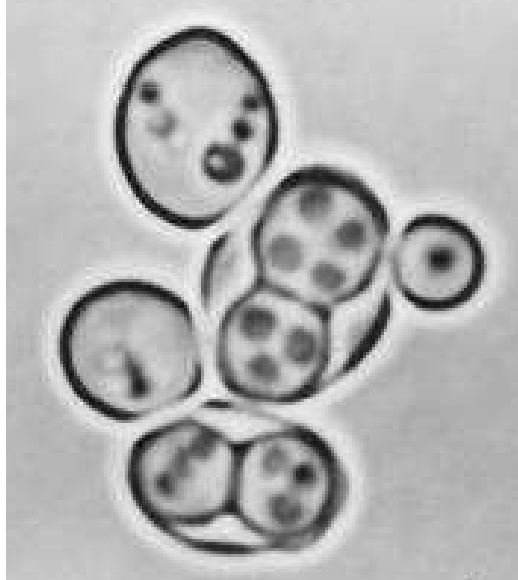
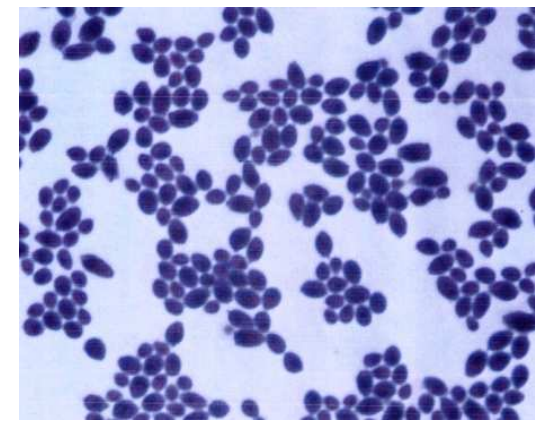


Měření schopnosti kvasinek flokulovat

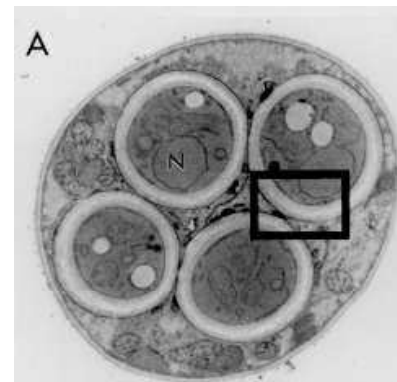
Doplnění laboratorního cvičení z Fyziologie bakterií
Řešitelé: Kopecká Jana, Sedláček Ivo, Balážová Tereza



Kvasinky



- heterotrofni eukaryotní organismy
- tvoří jednotnou taxonomickou skupinu (asko-, basidio-, deuteromycety)
- dle Grama se barví jako **G+**, ale buněčná stěna obsahuje **chitin, manan, glukany, proteiny** (tedy nejsou Gram-pozitivní)
- mají schopnost zkvašovat mono-, di-, nebo trisacharidy na ethanol a CO_2 ; většinou fakultativně anaerobní
- **nízká teplotní odolnost** (usmrcení při 2-5 minutovém zahřívání na $56^\circ C$)
- tvorba spor (4, 8 či 16)

