

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Marie Kodedová

Studium sedimentace a flokulace vybraných kmenů kvasnic metodami komplexní turbidimetrické analýzy

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Petr Sladký, CSc.

Konzultanti: Doc. RNDr. Blanka Janderová, CSc.

Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

*Studijní program: Fyzika, Biofyzika a chemická fyzika,
Biofyzika*

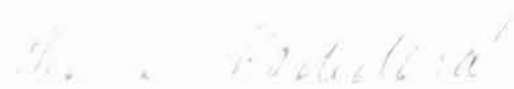
Ráda bych poděkovala doc. Ing. Petru Sladkému, CSc. za odborné vedení diplomové práce a Mgr. Petru Gabrielovi za přátelskou podporu. Dále patří mé díky doc. RNDr. Blance Janderové, CSc. za kvalifikované rady v oblasti biologie kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, doc. RNDr. Jaromíru Pláškoví, CSc. za umožnění měření velikosti kvasinek pod mikroskopem a prof. Josefu Štěpánkovi, CSc. za podnětné rady při dokončování práce. Taktéž děkuji všem pracovníkům VÚPS, kteří přispěli k přípravě vzorků pro acidifikační testy a Ing. Karlu Siglerovi, DrSc. za zprostředkování spolupráce s VÚPS.

Většina výsledků diplomové práce byla naměřena pomocí zákaloměrů na Oddělení opto-termální spektroskopie Katedry chemické fyziky a optiky MFF UK, tímto bych chtěla vyjádřit poděkování všem pracovníkům tohoto oddělení, kteří se podíleli na vývoji a konstrukci zákaloměrů. Bez těchto přístrojů by nebylo možné tuto práci zrealizovat.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 15. dubna 2006

Marie Kodedová



Obsah

1. Úvod	5
2. Přehled současných poznatků o flokulaci a vitalitě kvasinek	6
2.1. Kvasinky	6
2.1.1. Růstová křivka	6
2.1.2. Struktura kvasinkové stěny	7
2.2. Flokulace	8
2.2.1. Historický vývoj metod měření flokulace	9
2.2.2. Genetické pozadí flokulace	9
2.2.3. Princip flokulace	10
2.2.4. Faktory ovlivňující flokulaci	11
2.2.5. Selektivní inhibice vazebné aktivity jako nástroj poznání flokulace	13
2.2.6. Sila a energie vazby	13
2.2.7. Předčasná flokulace a vliv kvašení v CKT na kvalitu kvasnic	14
2.2.8. Přehled metod měření flokulace	15
2.3. Vitalita a viabilita kvasnic	18
2.3.1. Měření životaschopnosti buněk pomocí barviv	18
2.3.2. Princip acidifikačního testu	19
2.3.3. Vítaltitrace a jiná měření vitality kvasnic založená na změně pH média	22
3. Experimentální část	24
3.1. Bližší seznámení se zkoumanými kmeny kvasinek <i>S. cerevisiae</i>	24
3.2. Měřicí aparatury	27
3.2.1. Aparatura pro měření sedimentace a flokulace kvasinek	27
3.2.2. Aparatura pro měření acidifikačních testů	28
3.3. Příprava vzorků a metody měření	29
4. Výsledky měření	32
4.1. Sedimentace kvasnic	32
4.2. Flokulace kvasinek	49
4.3. Acidifikační testy	54
5. Závěr	60
6. Seznam literatury	62

Název práce: *Studium sedimentace a flokulace vybraných kmenů kvasnic metodami komplexní turbidimetrické analýzy*

Autor: *Marie Kodedová*

Katedra (ústav): *Katedra chemické fyziky a optiky*

Vedoucí diplomové práce: *Doc. Ing. Petr Sladký, CSc., UK MFF*

e-mail vedoucího: *Petr.Sladky@mff.cuni.cz*

Abstrakt:

Flokulace je vratný jev, při kterém kvasinky vytvářejí shluky a urychlují tak svou sedimentaci na konci hlavního kvašení piva. Námí vyvinutý jednoduchý flokulační test by měl napomoci k lepšímu poznání a diagnostice případných negativních změn tohoto procesu. Tento flokulační test umožňuje sledovat průběh flokulace od samého počátku, kdy jsou splněny všechny podmínky flokulace – přítomnost Ca^{2+} v médiu i dostatek srážek mezi buňkami, až po sedimentaci zbylých volných buněk. Navíc zvolený druh míchání dovoluje jasně rozdělit flokulační test na část, v které se postupně formují shluky kvasinek, dále na krátký časový úsek, během něhož se shluky kvasinek usadí, a závěrečnou část, kdy sedimentují jednotlivé buňky.

Druhá část práce byla věnována zkoumání sedimentace a vitality deseti kmenů pivovarských kvasnic (3, 6, 8, 9, 11, 12, 26, 32, 95 a 98). Na základě konfrontace měření velikosti buněk pod mikroskopem s časovým vývojem poklesu zákalu suspenze kvasnic během sedimentace jsme sestavili křivku, pomocí níž lze určovat velikost buněk. Z tvaru derivace sedimentační křivky jsme schopni rozhodnout, zda suspenze obsahuje pučící buňky či nikoliv.

