



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

215 861

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 17 04 81
(21) PV 2948-81

(51) Int. Cl. C 12 Q 1/04

(40) Zveřejněno 30 10 81

(45) Vydáno 01 10 84

(75)

Autor vynálezu SIGLER KAREL ing. CSc., PRAHA
OPEKAROVÁ MIROSLAVA RNDr. CSc., PRAHA
KOTYK ARNOŠT RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Způsob stanovení metabolické aktivity kvasničných buněk metabolizujících glukózu

Vynález se týká způsobu stanovení metabolické aktivity kvasničných buněk metabolizujících glukózu. Podstata je v tom, že intenzita metabolických pochodů se stanoví pomocí tzv. acidifikační schopnosti AS ze změny kyselosti vnějšího média po suspendování buněk v destilované vodě a po přidání glukózy k suspenzi. Výhodou je, že se pomocí jednoduchého a snadno re-produkovatelného postupu, t.j. pouhého odečtení kyselosti suspenze za popsanych podmínek, stanoví krátkodobé i dlouhodobé změny metabolické aktivity buněk. Lze tak stanovit vliv růstových podmínek, skladování, lyofilizace, inhibitorů, mutagenů, atd., na metabolickou aktivitu kvasinek metabolizujících glukózu. Postup je velmi jednoduchý, vyžaduje pouze standardní laboratorní vybavení a může být rutinně prováděn i nezaškolenými pracovníky. Podává okamžitou informaci o metabolickém stavu kultury.

Vynález se týká jednoduchého způsobu stanovení metabolické aktivity, popř. stupně autolýzy kvasničných buněk metabolizujících glukózu.

Při práci s kvasinkami jak v laboratorním, tak v průmyslovém měřítku (lihovarnický, droždářský, pivovarský průmysl atd.) je třeba často stanovit metabolický stav pokusných nebo produkčních kmenů. Pro stanovení se používá řady metod, (např. A.Kleinzeller, J.Málek, R.Vrba: Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii, Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1954), kvasné schopnosti (viz např. J.Dyr, V.Grégr, A.Seiler: Lihovarnství I, SNTL, Praha 1964) a dalších, které jsou poměrně pracné a zdlouhavé a nepodávají vždy celkový obraz intenzity životních pochodů v buňkách.

Vynález umožňuje doplnit, popř. nahradit tyto tradiční testy rychlým a jednoduchým stanovením metabolické aktivity buněk. Jeho podstatou je, že 3x promyté buňky se suspendují při 25–30 °C ve vodě o pH 6 a poté, po 5–10 min se přidá glukóza do konečné koncentrace 0,5–1,0 % a po dalších 10 min se odečte pH suspenze na pH-metru, načež zjištěný rozdíl mezi počátečním a konečným pH je tzv. acidifikační schopnost AS, která je přímou měrou metabolické aktivity buněk. Metoda je použitelná pro různé druhy kvasinek metabolizujících glukózu, např. pekařské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), pivovarské kvasinky (*Saccharomyces uvarum*) a další.

studium změn metabolické aktivity navozených dlouhodobým aerobním hladověním ukázalo, že buňky bohaté na zdroje energie okyselují vnější prostředí, zatímco buňky energeticky chudé (např. následkem stárnutí za nepříznivých podmínek) vnější prostředí alkalizují. Alkalizace přitom stoupá a s postupujícím ochuzováním, popř. s postupující autolýzou buněk. Tato spontánní změna kyselosti prostředí po suspendování je popisována křivkou charakteristickou pro daný druh, kmen, hustotu suspenze a pokusné podmínky.

Podobnou charakteristickou veličinou je i další změna kyselosti suspenze, která nastává po přidání glukózy k suspenzi. U energeticky bohatých buněk je tato glukózou vyvolaná změna kyselosti nižší, vzrůstá s postupujícím hladověním, a u buněk silně ochuzených (např. po cca 80 hodinách aerobního hladovění pekařských kvasinek v destilované vodě) opět klesá.

Součet obou hodnot byl nazván acidifikační schopností AS; její hodnota lineárně klesá s postupujícím hladověním buněk. Tato lineární závislost slouží jako referenční graf pro daný kmen a získá se způsobem popsáním v příkladu 1. Změny acidifikační schopnosti jsou doprovázeny změnami v intenzitě respiračních pochodů v buňkách, v obsahu makroergických sloučenin (adenosintrifosfát, dále jen ATP) a v intenzitě glykolytických (fermentativních) pochodů (viz M.A.Jimenéz, K.Sigler, L.S.Herrera, A.Kotyk: Biologie 35, 167–171, 1980 – pomocí acidifikační schopnosti lze dokonce testovat kvasničné mutanty blokové v glykolýze). Změny AS tedy odrážejí citlivě a všestranně změny metabolické aktivity buněk.