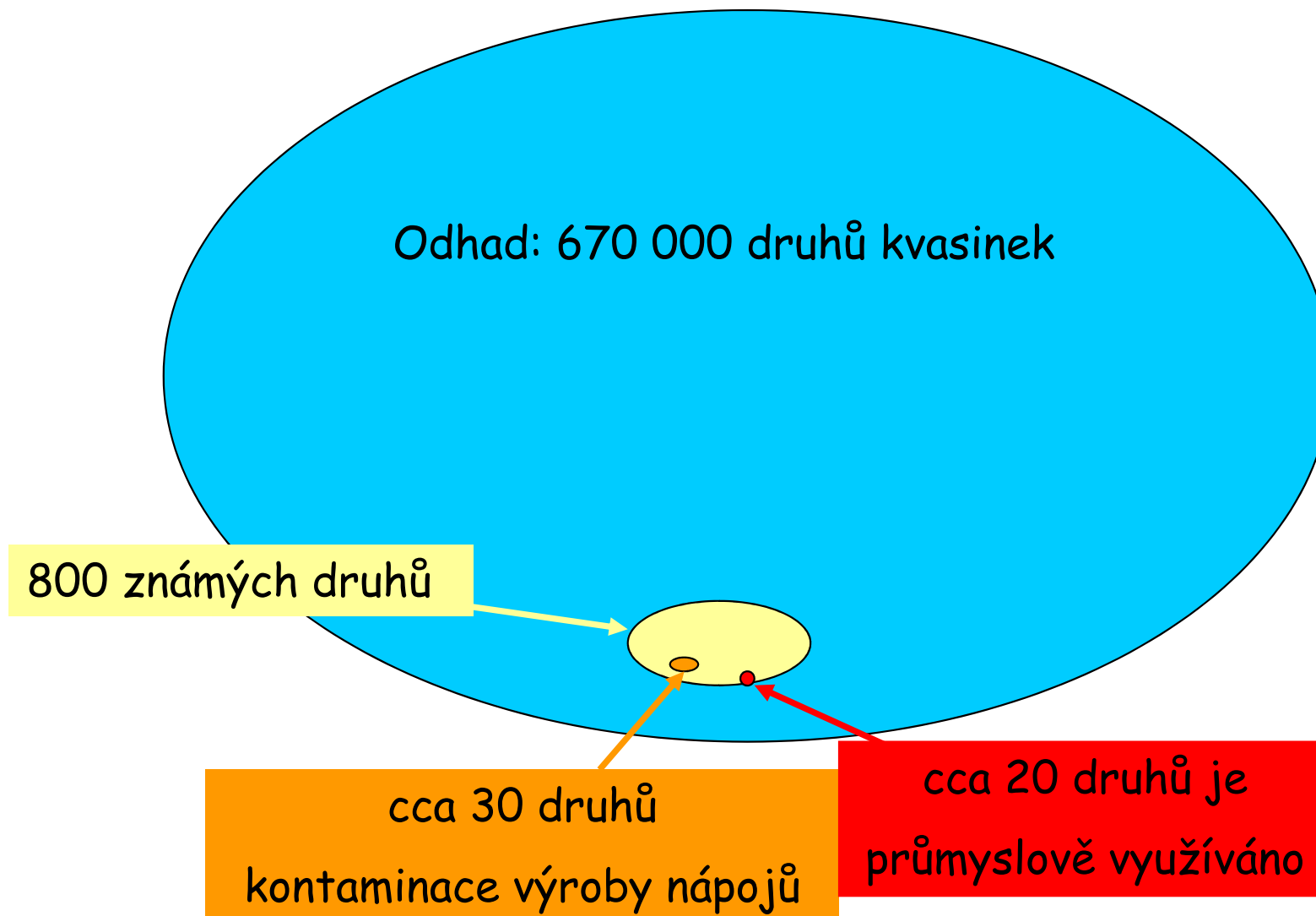


Kvasinky

- široké využití
(potravinářství, farmacie, medicína, modelové organizmy, atd.)
- ale i patogenní kvasinky
- genom - 1. osekvenovaný eukaryotický organizmus
 - *S. cerevisiae* 12 Mb, 16 chromozomů (1996)
 - *S. pastorianus* 25 Mb, 36 chromozomů (2009, průmyslový kmen)