Klíčová slova: *sedimentace, flokulace, vitalita, Saccharomyces cerevisiae*

Title: *A study of sedimentation and flocculation of selected yeast strains by methods of complex turbidimetric analysis*

Author: *Marie Kodedová*

Department: *Department of Chemical Physics and Optics*

Supervisor: *Doc. Ing. Petr Sladký, CSc.*

Supervisor's e-mail address: *Petr.Sladky@mff.cuni.cz*

Abstract:

Flocculation is a reversible phenomenon, wherein yeast cells adhere in clumps and accelerate their sediment at the final stage of the main fermentation. We have developed a simple flocculation test, which would improve understanding of this process. The flocculation test enables us to observe the course of flocculation from the very beginning, when all flocculation conditions are satisfied – presence of calcium in medium and sufficient number of collisions between cells, to the sedimentation of remaining free cells. Moreover, selected kind of stirring allows us to separate the flocculation test into three parts: in the first one yeast cells gradually form clumps, then comes a short part, during which yeast clumps sediment rapidly, and in the final part individual cells settle down.

Second part of the diploma thesis is devoted to study of sedimentation and vitality of ten brewery yeast strains (3, 6, 8, 9, 11, 12, 26, 32, 95 and 98). On the basis of confrontation of microscopic measurements of cell sizes with time evolutions of haze of yeast suspensions during their sedimentation we have created a curve, which can be used to determine size of cells. We are able to decide according to the shape of the first derivative of a sedimentation curve, whether a yeast sample contains budding cells or not.

Keywords: *sedimentation, flocculation, acidification, Saccharomyces cerevisiae*

1. Úvod

Diplomová práce je zaměřena na vývoj nových metod kontroly kvality pivovarských kvasnic při kvašení v cylindro-kónických tancích. K tomuto účelu byly použity zákaloměry sestrojované v Oddělení optotermální spektroskopie Katedry chemické fyziky a optiky MFF UK. Pracovníci tohoto oddělení se již více než deset let věnují výzkumu a vývoji nových turbidimetrických metod i přístrojů, jež nalézají široké uplatnění v pivovarském průmyslu (Gabriel a kol. (1994), Sladký a kol. (1998), Sladký a Cisařová (1999), Sladký a kol. (2001), Sladký a Dienstbier (2001 a 2003), Dienstbier a kol. (2005)). Tato práce ověřila, že zákaloměry mohou být úspěšně využity k měření sedimentačně flokulačních charakteristik i vitality kvasinek a nahradit tak drahé přístroje zahraniční výroby.

Stále častěji české pivovary opouštějí tradiční způsoby výroby piva v otevřených kvasných kádích ve spilce pivovaru a ve snaze zvýšit jeho produkci zavádějí nové technologie, mezi něž patří kvašení v uzavřených kvasných nádobách tzv. cylindro-kónických tancích (CKT), které obvykle pojmu 2000 až 5000 hl mladiny. V CKT dochází v průběhu kvašení ke složitým reologickým a biochemickým procesům, jež ovlivňují sedimentaci a flokulaci kvasinek na konci kvašení.

Po skončení fermentace je nutné oddělit kvasinky od mladého piva. Při takto velkých objemech nelze použít centrifugaci a je tedy nutné spoléhat na matku přírodu. Ta obdařila pivovarské kvasinky schopností shlukovat se, tj. flokulovat. Flokulaci se výrazně zvětší velikost „částic“ a urychlí se tak sedimentace kvasinek. Načasování a rozsah flokulace na konci hlavního kvašení jsou zvláště důležité pro piva plzeňského typu (ležáky). Negativní změny ve flokulaci kvasnic nepříznivě ovlivňují proces oddělování kvasnic od mladého piva i jeho vlastnosti. Kvasinky se po oddělení od mladého piva promyjí a pakliže si zachovají svou schopnost flokulovat a dobrou vitalitu, mohou být opětovně použity ke kvašení nové dávky mladiny v CKT.

Metoda popsaná v diplomové práci, jež se Vám právě dostala do rukou, by měla napomoci řešit některé problémy se ztrátou flokulence, a tím zabránit škodám na českém pokladu jakým je české pivo. První část práce jsme proto zasvětili přehledu současných poznatků o flokulaci a vitalitě kvasnic, pozornost jsme mimo jiné věnovali i vlivu kvašení v CKT na tyto dva procesy. Taktéž jsme uvedli řadu alternativních metodických přístupů k dané problematice.

Dalším úkolem této práce bylo porovnat sedimentaci a vitalitu deseti kmenů pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (3, 6, 8, 9, 11, 12, 26, 32, 95 a 98).

2. Přehled současných poznatků o flokulaci a vitalitě kvasinek

2.1. Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy patřící mezi vyšší houby. Mikroorganismy zahrnované mezi kvasinky lze charakterizovat tím, že jde většinou o jednobuněčné organismy rozmnožující se převážně pučením a zpracovávající zdroje uhlíku kvašením. Tato charakteristika však neplatí striktně. Některé kvasinky mohou za určitých podmínek vytvářet mycelia, pak mohou tedy existovat i ve vícebuněčné formě. Většina kvasinek se rozmnožuje pučením, ovšem při růstu ve formě mycelia dochází k přehrádečnému dělení. Existují také kvasinky, které navzdory svému názvu nejsou schopny fermentace a zdroje uhlíku zpracovávají výhradně oxidativními způsoby.

