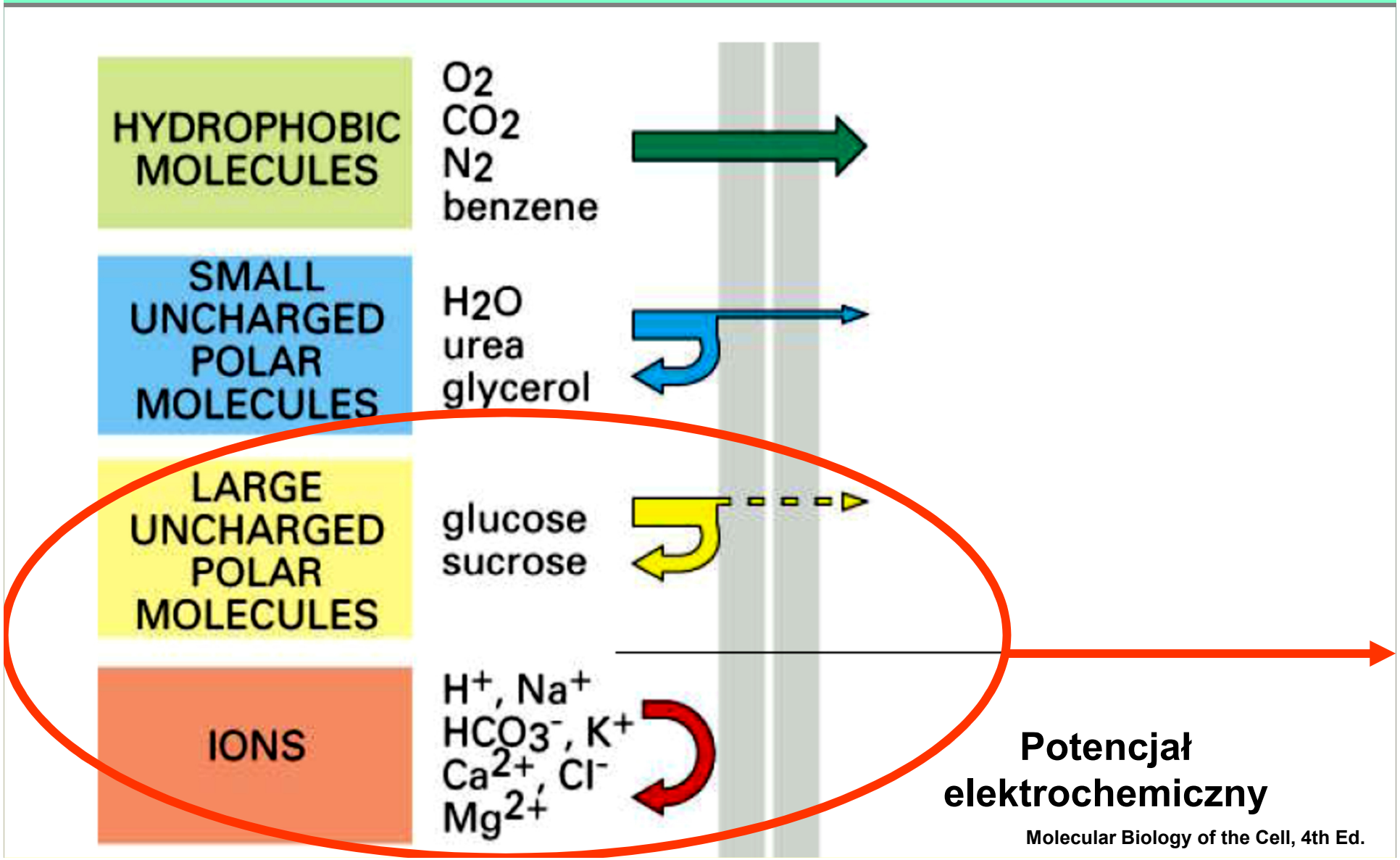
przede wszystkim transport aktywny (3 rodzaje):



- **określony budową błon komórkowych,**
- **wymagający nośników i dostarczenia energii,**
- **umożliwiający gromadzenie cukrów zapasowych, jak**

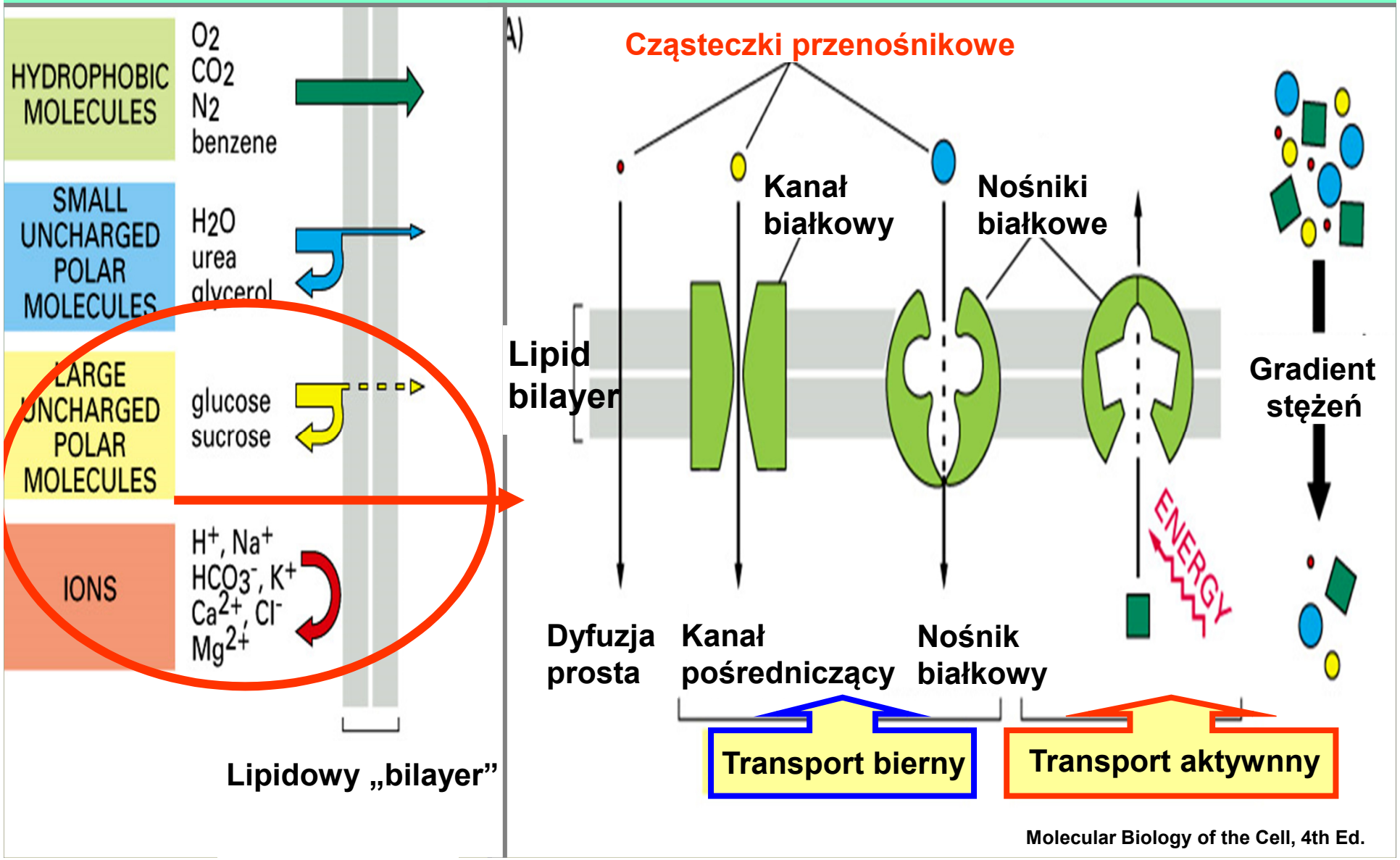
trehaloza i glikogen

Dyfuzja przez membrany komórkowe



Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Mechanizm transportu przez membranę



Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Transport substancji w pęcherzykach (vesicles)

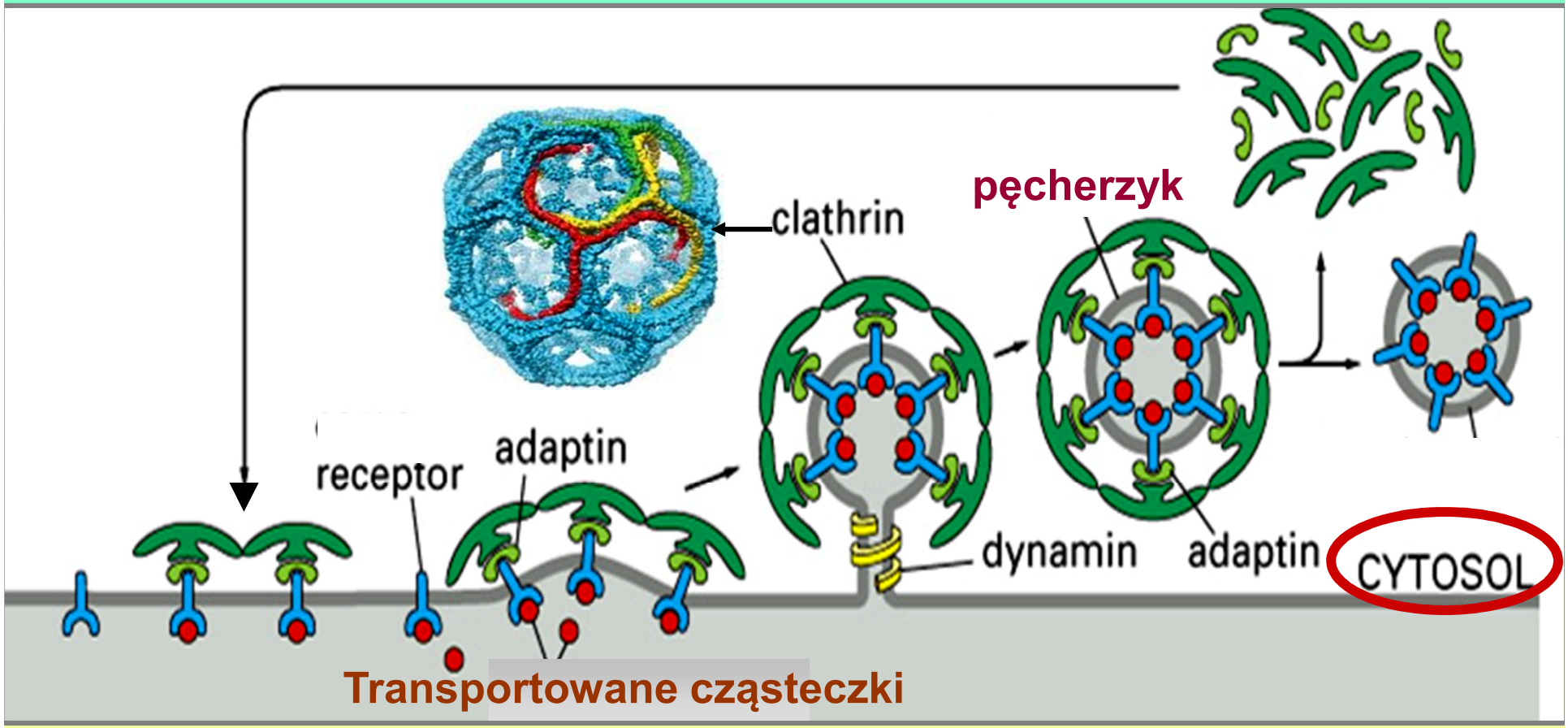
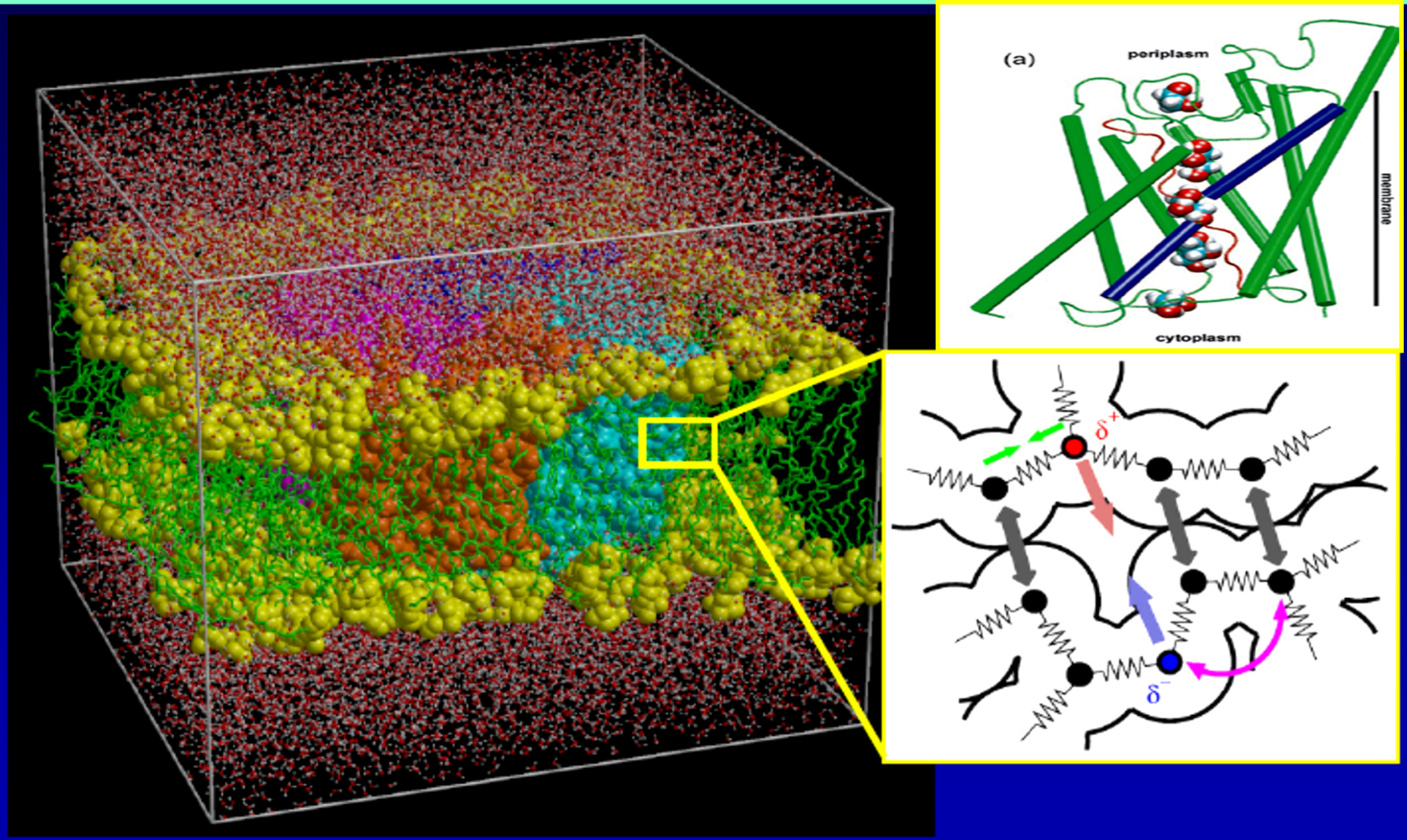