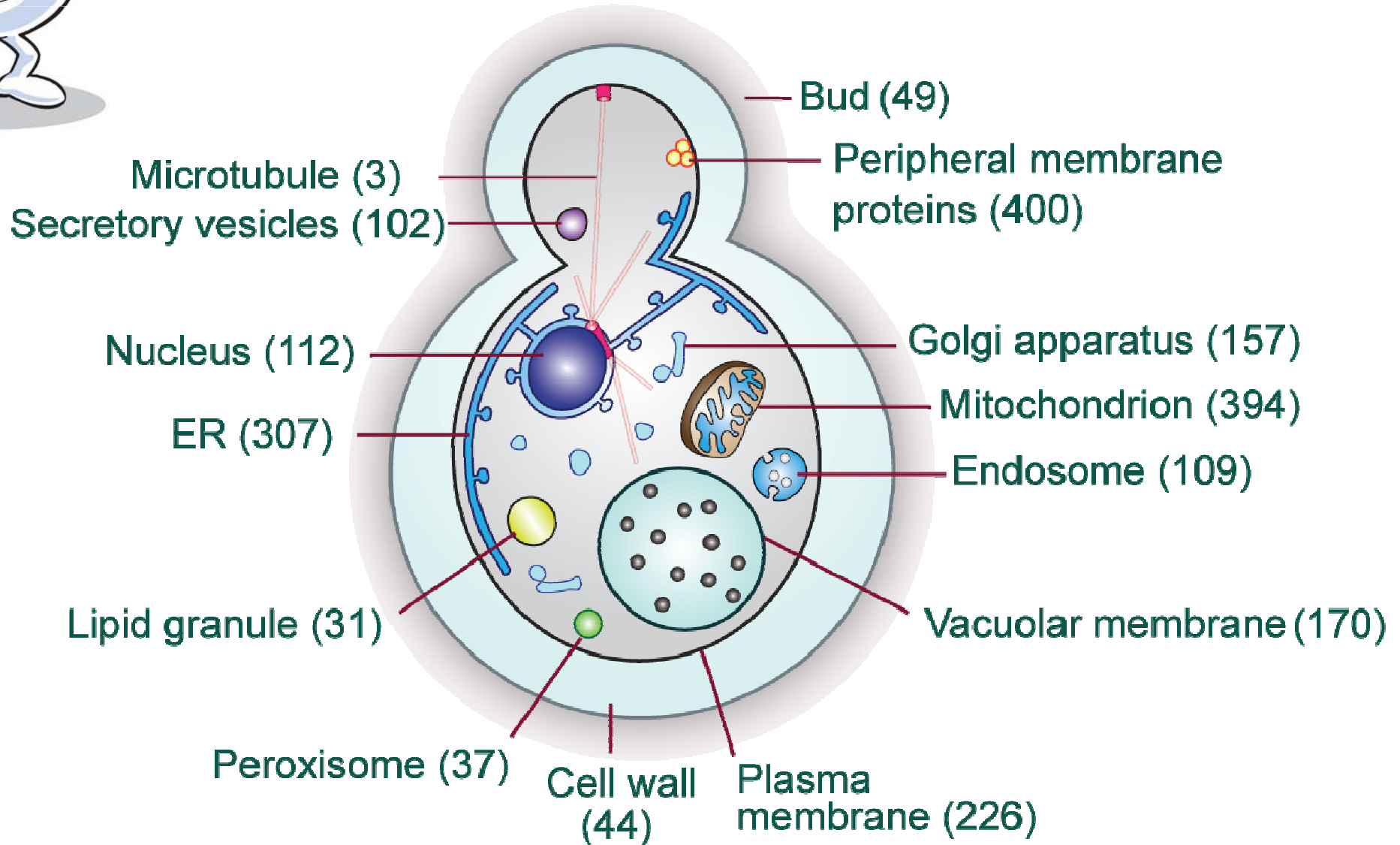
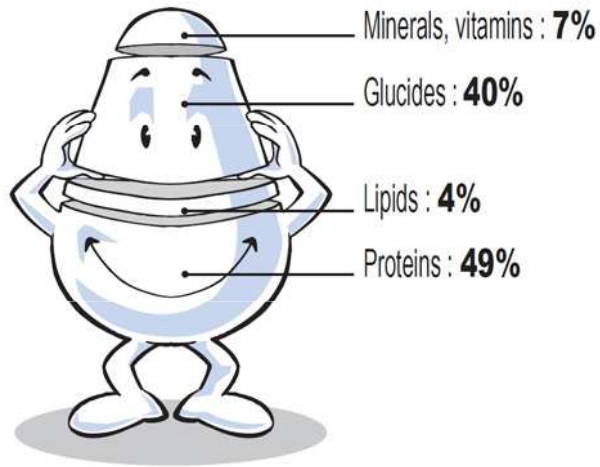
Využívané kvasinky