Do dnešních dnů se dochovaly doklady o tom, že již starověcí Sumerové, Egypťané a Babylóňané před 6000 – 8000 lety vyráběli nápoje podobné dnešnímu pívu a vínu. Poprvé však byly kvasinky spatřeny až A. van Leeuwenhoekem kolem roku 1680 jako malé kuličky v pivě. V letech 1866 a 1876 publikoval L. Pasteur práce, v nichž dokázal aktivní účast mikroorganismů na kvasném procesu. Nejznámější kvasinka však dostala svoje jméno už v roce 1837, kdy ji Theodor Schwann označil jako Zuckerpilz (cukernou houbu), od čehož bylo odvozeno i latinské pojmenování rodu *Saccharomyces* (z řeckého saccharos = cukr, mykes = houba). První čisté kultury *S. cerevisiae* pak byly izolovány právě z piva E. Ch. Hansenem a z vína Müller-Thurgauem v letech 1883 – 1890.

V systému hub (*Fungi*) patří kvasinky mezi *Eumycota* – vlastní houby, a to do dvou velkých pododdělení: *Ascomycotina* – vřeckovýtrusé houby a *Basidiomycotina* – stopkovýtrusé houby. Rod *Saccharomyces* je zařazován v rámci vřeckovýtrusných hub do *Endomycetes*.

Dostupnost kyslíku je nezbytná pro množení všech kvasinek. Většina kvasinek patří mezi fakultativně anaerobní, přičemž při anaerobní kultivaci jsou vyžadována alespoň stopová množství kyslíku nezbytná pro biosyntézu některých životně důležitých látek. Fakultativně anaerobní kvasinky lze rozdělit do dvou skupin, převážná část z nich se řadí mezi tzv. respirativní typy kvasinek, u nichž převládá energeticky výhodnější respirace nad fermentací. *Saccharomyces cerevisiae* je zástupcem tzv. fermentativního typu kvasinek, tudíž i v aerobních podmínkách převážně fermentuje, respirace při kultivaci na glukose představuje jen asi 10 % uhlíkatého metabolismu, při kultivaci na jiných cukrech se podíl respirace zvyšuje.

Kvasinky *S. cerevisiae* vytvářejí buňky ve tvaru rotačního elipsoidu a obvykle dosahují v delším rozměru délky 3 – 15 μm . Velikost buněk roste i s ploeditou, přičemž pivovarské kmeny bývají diploidní až polyploidní (Janderová a Bendová, 1999).

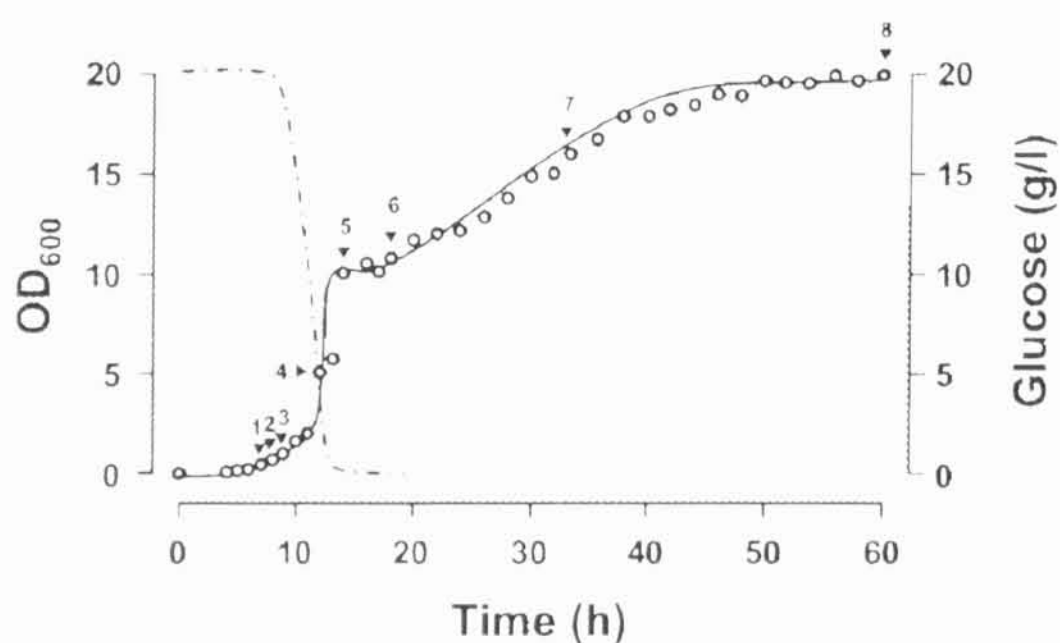
2.1.1. Růstová křivka

Růstová křivka (obr.2-1) zobrazuje časový vývoj kultury, pěstované v tekutém médiu bez přidávání dalších živin. Vývoj kvasinkové kultury je monitorován měřením optické hustoty suspenze (OD_{600}), jež odráží počet buněk. Růstovou křivku můžeme rozdělit do několika fází. Během lag fáze (latentní fáze) se kvasinky přizpůsobují novému životnímu prostředí, získávají energii pro pučení a jejich počet zůstává

konstantní. Ke konci lag fáze v období tzv. fyziologické mladosti kultura obsahuje největší množství buněk s malými pupeny. Nejbujnější růst nastává v exponenciální (logaritmické) fázi. Buňky se překotně dělí, aniž by dosahovaly velikosti původních buněk.

Jako zdroj uhlíku mohou kvasinky využívat také ethanol, poté co byla glukosa vyčerpána a v médiu se nahromadil ethanol jako metabolický produkt. Růstová křivka těchto kvasinek pak vykazuje diauxický charakter. Diauxický posun (fáze 5 na obr.2-1) odpovídá období, kdy se kvasinky přizpůsobují novému zdroji uhlíku.

