

MONITORING RŮSTU PIVNÍCH KVASINEK PŘI VÝROBĚ PIVA A POUŽITÍ READERU SYNERGY H1 PRO PŘESNÉ A KVALITNÍ STANOVENÍ KINETICKÝCH INFORMACÍ O RŮSTU KVASINKOVÝCH KULTUR

HELD P.

Applications Dept., Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA

Kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) jsou důležité k produkci celé řady potravin, jako je např. pečivo, víno a pivo. Při fermentaci pivními nebo vinnými kvasinkami se konvertuje směs cukrů, aminokyselin, peptidů, proteinů, nukleových kyselin a celé řady dalších komponentů na alkohol, kysličník uhličitý a další požadované chuťové komponenty vyráběného nápoje. Schopnost vyrábět takový produkt spolehlivě a s opakovatelnou kvalitou vyžaduje pečlivé a přesné sledování nikoliv pouze vstupních materiálů, ale i růstu kvasinek v průběhu výroby. Obdobně vývoj nových kmenů často vyžaduje monitorování jejich růstu za rozdílných podmínek. V následujícím textu je popsáno použití multidetekčního hybridního readeru Biotek Synergy H1, vybaveného inkubačním blokem s nastavitelnou teplotou a řízeným promícháváním, monitorujícím růst kvasinek za použití stanovení absorpance v 96 jamkových mikrotitračních destičkách.

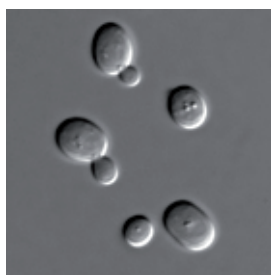
1 Úvod

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní organismy, které se rozmnožují zejména asexuálně cestou – pučením nebo dělením (obr. 1). Přestože se kvasinky mohou lišit velikostí, je jejich průměrná typická velikost 3–8 μm . Pro svoji dostupnost jsou pivní kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) velice často využívány ve výzkumu.

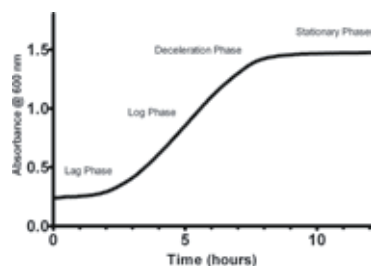
2 Fáze růstu kvasinek

V průběhu fermentace piva procházejí kvasinky 4 fázemi: lag fází, log fází, decelerací a ustálením. V průběhu lag fáze nedochází k žádnému růstu, nově přidané kvasinky se adaptují v novém prostředí. Následuje log fáze, kdy dochází k prudkému nárůstu velikosti kvasinek a k jejich dělení. V poměru k počtu buněk je v této fázi přítomen nadbytek živin. Směrnice růstu jejich počtu v této fázi představuje první kinetickou část. Tak jak narůstá počet buněk, tak se zpomaluje jejich zvětšování a nastává jejich výrazná saturace. Eventuálně dosáhnou kvasinky stacionární fáze, kdy již nedochází k nárůstu celkové biomasy z důvodu vysoké koncentrace buněk (hlušiny) nebo celkovému spotřebování substrátu (obr. 2).

Obr. 1 – *Saccharomyces cerevisiae* pod DIC mikroskopem



Obr. 2 – Typical Yeast Growth Curve



Sledování průběhu buněčného dělení umožňuje selekci různých mutantů vykazujících požadované růstové charakteristiky. Jednotliví mutanti se rozmnožují asexuálně z jedné původní buňky. Monitorování nárůstu biomasy za specifických kultivačních podmínek je jednou z metod výběru kvasinkového kmene.

Pro měření nárůstu biomasy jsme použili hybridní reader Biotek – Synergy H1, který umožňuje udržování nastavené teploty za kontinuálního míchání a proměřování absorpance, jako ukazatele buněčného růstu a dělení za rozdílných podmínek.

3 Materiál a metody

Od firmy Sigma Aldrich jsme použili YPD, chlorid sodný, monobasický a dibasický fosfát a etanol. YPD bylo přímo připraveno a sterilizováno v autoklávu. Dále jsme použili sterilní mikrotitrační destičky a rozdílné kmeny kvasinek jsme získali od fy Wyeast (Odell).