Pivovarské kvasinky

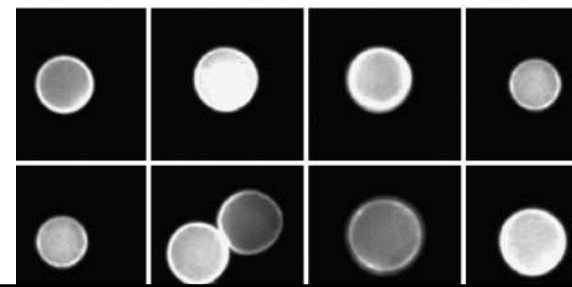
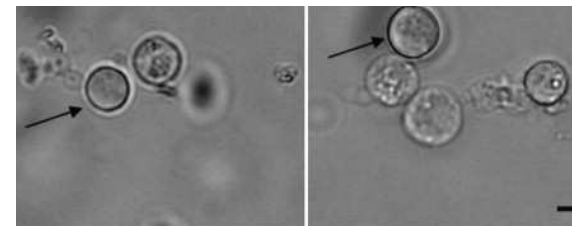
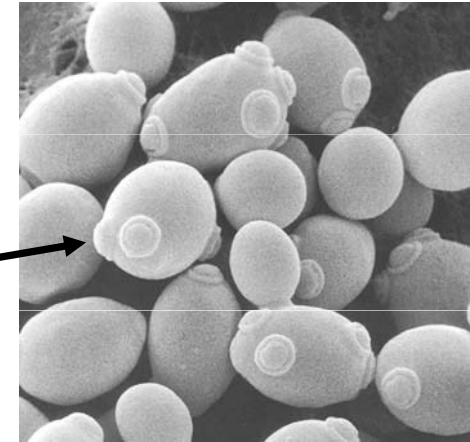
- kulturní kvasinky používané k produkci spodně či svrchně kvašených piv
- technologicky odlišné druhy *S. pastorianus* (spodní kvasinky) a *S. cerevisiae* (svrchní kvasinky)
- hybridní, polyploidní (tri- či tetraploidní), často i aneuploidní mikroorganismy
- vyšší počet kopií některých genů → větší genetická a biochemická flexibilita (schopnost přizpůsobit se stresujícím technologickým podmínkám)
- tolerance ke chmelovým látkám, nízké teplotě, průmyslovým stresům