Závěrečným stádiem kultury je stacionární fáze. V rané stacionární fázi buňky zvětšují svůj objem, avšak růst buněk se postupně zpomaluje, až se zcela zastaví a následuje rychlé odumírání buněk.



Obr.2-1 Růstová křivka *Saccharomyces cerevisiae* v YPD médiu (1 % (w/v) kvasinkový extrakt, 2 % (w/v) pepton, 2 % glukosa). Kvasinky z pozdní exponenciální fáze byly rozptýleny v čerstvém YPD médiu (počáteční OD₆₀₀ 0,05) a inkubovány při teplotě 30°C a třepání 125 rev./min. Kultura byla sledována měřením optické hustoty při vlnové délce 600 nm OD₆₀₀. Růstové fáze: latentní, 1 – 2 raná exponenciální, 3 střední exponenciální, 4 pozdní exponenciální fáze, 5 diauxický posun, 6 – 7 post-diauxický růst a 8 stacionární fáze růstu. Koncentrace glukózy poklesla na počátku diauxického posunu na 0,1 %. Převzato z Monje-Casas a kol. (2004).

2.1.2. Struktura kvasinkové stěny

Povrch kvasinkové buňky tvoří plasmatická membrána s buněčnou stěnou a eventuálně pouzdrém, vnitrobuněčný obsah je rozdělen membránami do různých organel. Chemické složení, struktura a funkce buněčných komponent jsou podobné ostatním eukaryotním buňkám, proto se podrobněji zmíníme pouze o těch charakteristikách, které jsou důležité pro pochopení procesů studovaných v této diplomové práci.

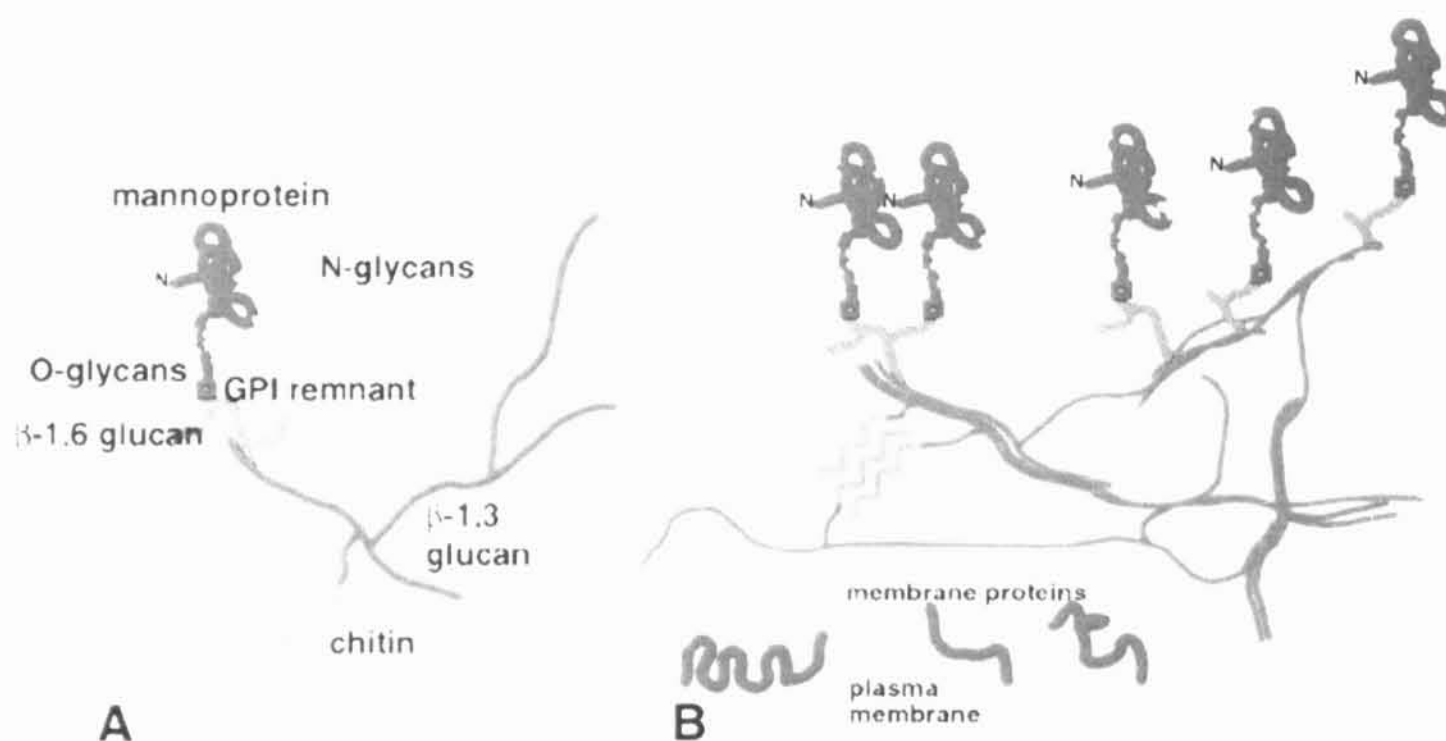
Kvasinková buněčná stěna je struktura o tloušťce 150 – 400 nm a může představovat až 30 % suché váhy buňky. Jejími hlavními komponentami jsou polysacharidy a proteiny. Přibližně 60 % váhy buněčné stěny tvoří polymery glukózy (glukany), zhruba 40 % glykosylované proteiny (mananproteiny) a asi 2 % polymer N-acetylglukosaminu (chitin). Zastoupení jednotlivých polymerů i architekturu stěny ovlivňují kultivační podmínky či růstová fáze a liší se i u mateřských a dceřiných buněk. Všechny uvedené části buněčné stěny *S. cerevisiae* jsou navzájem spojeny kovalentními vazbami.