Diagram prezentuje rolę białek otoczkowych „clathrin”, enzymatycznych „dynamin” i pośredniczących „adaptin” podczas transportu substratu do wnętrza komórki drożdży w formie pęcherzyków (proces endocytozy)

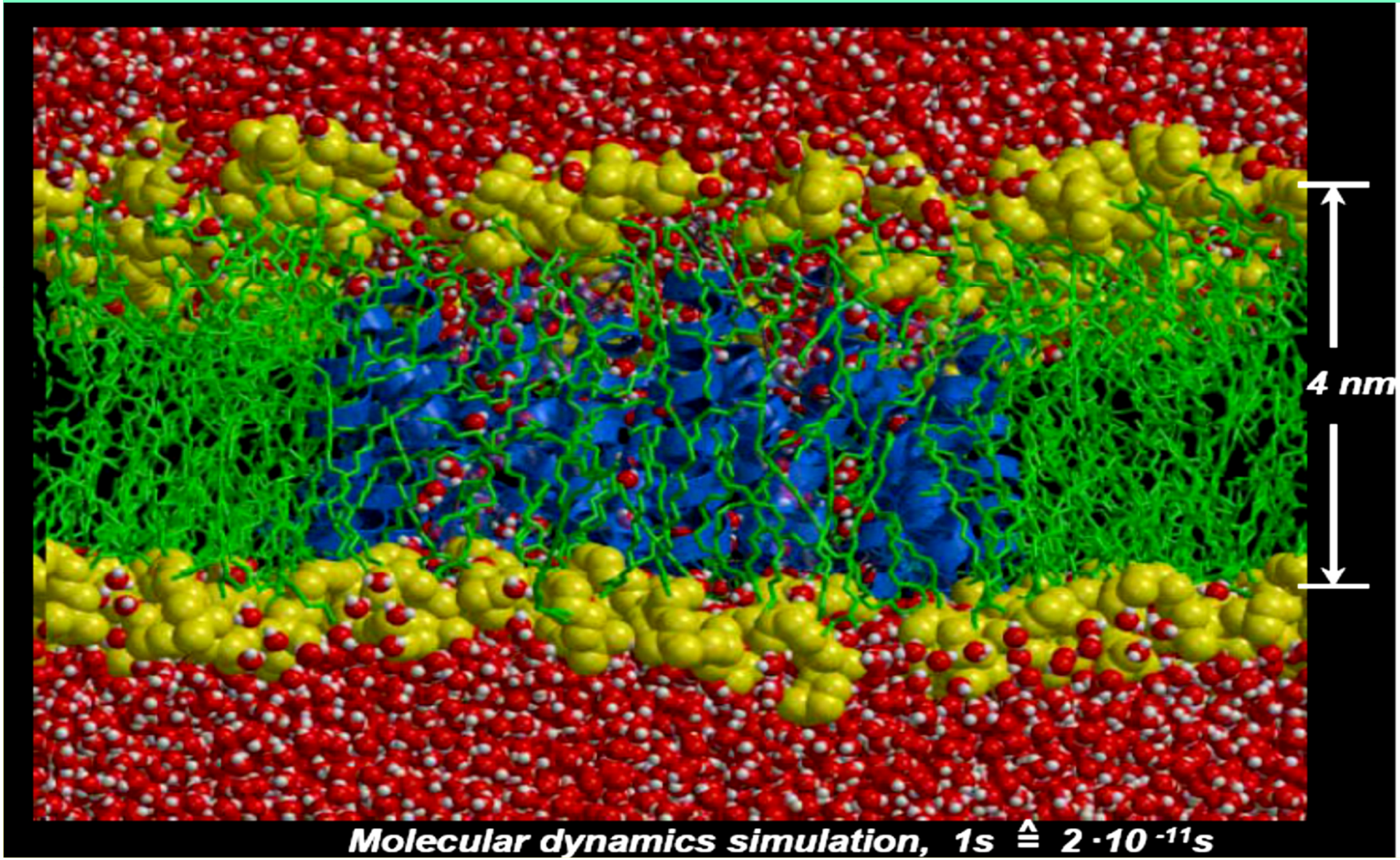
Molecular Biology of the Cell, 4th Ed.

Transport roztworów poprzez "aquaporiny"