Stanovení AS vyžaduje pouze standardní laboratorní vybavení (pH-metr, skleněnou a kamolovou elektrodu, vodní lázeň temperovanou na 25 – 30 °C, laboratorní magnetickou míchačku) a chemikálie (destilovaná voda, glukóza).

Na přiloženém výkresu jsou, na obr.1 a 2 znázorněny grafy popisující stanovení metabolické aktivity kvasničných buněk kmene *Saccharomyces cerevisiae* K podle vynálezu. Na vodo-

rovné ose jsou v obou případech nanесены hodiny hladovění uvedených kvasničných buněk; na svislé ose na obr.1 jsou nanесены změny pH pozorované během této doby hladovění a u obr.2 je na levé svislé ose obsah ATP a na pravé svislé ose rychlost dýchání buněk. Na obr.1 je popsán vliv doby hladovění na intenzitu spontánní acidifikace (křivka a), glukózou indukované acidifikace (křivka b) a celkovou acidifikační schopnost (přímky I, II). Symboly o, •, • u přímek I a II jsou hodnoty získané ve třech různých pokusech. Na obr.2 je popsán vliv doby hladovění na rychlost spotřeby kyslíku buňkami (hod., $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1}(\text{mg sušiny})^{-1}$) a obsah ATP (hod., $\text{nmol ATP}(\text{mg sušiny})^{-1}$) v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* K.

Dále je uveden příklad způsobu stanovení metabolické aktivity kvasinek metabolizujících glukózu podle vynálezu.

Příklad

Kvasinky (sušené, lisované nebo sediment buněk získaný centrifugací kvasničné suspenze) se promyjí 3 x centrifugací v destilované vodě při 2000 - 3000 násobku gravitačního zrychlení, aby se odstranily zbytky média i součástí lysovaných buněk z mezibuněčného a periplasmatického prostoru, a resuspendují se v 10 ml destilované vody, jejíž teplota je udržována na 30 °C pomocí vodní lázně a jejíž kyselost je nastavena na počáteční $\text{pH} = 6,0$ pomocí HCl nebo NaOH; ve vodě je ponořena skleněná a kalomelová elektroda, připojená k pH-metru. Optimální hustota suspenze je 15 - 20 g suché váhy buněk na litr a suspenze je neustále míchána magnetickou míchačkou. Po 10 min se k suspenzi přidá roztok D-glukózy do konečné koncentrace 0,5 - 1,0 % (obvykle 0,2 ml 40 % glukózy na 10 ml); po dalších 10 min se odečte hodnota pH. Rozdíl

$$/ 6,0 - \text{pH}_{\text{konečné}} = \text{AS} / \quad (1)$$

Okyselení (snížení pH) suspenze se přitom bere jako kladná změna pH, alkalizace (zvýšení pH) jako záporná změna pH.

Postup je možno opakovat pro buňky hladovějící aerobně (suspendované ve vodě za míchání na třepačce) různou dobu. Vynesením hodnot AS proti době hladovění v hodinách se získá přímka popsaná rovnicí 2,

$$/ \text{AS} = A - Bt / \quad (2)$$

kde A je počáteční hodnota AS měřená u buněk bezprostředně po růstu, B je koeficient popisující pokles AS s časem, t je doba hladovění v hodinách. Koeficienty A a B jsou charakteristické pro daný druh, kmen a pokusné podmínky, stejně jako hodnota AS. Pro laboratorní kmen *Saccharomyces cerevisiae* K má rovnice (2) tvar (viz obr.1, přímka I)

$$/ \text{AS} = 2,47 - 0,029 t / \quad (3)$$

Když AS dosáhne hodnoty blízké nule, úbytek metabolické aktivity se zrychlí a AS se řídí rovnicí 4 (přímka II)

$$/ \text{AS} = 4,81 - 0,062 t / \quad (4)$$

(Stanoveno metodou nejmenších čtverců).

Buňky tohoto kmene, jejichž AS je v rozmezí 2,5 až 1,0 jsou v uspokojivém metabolickém stavu. Buňky s AS menším než nula jsou silně autolyzovány nebo jinak poškozeny a jejich metabolická aktivita je mizivá.

