

Masarykova univerzita v Brně

Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální biologie

Oddělení mikrobiologie a molekulární biotechnologie

Doplnění laboratorního cvičení z Fyziologie bakterií

Řešitelé: Kopecká Jana, Sedláček Ivo, Balážová Tereza

Podporováno Fordem rozvoje vysokých škol MŠMT č. 424, G4, 2013

14 Měření schopnosti kvasinek flokulovat

Úvod

Kvasinky patří celosvětově k průmyslově nejvyužívanějším mikroorganismům (potravinářství, farmacie, různé oblasti vědy, techniky i medicíny, modelové organizmy, atd.). Buňka kvasinek je eukaryotního typu, má ovšem silnou a pevnou buněčnou stěnu tvořenou převážně glukany, glykozylovanými proteiny (manany) a chitinem.

Flokulace je reverzibilní schopnost kvasinek tvořit větší celky, shlukovat se a následně se rychle usazovat nebo stoupat na povrch média. Je ovlivněna celou řadou faktorů (kmen kvasinek, médium, typ kultivace, čas, pH, atd.). Objevuje se spontánně na konci kvašení, usnadňuje odstraňování buněk z fermentačního média a tedy i výrazně zlehčuje získávání produktu, namísto použití filtrace. Pro průmyslové aplikace (pivovarnictví, vinařství, produkce bioetanolu a zpracování odpadních vod) je flokulace vítanou vlastností kvasinek.

Komponenty flokulace jsou buněčné stěny kvasinek, tedy α -mannany, proteiny (FloP = zymolektiny) a vápenaté ionty. Mechanismus flokulace popisuje lektinová teorie z roku 1982, podle které „čnící“ povrchový protein (zymolektin) z buňky a v přítomnosti Ca^{2+} váže cukernaté zbytky na povrchu sousední buňky. Tyto znalosti se využívají při měření schopnosti kvasinek shlukovat se (promývání buněk či přidání vápenatých iontů). Přidání cukru do roztoku může zablokovat lektiny pro vazbu na sousední buňky a tedy i pro flokulaci. Je známa i koflokulace mezi kvasinkami a bakteriemi.

14.1 Flokulační test – modifikovaný Helmův sedimentační test

Princip metody

Principem metody je porovnání rychlosti sedimentace buněk v přítomnosti a nepřítomnosti dvojmocných iontů. Proto jedna část narostlých buněk je promyta EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, Chelaton 2 - "sekvestruje", vyváže ionty). Druhá část kultury je naopak promyta roztokem obsahujícím Ca^{2+} . Rozdíl v rychlosti sedimentace se stanoví nefelometricky – stanovení procenta flokulace.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**
Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces pastorianus*
- **Chemikálie a roztoky:**
YPD médium (2% pepton, 2% D-glukóza, 1% kvasničný extrakt; pH 6,34)
EDTA 50 mM, pH 7,0
promývací roztok – CaSO_4 0,51 g/l
sedimentační roztok - CaSO_4 0,51 g/l; octan sodný 6,8 g/l; kyselina octová 4,05 g/l; etanol 4% (v/v); pH 4,5
- **Přístroje:**
centrifuga, pH metr, vortex
spektrofotometr Spekol 20

Postup

Flokulační test je prováděn s buňkami, které byly kultivovány po dobu 48, 72 nebo 96 hodin při 30°C za daných kultivačních podmínek (staticky nebo při třepání 120kyvů) metodou dle Lawrence a Smart (2007).

Buňky narostlé v 20 ml média centrifugujeme při pokojové teplotě (5000 rpm, 10 min). Supernatant odlijeme do skleněné kádinky a změříme pH. Sediment buněk resuspendujeme v destilované vodě a naředíme na koncentraci buněk $10^8/\text{ml}$ (odpovídá přibližně hodnotě absorbance $1,700 \pm 0,050$ na přístroji Spekol 20 při 620 nm). Ze suspenze odebereme $400 \mu\text{l}$ do dvou zkumavek označených **A** a **B**.

Suspenzi ve zkumavce **A** promyjeme 1 ml destilované vody a centrifugujeme (5000 rpm, 5 min). Sediment resuspendujeme v 1 ml 50 mM EDTA (pH 7,0), důkladně promícháme a poté přeneseme 1 ml suspenze do 9 ml destilované vody. Po promíchání přeneseme 1 ml suspenze do 2 ml destilované vody a ihned změříme absorbanci při 600 nm (**A**).

Suspenzi ve zkumavce **B** promyjeme 1 ml promývacího roztoku a centrifugujeme (5000 rpm, 5 min). Sediment resuspendujeme v 1 ml sedimentačního roztoku, řádně promícháme a přeneseme 1 ml suspenze do zkumavky. Takto se vzorek ponechá 20 min stát v klidu. Po této době odebereme svrchních $100 \mu\text{l}$ a přeneseme do $900 \mu\text{l}$ destilované vody. Ke vzorku přidáme 2 ml destilované vody a ihned změříme absorbanci při 600 nm (**B**).

Míru flokulace vypočteme podle vzorce:

$$\%F \equiv \frac{A-B}{A} \times 100$$

kde A = absorbance vzorku ze zkumavky A; B = absorbance vzorku ze zkumavky B.

Vyhodnocení a závěr

Z naměřených hodnot vypočteme % flokulace pro jednotlivé kmeny v daném typu kultivace a vytvoříme tabulku (hodnoty od všech skupin ve cvičení). Sestrojíme graf, kde je osa x – kmen kvasinek; osa y - % flokulace; vedlejší osa y – pH a statisticky porovnáme získané výsledky (závislost flokulace na podmínkách kultivace a rozdíl mezi studovanými kmeny).

Literatura

Lawrence S.J., Smart K.A. (2007). Impact of CO₂-induced anaerobiosis on the assessment of brewing yeast flocculation. J. Am. Soc. Brew. Chem. 65: 208-213.

Mazán M., Mazánová K., Farkaš V. (2006). Bunková stena húb – výzva pre výskum nových antimykotík. Chem. Listy. 100: 433-439.

Miki B.L.A., Hung Poon N., James A.P., Seligy V.L. (1982). Possible mechanism for flocculation interaction governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 150: 878-889.

Peng X., Sun J., Iserentant D., Michiels C., Verachtert H. (2001). Flocculation and coflocculation of bacteria by yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 777-781.

Stewart G.G. (2009). The Horace Brown Medal Lecture: Forty years of brewing research. J. Inst. Brew. 115: 3-29.