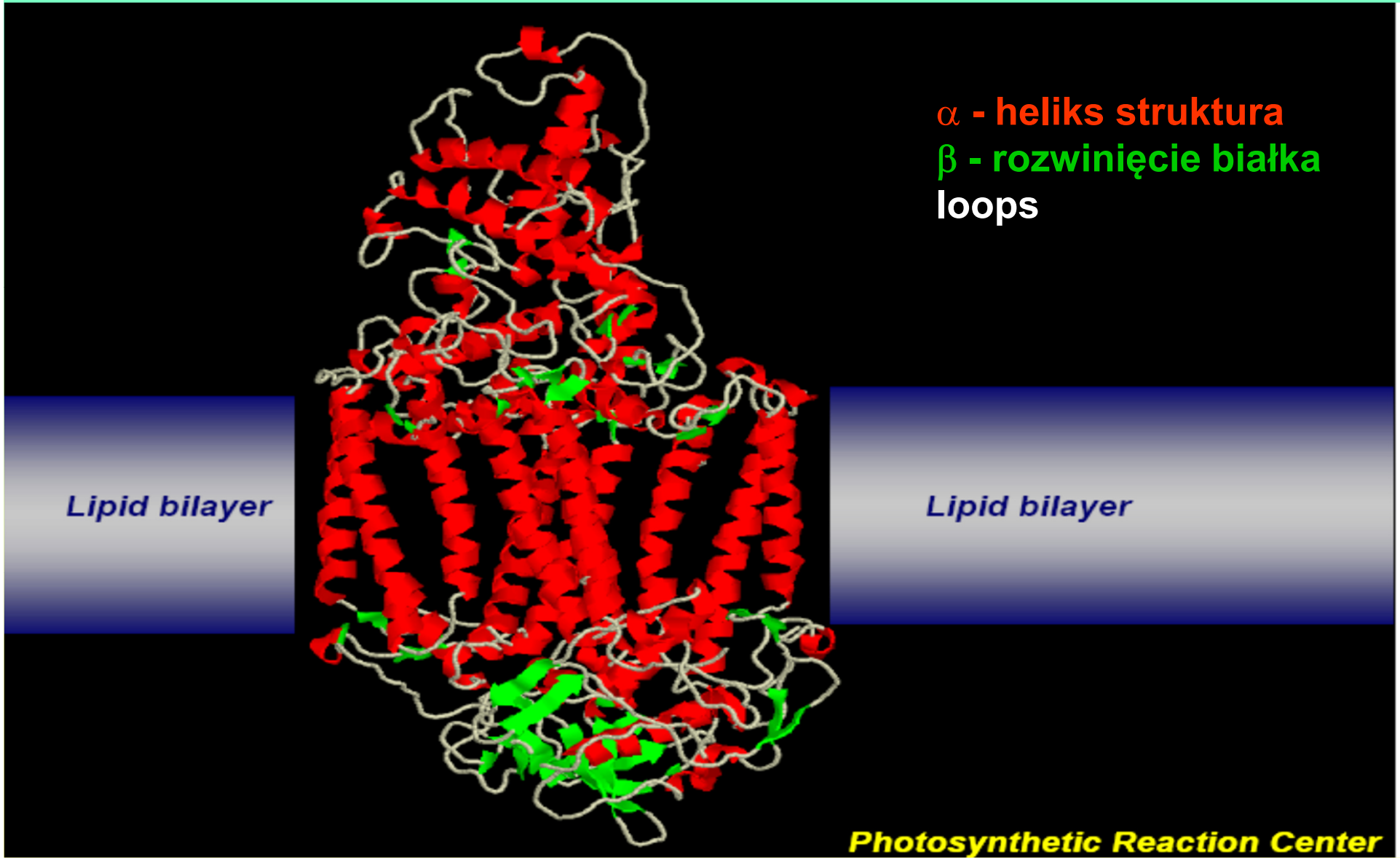


B.L. de Groot, H. Grubmüller, *Science* **294**, 2353 (2001)

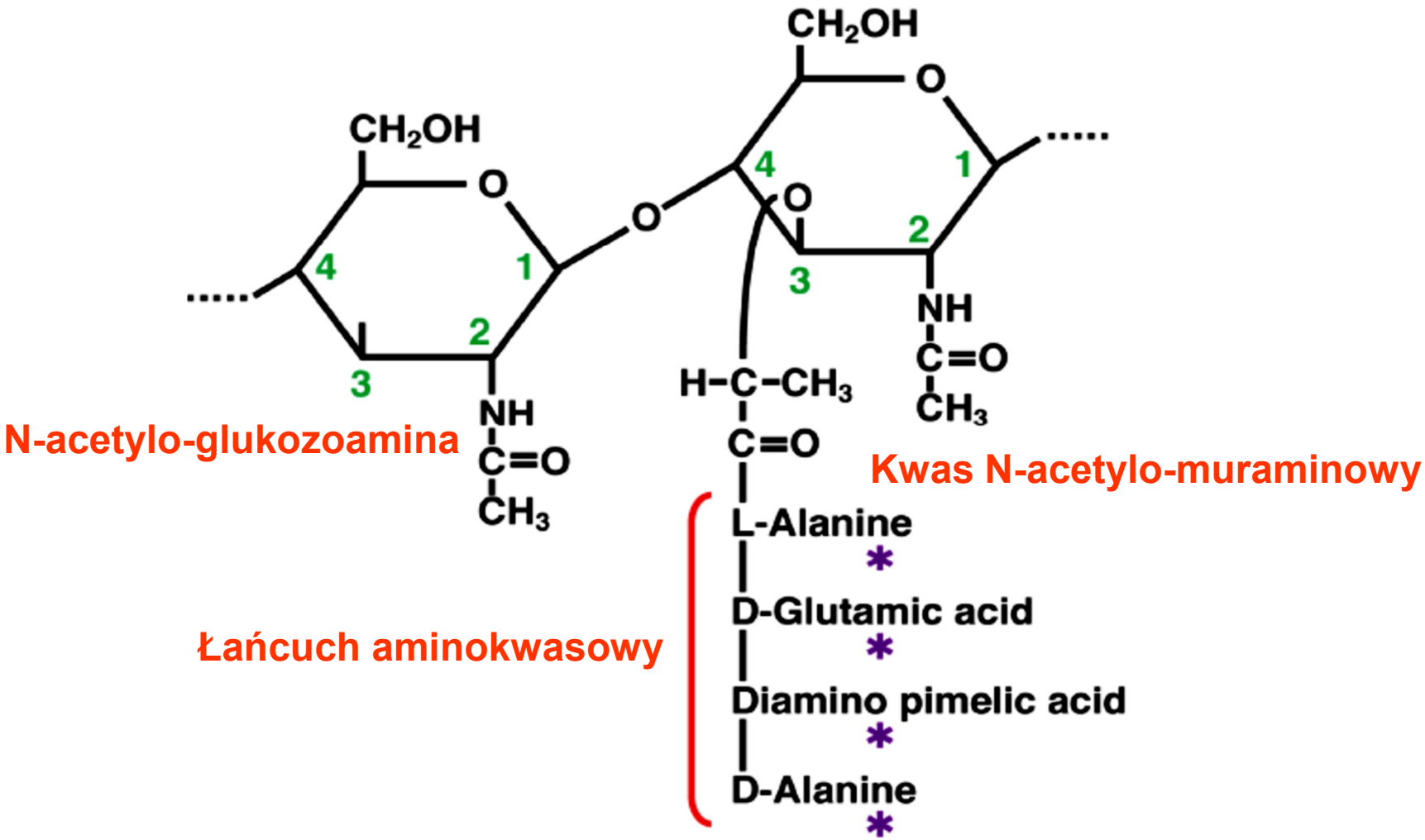
Transport roztworów poprzez "aquaporiny"