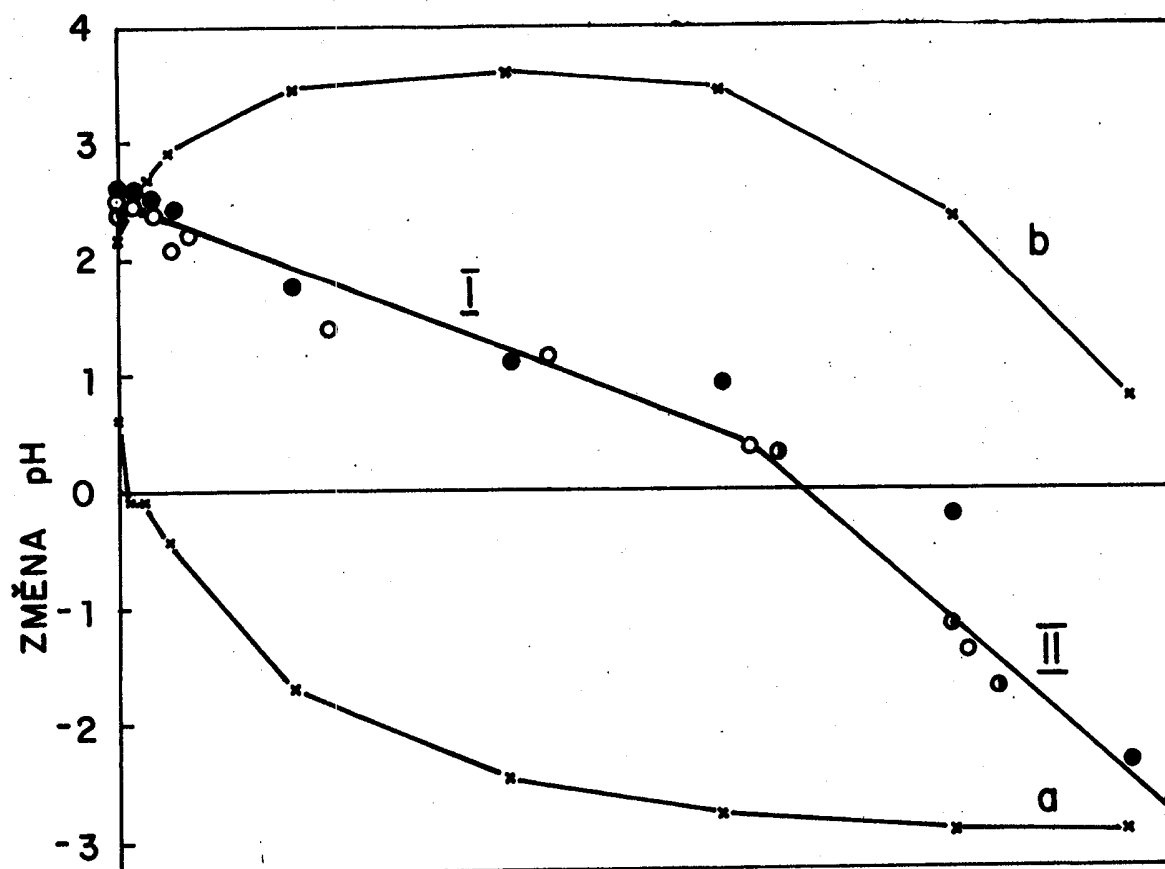
Postup popsaný v příkladu může sloužit pro řadu dalších stanovení:

- a) Srovnání AS studované suspenze bezprostředně po oddělení růstového média s referenční AS standardní suspenze může demonstrovat vliv kultivačních podmínek na metabolickou aktivitu.
- b) Srovnání časového faktoru B v rovnici (2), vypočteného např. jako rozdíl AS (počáteční) - AS (po 2P hod. hladovění) s obdobnou referenční hodnotou standardní suspenze demonstruje dlouhodobý vliv kultivačních podmínek, rychlost poklesu metabolické aktivity se stárnutím kultury.
- c) Opakované stanovení AS např. u sušených kvasinek v různých intervalech po suspendování v destilované vodě ukazuje rychlost zotavování buněk i okamžik, kdy buňky dosáhly plné metabolické aktivity (počáteční vzrůst a následná stabilizace AS). Dobu mezi suspendováním buněk a přidáním glukózy je v tomto případě možno zkrátit na 5 minut.
- d) Srovnání koeficientu A nebo koeficientu B z rovnice (2) u buněk vystavených např. vlivu inhibitorů, záření, mutagenů atd., s odpovídajícími hodnotami pro standardní intaktní buňky ukazuje stupeň poškození životních procesů.
- e) Kontrolní stanovení AS (koeficientu A nebo B) prováděné v delších intervalech u téže kultury, používané např. dlouhodobě pro průmyslové účely, poskytne první informaci o případných změnách v kultuře.

PŘEDMĚT VÝNÁLEZU

Způsob stanovení metabolické aktivity kvasničných buněk metabolizujících glukózu, vyznačený tím, že buňky promyté třikrát v destilované vodě se suspendují při 25 °C až 30 °C v destilované vodě o pH 6 a poté po 5 až 10 minutách se přidá glukóza do konečné koncentrace 0,5 až 1,0 % a po dalších 10 minutách se odečte pH suspenze na pH-metru, načež zjištěný rozdíl mezi počátečním a konečným pH je tzv. acidifikační schopnost AS, která je přímou měrou metabolické aktivity buněk.

Obr. 1



Obr. 2