Buňka kvasinek

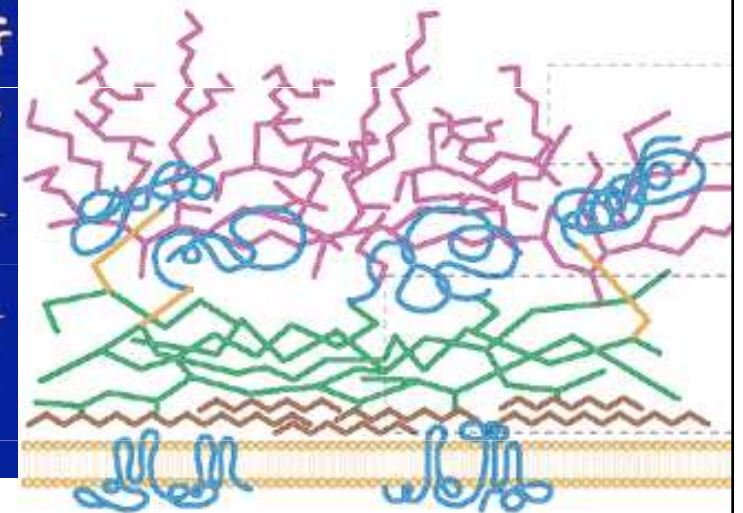
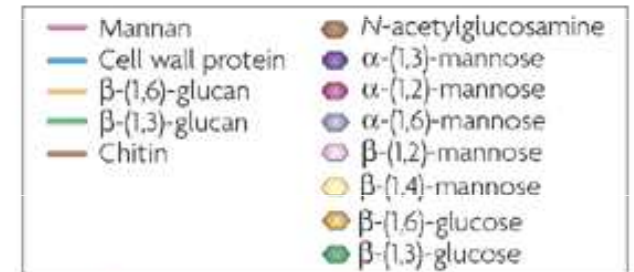
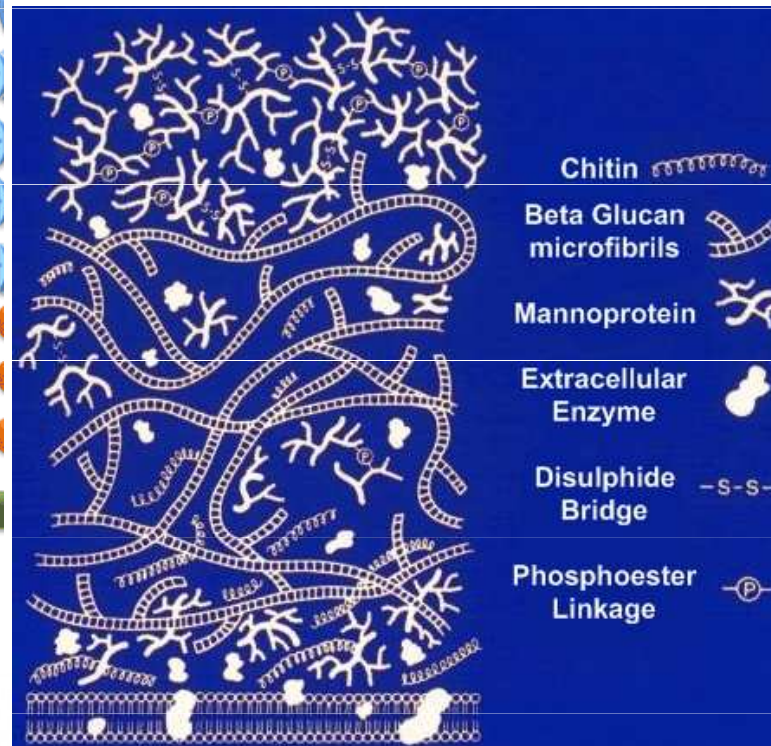
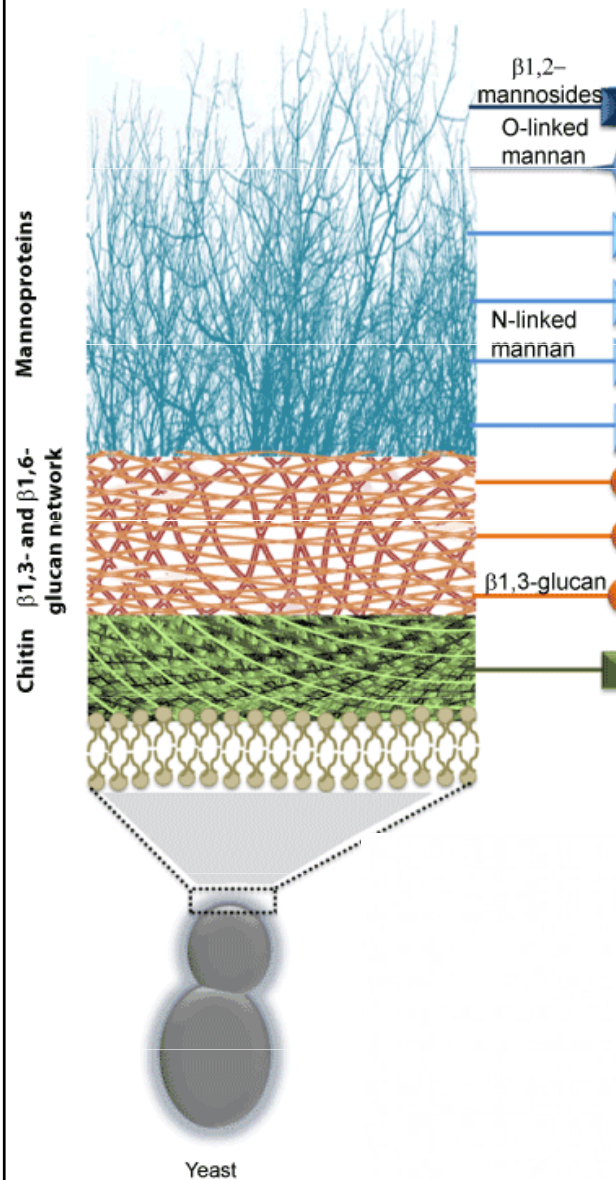