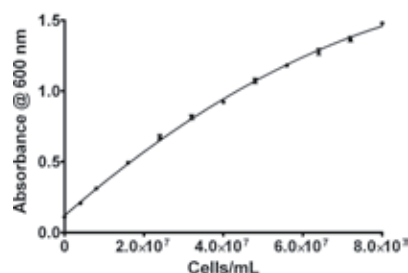
Veškeré následující pokusy byly provedeny stejným způsobem: kultury kvasinek (50 ml) v 250 ml Erlenmayerových baňkách byly třepány při rychlosti 125 ot./min přes noc při 30 °C. Před růstovým pokusem bylo 7,5 ml čerstvého mYPD média zaočkováno 150 μl této kultury. Získaný roztok byl napipetován do mikrotitračních destiček a za kontinuálního orbitálního míchání bylo nastaveno měření v intervalu 2 minut. Míchání bylo nastaveno na pomalý režim s amplitudou 559 (1 mm). Teplota v readeru byla nastavena na 30 °C. Nastavená vlnová délka byla 600 nm [2] a veškerá data vyhodnocoval uživatelský SW GEN5.

4 Výsledky

4.1 Vliv na počet buněk

Nechali jsme přes noc kultivovat linii kvasinek „2000 Budvar lager“. Následně jsme napipetovali alikvóty po 200 μl z každého ředění do 8 jamek na mikrotitrační destičce jako kontroly a změřili jejich absorpaci při vlnové délce 600 nm. Výsledky měření demonstrují nárůst absorpance úměrný počtu buněk (obr. 3).

Obr. 3 – Cell Number vs absorbance

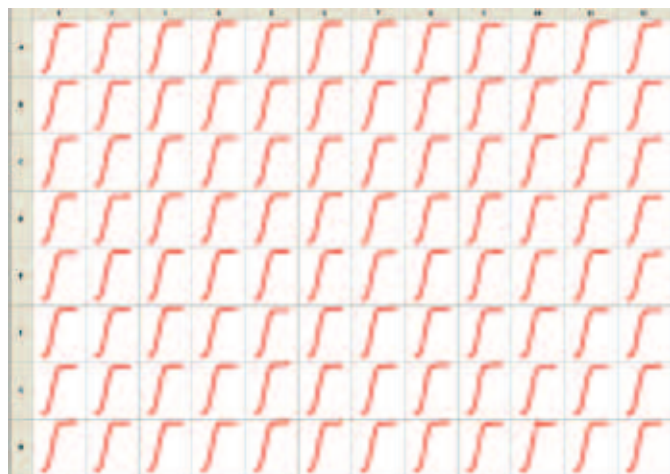


4.2 Rovnoměrnost růstu

Abychom mohli správně vyhodnocovat růst buněk, potřebujeme mít dostatek stejných vzorků, což mikrotitrační destička snadno umožňuje. Po napipetování 200 μl kmene kvasinek „2000 Budvar lager“ ředěného v YPD médiu do všech jamek mikrotitrační des-

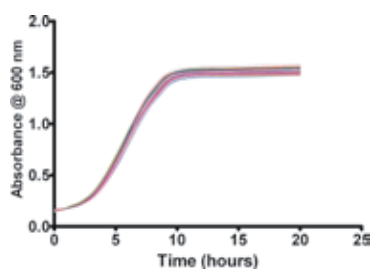
tičky jsme obdrželi odpovídající výsledek (obr. 4). V této kultuře pak průměrná hodnota počáteční absorbance při 600 nm byla 0,156 s hodnotou CV 2,6 %. Po ukončení pokusu po 20 hodinách byla průměrná hodnota absorbance 1,516 s variačním koeficientem CV 1,5 %. Jednotlivé řádky i sloupce vykazovaly podobné hodnoty, jak pro počáteční, tak i pro finální hodnotu absorbance.

Obr. 4 – Growth uniformity at 30C



Pokud jsme jednotlivé jamky podrobněji prozkoumali, zjistili jsme velmi malé rozdíly, a to nejenom v počátečních a koncových hodnotách absorbance, ale i mezi těmito body, jak ukazuje obr. 5. Průměrná hodnota log fáze ze všech 96 vzorků byla 0,368 OD s CV 2,48 %. Získané údaje z log fáze ukazují, že jsou vhodná pro porovnání růstu kvasinek za rozdílných podmínek.