Glukany (obr.2-2) vytvářejí dvě formy, fibrilární β -1,3-glukan a amorfní β -1,6-glukan. Fibrilární glukan se vyskytuje ve vnitřní vrstvě buněčné stěny přiléhající

k plasmatické membráně, amorfni glukán převládá ve střední vrstvě stěny. Za udržení tvaru buňky jsou zodpovědné právě glukany.

Mananproteiny hrají spolu s glukany strukturální roli ve střední vrstvě buněčné stěny, ale především tvoří vnější vrstvu stěny, která má kartáčkovitý vzhled. Ten způsobují manosylové řetězce, a to kratší, jde-li o O-manosylované proteiny, či delší v případě N-manosylovaných proteinů. Delší řetězce jsou zpravidla větvené, s α -1,6-vazbami v lineární části řetězce. Lineární část je tvořena tzv. core se dvěma molekulami N-acetylglukosaminu a 12 až 15 manosylovými jednotkami a tzv. vnějším řetězcem s asi 70 molekulami manosy. Vnější řetězec je taktéž větvený, ve větvení jsou obsaženy jednotky manobiosy, manotriosy a manotetraosy s α -1,2 a α -1,3-vazbami.

Chitin není v buněčné stěně rozložen rovnoměrně, je lokalizován zejména v oblasti jizev, které zůstávají na buněčné stěně po oddělení pupenu. A protože jizev v průběhu života buňky přibývá, přibývá i chitinu (Janderová a Bendová, 1999).



Obr.2-2 Vztahy mezi součástmi buněčné stěny *S. cerevisiae*. (A) Základní jednotka s jednotlivými komponentami. Polypeptid je obarven modře, oligosacharidy jsou vyznačeny žlutě. Zobrazeno je pouze několik větviček bodů glukánů. Chitin se může vázat také na β -1,6-glukan. (B) Spojení základních jednotek tvoří buněčnou stěnu. β -1,3-glukanové řetězce jsou spleteny do trojitých šroubovic a chitin je zachycen jako krystalová mikrodoména. Převzato z Lipke a Ovalle (1998).

2.2. Flokulace

Stewart a Russell (1981) popsali flokulaci jako vratný jev, při kterém buňky vytvářejí shluky a buď rychle sedimentují, nebo jsou vynášeny k povrchu média, v kterém jsou rozptýleny. Pro tento proces se používají také termíny aglutinace, vločkování či shlukování kvasnic. Schopnost kvasinkových buněk flokulovat při optimálních podmínkách, které jsou určeny geneticky a fyziologicky, se nazývá flokulence (van der Aar a kol., 1993).

Flokulace představuje snadný a přirozený způsob oddělení kvasnic od mladého piva. Načasování a rozsah flokulace na konci hlavního kvašení jsou zvláště důležité pro piva plzeňského typu (ležáky). Množství kvasnic zůstávajících v pivu rozhoduje o produkci diacetylu a acetaldehydu během procesu zrání. Negativní změny v aglutinaci kvasnic nepříznivě ovlivňují proces oddělování kvasnic od mladého piva i jeho vlastnosti (van der Aar, 1996).

2.2.1. Historický vývoj metod měření flokulace

Flokulace se těší velkému zájmu vědců, v posledních 30 letech bylo publikováno ročně 10 až 15 článků s touto tematikou. Např. mezi lety 1990 a 1995 21 autorů vytvořilo 17 různých metod popsanych ve 30 člancích. Přesto neexistuje mezinárodně uznávaná metoda pro určení flokulace. Od roku 1985 bylo prozkoumáno přes sto kmenů kvasnic, ale často byl nedostatečně popsán jejich charakter a genetická informace, tj. chyběl popis, zda byl kmen určen k výrobě spodně či svrchně kvašeného piva, dále jeho flokulační genotyp nebo fenotyp (Speers a Ritcey, 1995).

Až do 60. let 20. století se pokoušeli vědci pochopit flokulaci různými modifikacemi životních podmínek kvasinek použitím solí, cukrů, alkoholu a rozpuštěného kyslíku. Dále měnili pH a teplotu média. Od poloviny 70. let vznikaly genetické studie, jež odhalovaly molekulární tajemství flokulace. V 80. a 90. letech byla vytvořena lektin-like hypotéza vysvětlující mechanismus shlukování buněk. Tyto lektin-like struktury byly pojmenovány zymolektiny (Jin a Speers, 2000).

První metoda kvantifikace flokulace byla popsána Schönfeldem již v roce 1909. Burnsova metoda z roku 1937 je základem většiny moderních testů a dočkala se modifikací od mnoha autorů např. Helm a kol. (1953), Mill (1964a, 1964b), Patel a Ingledew (1975), Miki a kol. (1982). Burnsův test a jeho verze, stejně jako metoda popsána Nielsenem roku 1937 a vylepšená Nishiharou v roce 1976 se shodují v tom, že vyjmají kvasinky z růstového média, promývají je a nechávají je sedimentovat ve standardním médiu s definovaným složením, vápenatými ionty a fixovaným pH. Tyto in vitro testy byly v minulosti kritizovány, protože měření probíhalo v pufru bez ethanolu a se stokrát až dvěstěkrát větší koncentrací buněk než jaká je na konci pivovarského kvašení. Gilliland vytvořil in vivo test, v němž je flokulace měřena přímo v růstovém médiu (Soares a Mota, 1997).