Buněčná stěna

- odlišné složení od prokaryot (bakterií)!!!!
- tvorba žizev - pučení (chitin) →
- shlukování (i s bakteriemi), rozpoznávání buněk opačného párovacího typu, přilnavost k povrchům, ...
- polysacharidy (β -1,3-glukan, β -1,6-glukan)
glykozylované bílkoviny (manoproteiny) chitin
- po odstranění vznikají protoplasty



Buněčná stěna



Flokulace kvasinek

- ovlivněna celou řadou faktorů
kmen kvasinek, médium, typ kultivace, čas, pH...
- komponenty flokulace:
buněčné stěny kvasinek
(α -mannany, proteiny - Flop = zymolektiny a Ca^{2+} ionty)
- mechanismus flokulace: „ povrchový protein (zymolektin) ční z buňky a v přítomnosti Ca^{2+} váže cukernaté zbytky na povrchu sousední buňky“
- měření schopnosti kvasinek shlukovat se
promývání buněk či přidání vápenatých iontů
přidání cukru?
- koflokulace

Flokulační test modifikovaný Helmův sedimentační test

porovnání rychlosti sedimentace buněk v přítomnosti a nepřítomnosti Ca²⁺ iontů

I část
narostlých buněk je
promyta EDTA (kyselina
ethylendiamintetraoctová,
Chelaton 2 –
vyváže ionty

*Saccharomyces
cerevisiae* RIBM 139

*Saccharomyces
pastorianus* RIBM 95

Kultivace: 25°C

a) Třepaná

b) Statická

II část
kultury je naopak
promyta roztokem
obsahujícím
Ca²⁺

Rozdíl v rychlosti sedimentace se stanoví nefelometricky –
stanovení procenta flokulace

Materiál a zařízení

- **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

- Buňky (20 ml) centrifugujeme 5000 rpm; 10 min
- Supernatant odlijeme do skleněné kádinky
- Sediment buněk resuspendujeme v destilované vodě
- Sediment naředíme na koncentraci buněk $10^8/\text{ml}$ (A= cca **1,700±0,050**); Spekol 20/620 nm)
- Ze suspenze odebereme **400 µl** ve 3 opakováních do zkumavek označených **A a B**

Suspenze ve zkumavce A

- promyjeme 1 ml destilované vody a centrifugujeme (5000 rpm/5 min)
- sediment resuspendujeme v 1 ml 50 mM EDTA a důkladně promícháme
- poté přeneseme 1 ml suspenze do 9 ml destilované vody, promícháme
- přeneseme 1 ml suspenze do 2 ml destilované vody a ihned změříme A při 600 nm (**A**)

Suspenze ve zkumavce B

- promyjeme 1 ml promývacího roztoku a centrifugujeme (5000 rpm, 5 min)
- sediment resuspendujeme v 1 ml sedimentačního roztoku, řádně promícháme
- 1 ml suspenze přeneseme do zkumavky; takto se vzorek ponechá 20 min stát v klidu
- po této době odebereme svrchních **100 µl** a přeneseme do 900 µl 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.