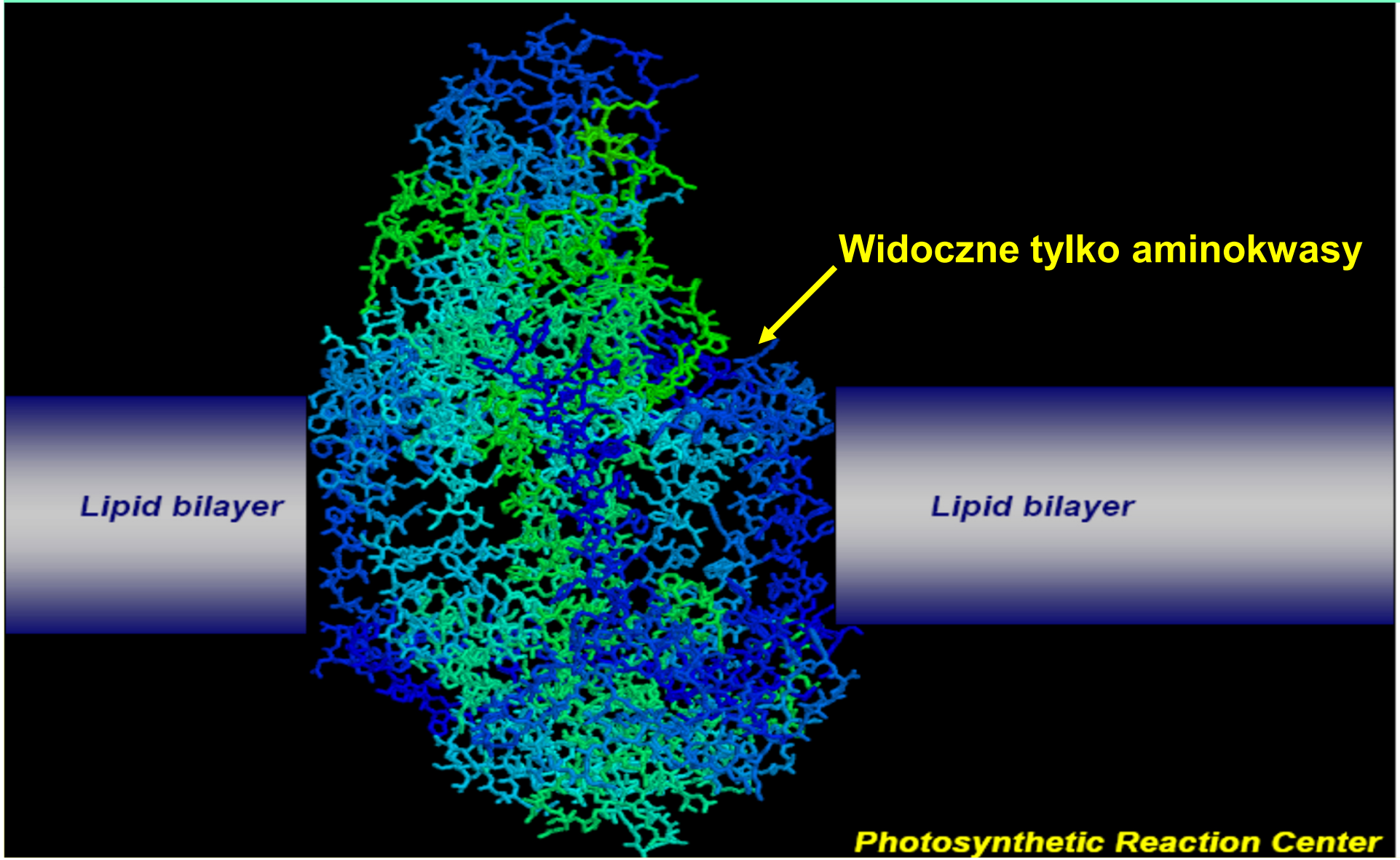
Budowa "aquaporiny"



Peptydoglikan : łańcuch sacharydu z amonokwasami



Budowa "aquaporiny"



Synteza i kumulacja trehalozy & glikogenu

Wyraźne nagromadzenie trehalozy w komórce drożdży *Saccharomyces cerevisie* można osiągnąć podczas stacjonarnej fazy wzrostu w wyniku silnej aeracji, bądź suplementacji pożywki maltozą lub galaktozą, jako jedynymi źródłami węgla.

Kumulacja trehalozy może przebiegać również w warunkach braku proliferacji (namnażania), np. w środowisku zawierającym glukozę, z limitowanym źródłem azotu

Synteza i kumulacja trehalozy & glikogenu

W czasie namnażania drożdży *Saccharomyces* na brzeczce słodowej, kumulacja glikogenu zaczyna się w późnej fazie logarytmicznego wzrostu, a dopiero po wyczerpaniu glukozy rozpoczyna się synteza trehalozy, której prekursorem jest najprawdopodobniej glikogen.

Reasumując, synteza trehalozy rozpoczyna się w fazie tzw. głodu, tj. wtedy, gdy glukoza jest na wyczerpaniu.

Synteza trehalozy a stres osmotyczny i termiczny

Wywoływanie różnego rodzaju stresów w czasie hodowli drożdży, np. ekstremalnych temperatur, bądź dehydratacji osmotycznej, zwiększa w komórkach *Saccharomyces* sp. poziom trehalozy.

Stwierdzono istotną korelację pomiędzy zawartością trehalozy, obecnością białek hsp (*heat shock protein* w czasie tzw. szoku termicznego) a odpornością na wyżej wymienione formy stresu.

Synteza trehalozy a stres osmotyczny i termiczny

Metabolizm trehalozy w drożdżach jest wskaźnikiem stresu hodowlanego, a wysoki poziom endogennej i egzogennej trehalozy wzmaga odporność komórki drożdżowej na niekorzystne czynniki środowiska propagacji.

Trehaloza jest więc czynnikiem osmoochronnym oraz termoochronnym i przypisuje się jej rolę osłaniającą w stosunku do błony komórkowej *(efect cryptobiosis).*