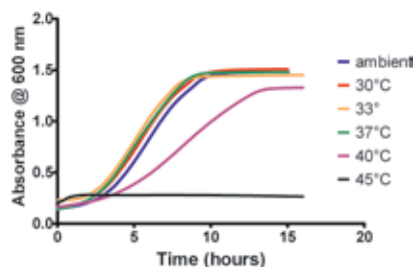
Obr. 5 – well comparison-new-new 11_17_2010



4.3 Vliv teploty

Teplota má zřetelný vliv na růst kvasinek. Umístili jsme 4 rozdílné kultury *Saccharomyces cerevisiae* po 22 stejných vzorcích do šesti 96 jamkových destiček. Každá destička obsahovala všechny 4 kmenové kultury a dále jsme vzali 8 kontrolních jamek s čistým YPD médiem. Následně jsme měřili kinetiku v destičkách v readeru při různě nastavených teplotách.

Obr. 6 – Temperature vs Strain 2000 Budvar lager

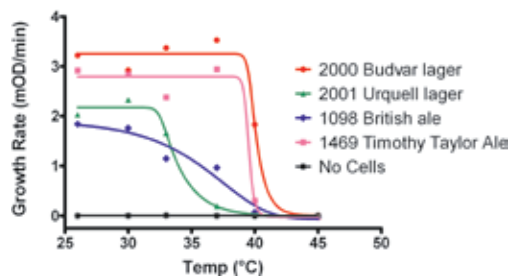


Jak je patrné z obr.6, tak se nárůst kvasinky „Budvar lager“ prakticky nezměnil v rozsahu teplot od pokojové teploty do 37 °C. Při teplotě 40 °C byla lag fáze poněkud delší, ale co je důležitější, gradient růstu se zmenšil a počet buněk v ustáleném stavu byl také nižší v porovnání s hodnotami získanými při nižší teplotě.

Na tomto obrázku je patrný velmi malý nárůst při teplotě 45 °C. Obdobné výsledky byly získány u všech 4 měřených kmenů.

Z naměřených hodnot gradientu nárůstu v průběhu log fáze u všech kmenů byl vynesena graf (obr. 7), ze kterého je patrná signifikantní závislost na teplotě pro všechny sledované druhy. Dva z nich mají rychlejší růst pod 37 °C a další 2 vzorky měly větší toleranci na teplotu, nicméně kritická hranice byla 40 °C.

Obr. 7 – Temp vs Growth Rate

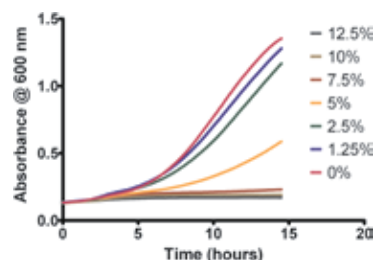


4.4 Tolerance k etanolu

Hlavními produkty fermentace cukrů kvasinkami jsou etanol a kyslíčnan uhlíčitý. Množství těchto produktů je významné a má vliv na buněčný růst.

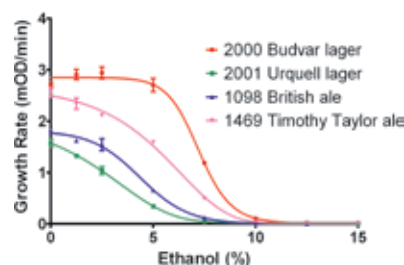
Pro ověření tohoto jevu jsme opět použili 4 rozdílné kultury *Saccharomyces cerevisiae* po 22 vzorcích, které jsme napipetovali po 150 µl v 96 jamkové destičce. Dále jsme přidali 50 µl roztoku YPD média s etanolem v různých koncentracích. Následně měření jsme pak prováděli dvakrát ve vzorcích u každé jamky. Z naměřených hodnot bylo zřejmé, že etanol je výrazným inhibitorem růstu. Například kmen 2001 Urquell lager byl poměrně tolerantní do koncentrace <2,5 %. Nad tuto hodnotu koncentrace etanolu je již zřetelný pokles růstu buněčné kultury (obr. 8).