Většina metod čerpá ze dvou prací, přičemž první Gillilandova z roku 1951 se zabývá flokulací in vivo, kdy kvasinky kvasí v mladině a je charakterizována jejich disperze, a druhá Helmova z roku 1953 zkoumá tento jev in vitro, touto technikou jsou měřeny sedimentační charakteristiky kvasnic rozptýlených v CaSO_4 pufru. Helmova metoda je variantou Burnsova testu a základem Metod analýzy ASBC (American Society of Brewing Chemist). Jak Helmův, tak Gillilandův test mají status EBC (European Brewing Convention) (Speers a Ritcey, 1995).

Základ většiny technik tvoří měření rychlosti sedimentace, neboť ta indikuje fyzikální chování buněk v kapalném médiu. Burns v roce 1937 prováděl toto měření ve vodě, Patel a Ingledew (1975) použili fosfátový pufr, Stratford a Keenan zkoumali chování buněk jak v citrát-fosfátovém pufru (1987), tak v citrátovém (1988), Kempers a kol. (1991) si vybrali acetátový pufr a sulfátový pufr si pro svou práci zvolili Helm a kol. (1953) i Bourdaudhui a kol. (2004). Flokulace je obvykle vyjadřována v procentech, to znamená, že se měří počet buněk nebo optická hustota po flokulaci, a ta je pak srovnána s celou populací po deflokulaci (D'Hautcourt a Smartová, 1999).

V 80. letech byly uskutečněny detailní analýzy vlivu počáteční koncentrace kvasnic (Kihn a kol., 1988b, Miki a kol., 1982) a míchání (Stratford a Keenan, 1988), např. Stratford a Keenan míchali kvasničnou suspenzi 4 – 6 hodin, aby dosáhli rovnováhy mezi volnými a aglutinovanými buňkami.

2.2.2. Genetické pozadí flokulace

Stratford a Assinder (1991) vytvořili sacharidový inhibiční model, podle kterého mohou být kmeny kvasinek rozděleny do dvou flokulačních fenotypů: flokulace kvasinek Flo1 typu je inhibována pouze manosou a nikoliv glukosou, maltosou,

sacharosu či galaktosu, kvasinky tohoto fenotypu mají totiž specifický manosový lektin. Inhibici flokulace kvasnic NewFlo typu způsobuje manosa, glukosa, maltosa, sacharosa, ale ne galaktosa. Kmeny NewFlo fenotypu vytvářejí široce specifický lektin indukovaný pouze ve stacionární fázi. Flo1 fenotyp je řízen *FLO1* genem, u NewFlo fenotypu má řídicí funkci Lg-*FLO1* gen. V roce 1992 Masy a kol. popsali třetí na manosu necitlivý typ. Glukosa, maltosa i maltotriosa jsou cukry utilizované pivovarskými kvasinkami jako zdroje uhlíku, sacharidová inhibice flokulace tedy může být kontrolním mechanismem vytvořeným k zajištění asimilace kvasných cukrů (uvedeno v práci D'Hautcourta a Smartové, 1999).

Schopnost kvasinek flokulovat se mění během kvašení podle toho, jak je regulována exprese *FLO1* genu. Van der Aar a kol. (1993) zjistili, že v buňkách se objevuje maximální koncentrace mRNA odpovídající *FLO1* genu těsně před tím, než buňky začnou flokulovat.

Sato a kol. (2001) uskutečnili první genetický výzkum mechanismu přeměny flokulujících kvasnic na neflokulující. Flokulence během generací klesá, i když ostatní vlastnosti se nemění. Studium probíhalo několik let, tj. od roku 1994 do roku 1997. Byly sledovány změny ve flokulačním genu Lg-*FLO1* řídicím flokulaci spodně kvasících kvasinek používaných pro výrobu ležáku. Na začátku vlastnily buňky celý Lg-*FLO1* gen a silně flokulovaly. Navzdory úspěšné kultivaci došlo u některých buněk k částečné nebo kompletní delecii v Lg-*FLO1* genu. Jelikož byla pro další zakvašení z kónusu odebírána vždy pouze část kvasnic, postupně se s každým kvašením zvyšoval podíl neflokulujících buněk v populaci. Obecně totiž panuje názor, že neflokulující buňky jsou obdařeny větší množící aktivitou, protože se mohou vznášet a množit v médiu i v pozdní fázi kvašení. Nakonec převáží v kultuře neflokulující kvasinky.