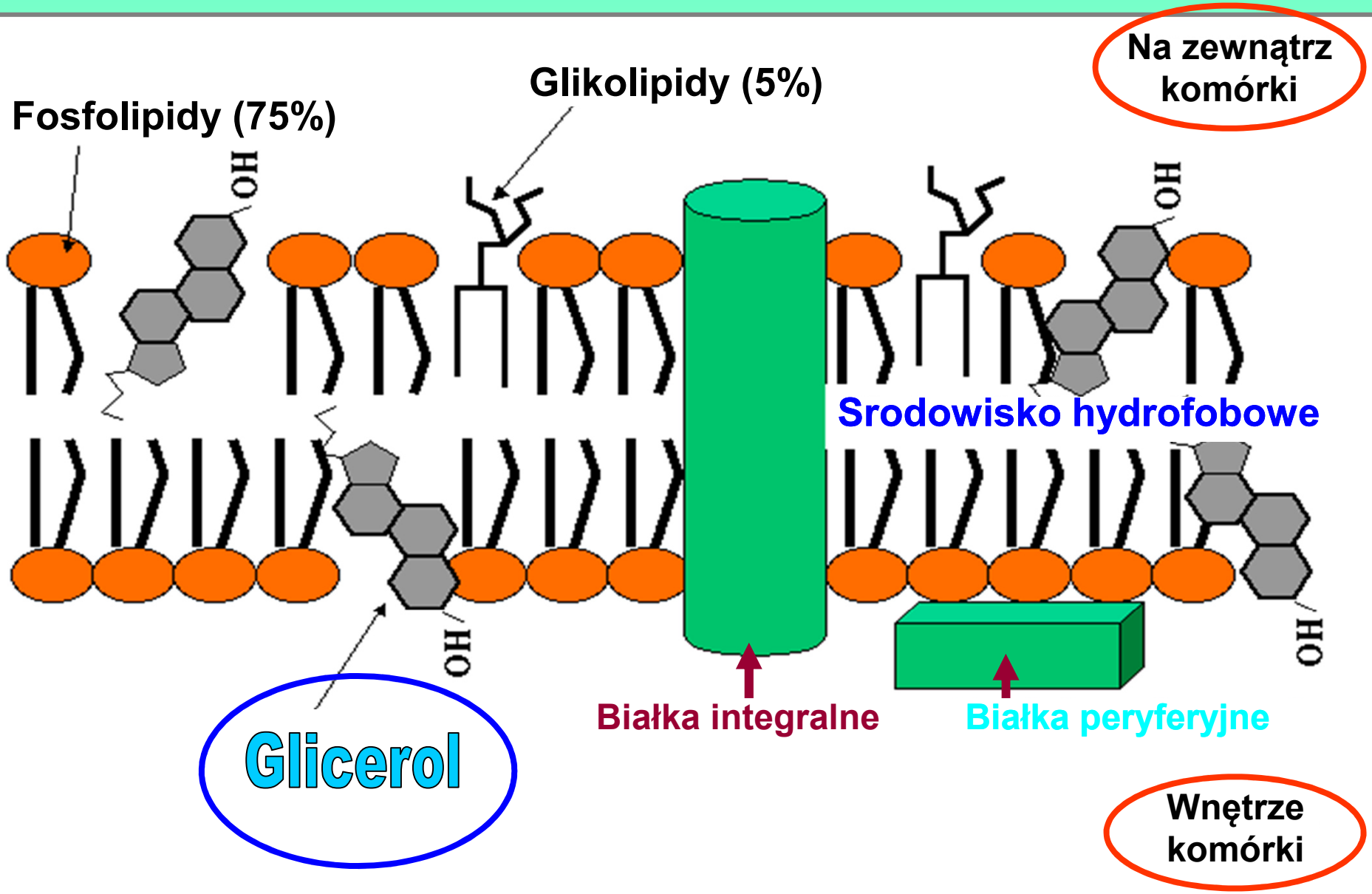
Osmofilność a rola glicerolu

W drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* cecha osmofilności zależy nie tylko od wewnątrzkomórkowego stężenia trehalozy, lecz także od glicerolu.

Stwierdzono, że:

glicerol stabilizuje natywne formy białek enzymatycznych oraz warstwy fosfolipidowe błony komórkowej drożdży w czasie proliferacji w warunkach stresu osmotycznego lub termicznego.

Lokalizacja glicerolu w strukturze membrany



Czynniki regulujące osmofilność

Istotną funkcję i ściśle określoną rolę w mechanizmie osmofilności pełnią:

- **skład chemiczny oraz struktura membran, kontrolowana genetycznie i biochemicznie**
- **jony Na^+, które aktywują wymianę substancji między komórką a środowiskiem oraz wpływają na wzrost zawartości trehalozy w drożdżach, będącej regulatorem ciśnienia osmotycznego wewnątrz komórki drożdżowej**

Czynniki regulujące osmofilność

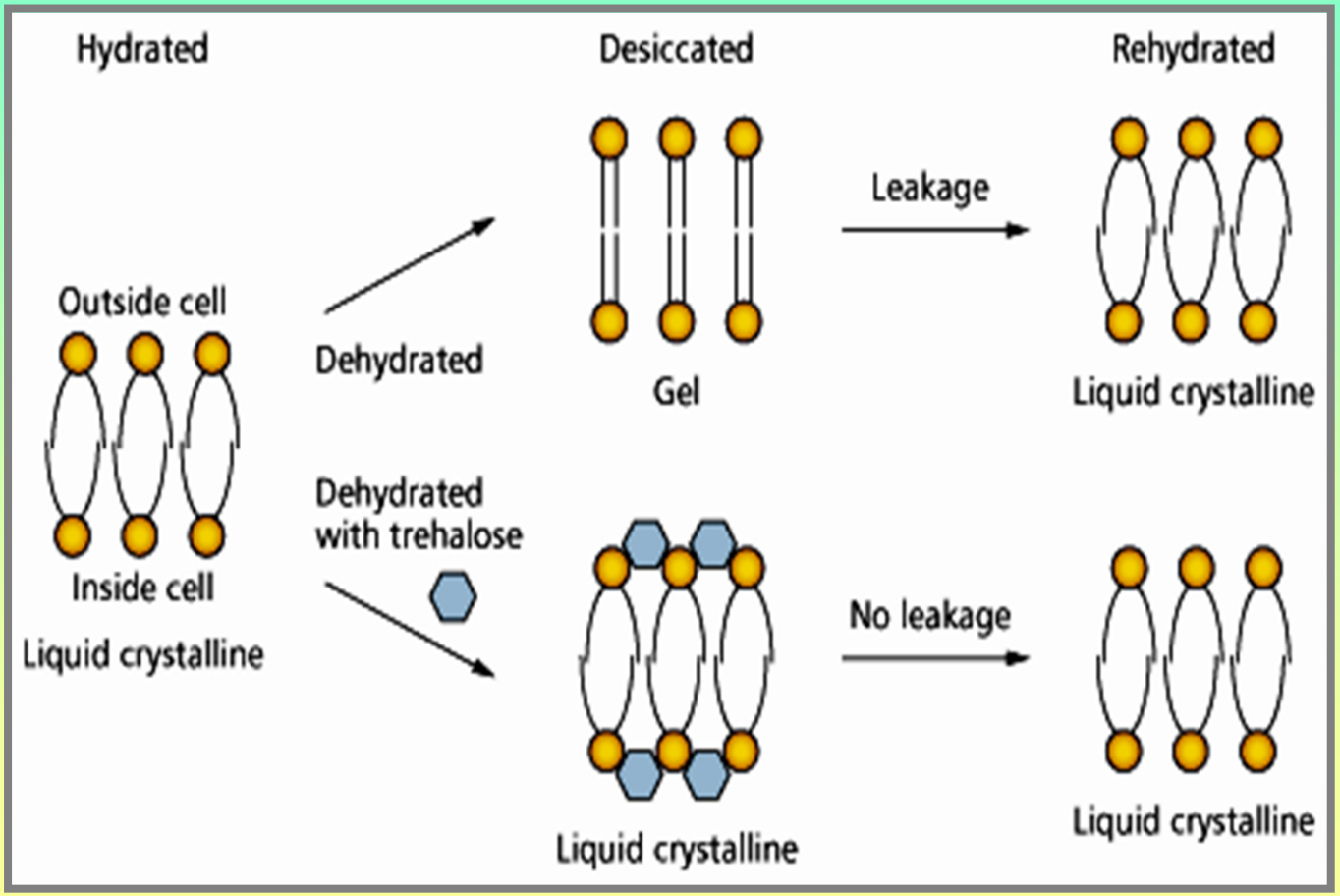
- jony K^+, niedobór których hamuje transport aktywny, stąd pożywki hodowlane lub brzeczki fermentacyjne są wzbogacane jonami K^+
- jony Zn^{+2}, regulujące syntezę fosfolipidów membrany drożdży *Saccharomyces* sp., pełniące rolę kofaktora szeregu enzymów i będące komponentem wielu czynników transkrypcyjnych
- enzym ATP-aza membranowa (*antiporter*), przenoszący substraty i stymulowany przez jony K^+, Na^+ i Mg^{+2}