Obr. 8 – Ethanol vs 2001 Urquell lager



Obdobné výsledky jsme pozorovali při porovnávání rychlosti růstu u log fáze i u ostatních kmenů. Kmen Budvar 2000 lager byl nejvíce tolerantní z testovaných kmenů, kde se pokles růstu dostavil až nad 5 % etanolu (obr. 9).

Obr. 9 – Ethanol vs Growth Rate

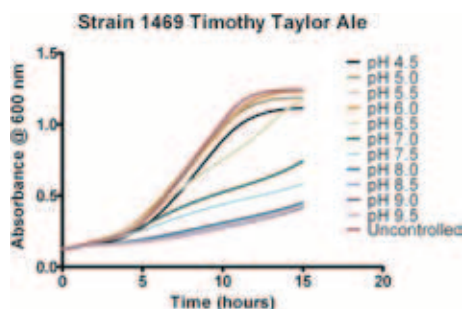


4.5 Citlivost na pH

Abychom ověřili vliv pH na buněčný růst, použili jsme opět stejné schema jako v předchozím pokusu a přidali jsme 50 µl fosfátu 50 mM v rozsahu pH od 4,5 do 9,5. Opět po 2 replikátech na každou koncentraci pH. Buňky mají přirozenou náklonnost lépe růst v kyselém prostředí oproti zásaditému. V rozpětí pH od 4,5 do 6,0 byl rozdíl v růstu těžko rozpoznatelný (obr. 10). Při pH 6,5 rostou buňky pomaleji, ale dosáhnou stejné koncentrace ve stabilním stavu, i když o cca 3–4 hodiny déle. Při pH 7,0 a více se rychlost růstu dramaticky zpomalí a tento vliv se projeví i na počtu buněk ve stabilním stavu.

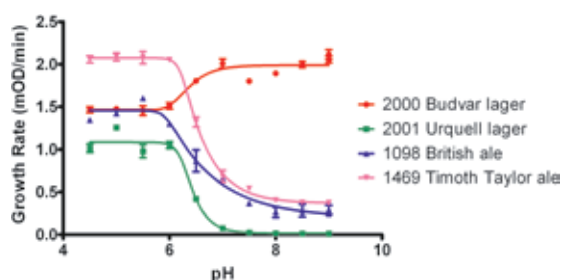
Dokončení na další straně

Obr. 10 – Effect of pH on 1469 Timothy Taylor ale



Výsledky u ostatních kmenů byly odlišné. Kmeny 2001 a 1098 měly podobný průběh jako kmen 1469, zatímco kmen 2000 měl nárůst v alkalické oblasti (obr. 11). Nicméně lze odhadnout, že pro většinu kvasinkových kmenů bude vliv zásaditého prostředí inhibiční.

Obr. 11 – pH vs Growth Rate



4.6 Vliv soli

Ionty obsažené ve veřejných zdrojích vody mají rovněž vliv na růst buněk. Zatímco obecně v nápojích přítomnost těchto „nečistot“ – iontů ovlivňuje specifické chutě nápoje, při kultivacích mohou omezit růst kvasinek.

Růst kvasinkových buněk vykazuje poměrně velkou toleranci ke zvyšující se koncentraci NaCl. Tento jev jsme potvrdili obdobným pokusem jako v předchozích případech, kdy jsme opětovně použili naše 4 kultury, které naředěné byly napipetovány po 150 μ l do mikrotitrační destičky po 22 vzorcích, do kterých následně bylo přidáno 50 μ l různě koncentrovaného roztoku NaCl v rozsahu od 0–1250 mM.

Kmen 2001 Urquell Lager vykazoval do koncentrace 125 mM velmi malé změny v růstu. Při koncentracích soli nad 250 mM do 375 mM byl patrný pokles nárůstu z hlediska rychlosti, ale celkový počet buněk po 20 hodinách byl téměř stejný. Výrazný vliv na pokles růstu měly až koncentrace nad 500 mM, jak ukazuje (obr. 12).

Vcelku očekávaně vykazovaly všechny 4 kmeny pokles růstu v log fázi v závislosti na rostoucí hodnotě koncentrace NaCl (obr. 13). Řada pokusů potvrdila, že kmen 2000 Budvar měl nejrychlejší růst při koncentracích pod 500 mM.