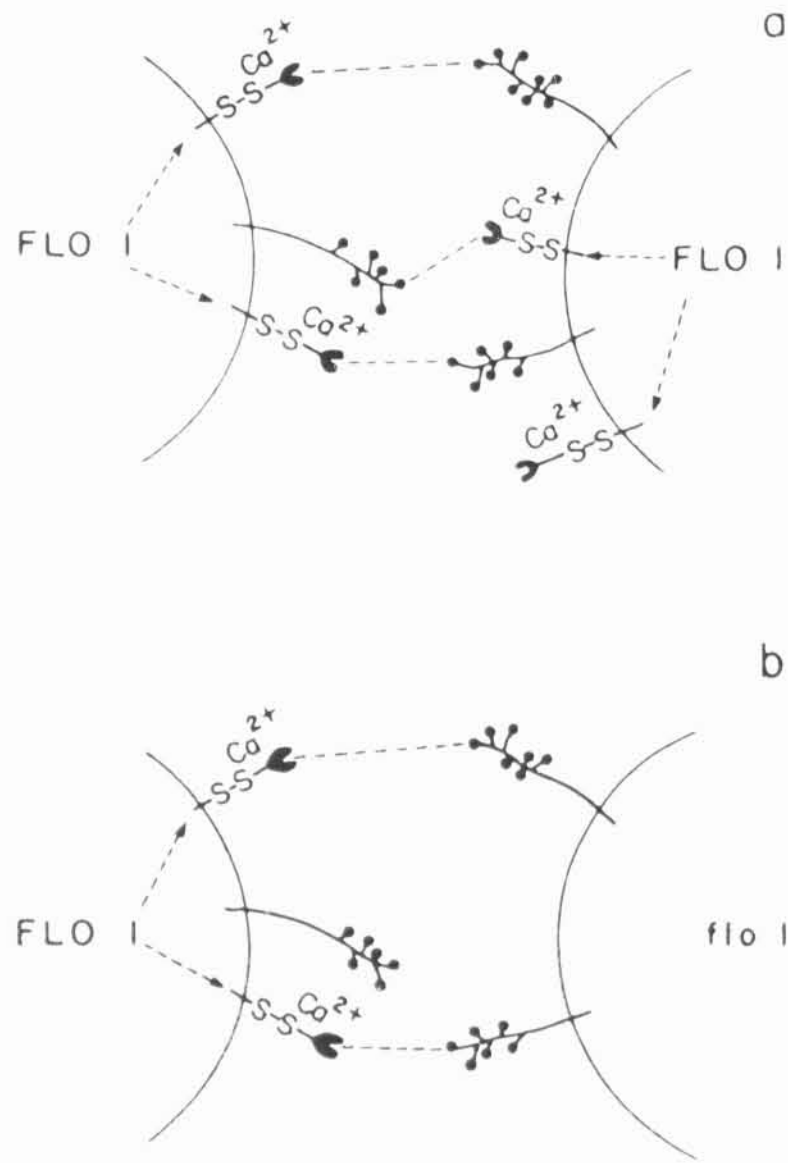
2.2.3. Princip flokulace

Mechanismus flokulace odhaluje práce Mikiho a kol. (1982). *FLO1* gen řídí expresi proteinových součástí buněčné stěny, jenž mají lektin-like aktivitu. Tyto proteiny potřebují pro své navázání na polysacharidy sousedních buněk vápenaté ionty. Pokud jsou obě blízké buňky flokulující, tj. na jejich povrchu se vyskytují jak proteinová, tak sacharidová flokulační místa, je interakce mezi buňkami bilaterální a velmi silná (obr. 2-3a). Jestliže jedna buňka postrádá flokulační proteiny, je interakce pouze jednostranná (obr. 2-3b). Tato skutečnost vysvětluje flokulaci pozorovanou ve směsi flokulujícího a neflokulujícího kmene kvasinek. Poměr neflokulujících a flokulujících buněk se ve shluku pohybuje od 3:1 do 5:1. Předpokládá se, že bilaterální interakce mezi flokulujícími kvasinkami má přednost před jednostrannou interakcí neflokulující buňky s flokulující buňkou. K vytvoření vazby mezi buňkami tedy nemůže dojít, pouze pokud obě sousední buňky nevlastní funkční flokulační gen a tudíž si nevytvářejí povrchové proteiny, které jsou pro flokulaci nezbytné.

Při flokulaci dochází také k nárůstu počtu karboxylových kyselin v buněčné stěně, a tak se buněčný povrch stává hydrofobnějším (Strauss a kol, 2004). Zřejmě jsou karboxylové kyseliny produkovány při nedokončené β -oxidaci v mitochondriích kvasinek, ukázalo se totiž, že pro flokulaci je důležitá funkce mitochondrií, protože glykolytické a dýchací inhibitory flokulaci potlačují.

V současné době se shlukování kvasinek vysvětluje Mikiho teorií (1982), ale taktéž se přisuzuje jistá role hydrofobním interakcím. Poznání principů flokulace zdaleka nebylo jednoduché a v průběhu času vzniklo několik různých hypotéz, které byly později zavrženy. Např. model flokulace založený na fyzikálně chemických principech, navrhoval kooperaci vodíkovými vazbami mezi povrchovými polysacharidy a přemostění aniontových funkčních skupin na přilehlém buněčném povrchu pomocí

divalentních kationtů jako je Ca^{2+} (Mill, 1964a, 1964b). Těchto chelátových komplexů se měly účastnit karboxylové skupiny kyselých proteinů buněčné stěny. Pozitivní efekt monovalentních kationtů na flokulaci byl přisuzován nábojové neutralizaci, naopak inhibiční vliv vysoké koncentrace kationtů byl prý způsoben nárůstem kladného náboje na buněčném povrchu, který vyústil v elektrostatickou repulzi mezi buňkami.



Obr 2-3 Model flokulace. *FLO1* gen řídí expresi proteinových součástí buněčné stěny závislých na vápenatých iontech a vykazujících lektin-like aktivitu. V případě recesivního genu *flo1* pokrývají buněčný povrch pouze sacharidová flokulační místa. (a) Oboustranná interakce mezi flokulujícími buňkami. (b) Jednostranná interakce mezi flokulující a neflokulující buňkou. Převzato z Miki a kol. (1982).