Czynniki regulujące osmofilność

- jony Mg^{2+} regulujące zmianę składu kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej drożdży; przy niedoborze jonów Mg^{2+} do warstwy fosfolipidowej membrany wbudowuje się kwas palmitynowy, wywołując efekt inhibicji enzymu (syntazy), syntetyzującego długie łańcuchy kwasów tłuszczowych

- trehaloza, stabilizująca strukturę ściany i błony komórkowej drożdży, białka membranowe oraz enzymatyczne poprzez ich hydratację

Rola trehalozy w strukturze błony komórkowej



Czynniki regulujące osmofilność

Do produkcji piwa z *High Gravity* brzeczek,

do otrzymywania drożdży suszonych, bądź

do produkcji drożdży mrożonych, najlepiej

nadają się szczepy drożdży osmofilnych,

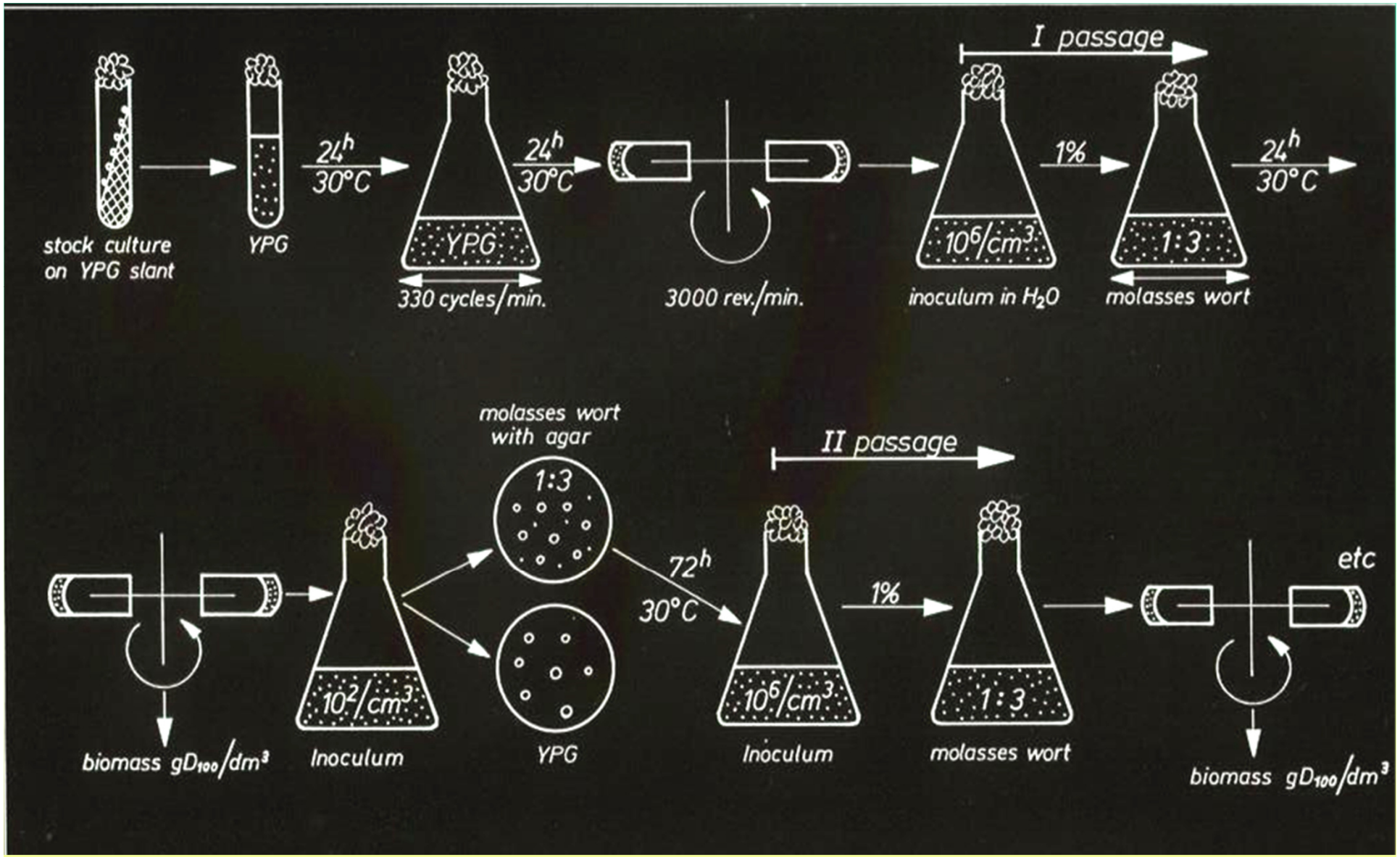
adaptowane do tzw. gęstych brzeczek

lub specyficznie izolowane.

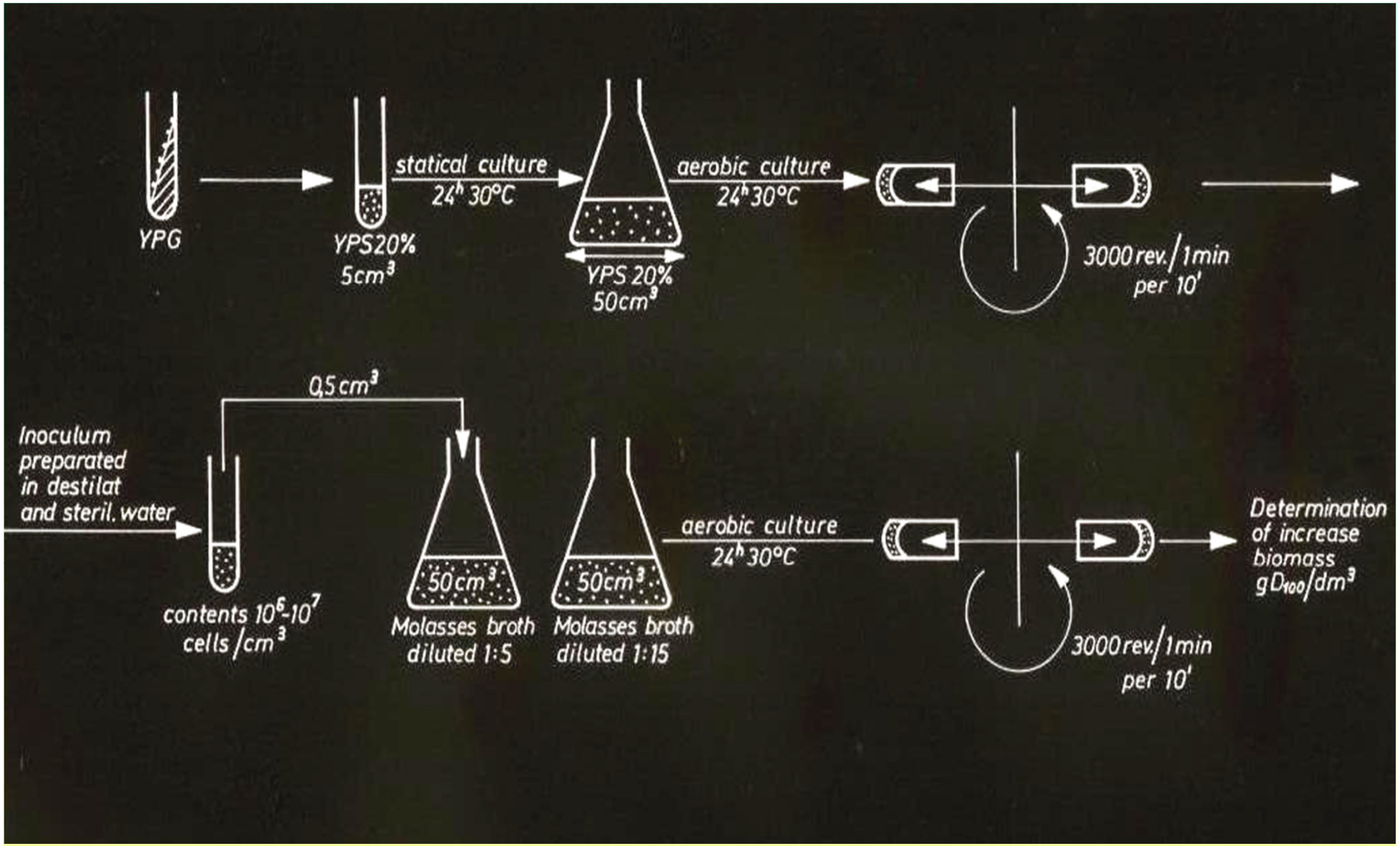
W brzeczkach stężonych o 25 – 30° Blg, odpowiednie