5 Závěr

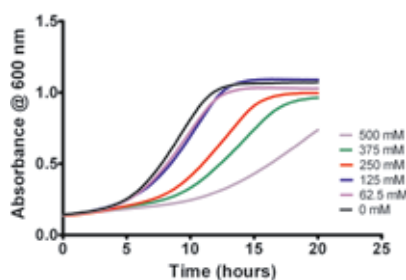
Zde použité kmeny byly vybrány po letech testování na specifické parametry požadované při fermentaci piva. Kromě parametru rychlosti růstu buněk byly dále vybírány podle čirosti, sedimentace, vločkování, koncentrace alkoholu, chutě a vůně.

Historicky – kmeny používané v severní Evropě při výrobě piva fermentují při nižších teplotách na rozdíl např. od britských. Kmen 2000 Budvar Lager zase vykazuje větší odolnost vůči vyšším teplotám. Obdobně kmen 1469 Timothy Taylor měl větší odolnost vůči solím obsaženým ve vodě, což se více vyskytuje v tvrdých vodách v Anglii.

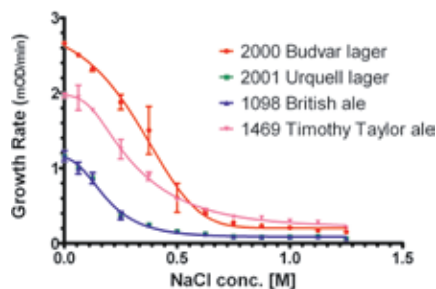
Shodné výsledky všech kinetických měření byly dány několika faktory. Jednak možností zajistit v průběhu měření stabilní teplotu na celé mikrotitrační destičce, což systém řízení 4 zónové teplotní regulace u readeru Synergy H1 plně umožňuje.

Dalším důležitým momentem bylo omezení odparu z destiček,

Obr. 12 – Salt effect on 2001 Urquell lager



Obr. 13 – Salt effect on Growth Rate



Obr. 14 – Multidetekční hybridní reader Biotek Synergy H1



zejména při dlouhých kinetických měřeních. Museli jsme použít adhezivní fólii na uzavření destiček, abychom zabránili odparu. Za důležité považujeme také použití správného způsobu třepání. Zdá se nezbytné použít orbitální pohyb, abychom udrželi buňky v suspenzi. To je důležité zejména ve stabilní fázi, kdy dochází k vločkování kvasinek. Multidetekční hybridní reader Biotek Synergy H1 má širokou škálu možností jak nastavit míchací módy od lineárního po orbitální, celkem v 8 stupních. Každý stupeň může mít definovanou svoji rychlost a amplitudu podle požadavků lišících se dle měřeného materiálu.

Naměřené hodnoty byly následně zpracovány pomocí integrovaného uživatelského SW GEN 5, který současně automaticky vyhodnotil průměrnou hodnotu růstu buněk nebo jeho střední hodnotu z log fáze kinetického měření a poskytl grafické i statistické průběhy z kinetických měření.

Literatura

- [1] Zdroj: <http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>
- [2] Stubbings, W.J., Bostock, J.M., Ingham, E., and Chopra, I., Assessment of a microplate method for determining the post-antibiotic effect in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54(1): 139–143.

Pro CHEMAGAZÍN zkrátil a upravil Ing. Martin Udavský, Dialab spol. s r.o., dodavatel multidetekčního hybridního readeru Biotek Synergy H1.



Výkonná promývačka
mikrotitračních destiček
s volitelnou ultrazvukovou
lázní.



Multifunkční reader
Synergy 4, měření
absorbance, fluorescence,
luminiscence. TRF, FRET,
FP, dichroická zrcadla.



Spektrofotometrický
reader, rozsah od 200
nm do 999 nm, inkubace,
třesení + uživatelský SW
v ceně.



Univerzální dispensor,
nastavitelné objemy
od 1 μ l až 10 ml.

 **LABOREXPO**
Stánek č. B10

DIALAB spol. s r.o.
- výhradní zástupce firmy Biotek pro ČR
Náměstí osvoboditelů 1, 153 00 Praha 5 – Radotín

Tel./fax: 257 910 260, 602 302 159
E-mail: office@dialab.cz, www.dialab.cz


www.dialab.cz