szczepy drożdży wykazują wzmożoną syntezę

trehalozy do 8%, lub 12% w s. masie.



Izolacja ofmofilnych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*



Schemat przygotowania inoculum drożdży osmofilnych, *Saccharomyces cerevisiae,* do propagacji biomasy komórkowej w brzeczkach o wysokim stężeniu

Osmofilne szczepy drożdży

Oprócz problemów bioinżynieryjnych, jakie pojawiają się w browarnictwie podczas modyfikacji technologicznych z użyciem brzeczek HG, z jednoczesną suplementacją wybranymi związkami mineralnymi (Mg^{+2}, Zn^{+2}, K^{+} i Na^{+}), ekstraktem słodowym, czy witaminami (biotyną), istnieje konieczność otrzymania i dostosowania do nowych warunków odpowiednich szczepów drożdży osmofilnych lub jednocześnie osmoaktywnych i alkoholoopornych

Osmofilne szczepy drożdży

O dużej aktualności problemu świadczą liczne prace nad otrzymywaniem metodami genetycznymi lub klasycznymi odpowiednich szczepów drożdży,

bądź nad biochemiczną regulacją ich hodowli

(rola inozytolu i cynku w biosyntezie fosfolipidów)

lub nad sterowaniem fermentacją w brzeczkach HG.

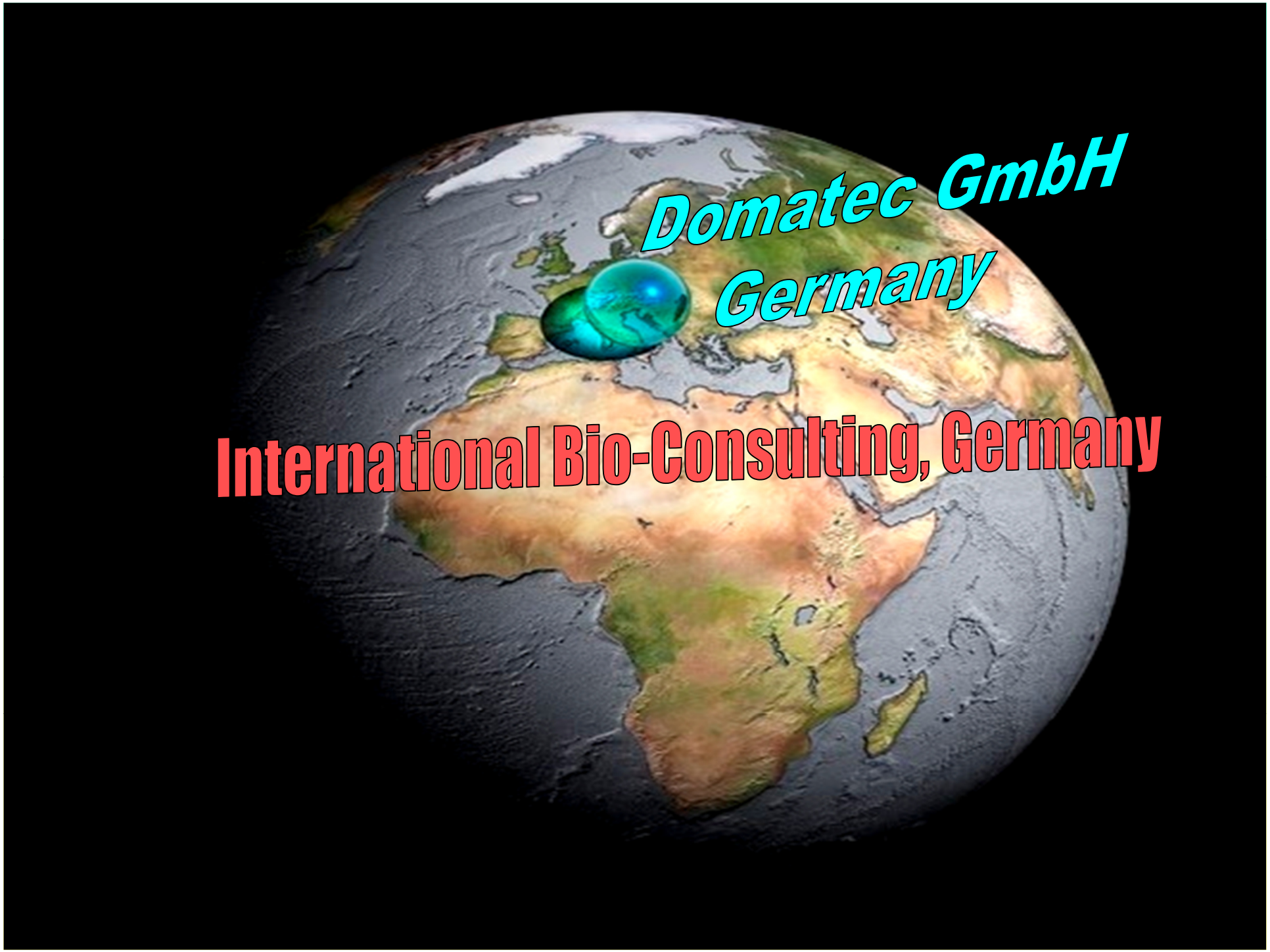
Metabolizm trehalozy i glikogenu

jest kontrolowany na poziomie

„post-transkrypcyjnym”

Dziękuję za uwagę!

STOP!
Genetycznym Manipulacjom


Domatec GmbH
Germany
International Bio-Consulting, Germany