2.2.4. Faktory ovlivňující flokulaci

Flokulace je závislá na celé řadě faktorů. Na shlukování buněk má vliv pH média, jeho osmotický tlak, který má potenciál měnit velikost buněk, iontová síla naopak ovlivňuje povrchový náboj kvasinek, svou roli hraje i koncentrace jednotlivých iontů. Mezi fyzikální faktory lze zařadit reologické vlastnosti roztoku, typ proudění (laminární či turbulentní), velikost a tvar buněk popřípadě jiné koloidní efekty.

Nezbytnou podmínkou flokulace je přítomnost vápenatých kationtů v médiu, mananů a speciálních proteinů na povrchu buňky. O dominantní roli Ca^{2+} ve flokulaci kvasinek svědčí i to, že vápenaté kationty jsou schopné iniciovat flokulaci v širokém rozmezí pH (3 – 10) na rozdíl od ostatních kationtů, jejichž účinnost je značně závislá na pH roztoku. Flokulace buněk zprostředkovaná Ca^{2+} není narušována ani při přidání velkého množství Na^+ či K^+ do roztoku, což ovšem neplatí o flokulaci zajišťované Mg^{2+} . Přesto lze za určitých podmínek nahradit vápenaté kationty např. Mg^{2+} , Mn^{2+} či Zn^{2+} (Miki a kol., 1982).

V některých případech stačí k navození flokulace jen velmi malé množství Ca^{2+} , např. u kmenů s vydatnou flokulací, jako je NRRLY-265, je zapotřebí při pH 4,0

koncentrace 10^{-6} M Ca^{2+} (Soares a Mota, 1997). Nižší koncentraci Ca^{2+} je možno využít k rozlišení kmenů, které vykazovaly podobné vlastnosti při vyšší koncentraci vápenatých kationtů (Boxová a kol., 2001).

Kuriyama a kol. (1991) se zabývali studiem kationtů jako inhibitorů flokulace. Inhibiční vliv kationtů je patrně způsoben soupeřením mezi těmito kationty a Ca^{2+} ionty o vazebná místa na proteinu, jenž se podílí na flokulaci a pro svou funkci potřebuje právě Ca^{2+} . Kationtová inhibice flokulace probíhá v pořadí: $\text{La}^{3+} \gg \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Na}^+$. Přičemž vazebná afinita Ca^{2+} ke specifickým místům je stejného řádu jako La^{3+} . Kompetitivní síla těchto kationtů se zdá být úměrná iontovému poloměru a valenci (bivalentní kationty jsou silnější inhibitory než monovalentní kationty). Odezva různých kmenů kvasinek na přítomnost kationtů v médiu se lišila také podle toho, zda tyto kmeny vlastnily *FLO1* nebo *FLO5* gen. Geny *FLO1* či *FLO5* pravděpodobně kódují různé varianty flokulačních proteinů, tato domněnka byla potvrzena i reakcemi se sacharidy.

V minulosti byla uskutečněna celá řada studií o pozitivním i negativním vlivu různých kationtů na flokulaci, avšak ne vždy byly jejich závěry jednoznačné. Některé kationty mohou patrně za určitých podmínek flokulaci podporovat a při jiných ji mohou naopak narušovat. Podrobnosti lze nalézt např. v publikaci Taylor a Orton (1975). Podobně rozporuplný je i vliv ethanolu, vývoj flokulace v jeho přítomnosti se liší kmen od kmene (Jin a Speers, 2000, D'Hautcourt a Smartová, 1999).

Jin a Speers (2000) zjistili, že kvasinky NewFlo i Flo1 fenotypu vykazují větší flokulaci při vyšších teplotách, tj. při 5°C byla flokulace NewFlo buněk nevýrazná, ale při teplotách nad 10°C byla pozorována silná flokulace. Z hodnoty aktivační energie vyplývá, že kvasinky NewFlo fenotypu ($E_a = 11,0$ kcal/mol) jsou teplotně citlivější než ty s Flo1 fenotypem ($E_a = 3,2$ kcal/mol).

Dále mohou mít na flokulaci vliv některé kultivační podmínky, např. zákvasný poměr, objem média, změny pH během kvašení a inkubační čas (Jin a Speers, 2000). V pivovarské praxi se používá zákvasný poměr: 0,5 – 1 kg kvasnic na 1 hl mladiny, tj. $10 - 20 \cdot 10^6$ buněk/ml. Co se týče objemu média, tak spíše než jeho vlastní objem, může hrát důležitou roli objem vzduchu nad médiem v nádobě, neboť ten může mít vliv na provzdušnění mladiny.

Pro vyvolání aglutinace je nutné dodat mechanickou energii, bez míchání se nemohou flokulující buňky v přítomnosti Ca^{2+} shlukovat. Avšak je třeba dbát na vhodnou kombinaci doby a intenzity míchání, protože míchání může také vést k rozbíjení již vytvořených shluků buněk. Vědci vyzkoušeli řadu způsobů míchání, aby dodali buňkám potřebnou energii, např. Kempers a kol. (1991) využili k navození flokulace míchání kvasničné suspenze na vortexu, přičemž maximální flokulence docílili po 10 až 50 sekundách míchání.

Soares a Mota (1997) se rozhodli iniciovat flokulaci převrácením nádoby s kvasinkami. Po prvním otočení válce s kvasničnou suspenzí flokuluje a sedimentuje přibližně 40 % buněk, množství usazených kvasinek rychle stoupá s počtem inverzí válce, počet usazených buněk je téměř konstantní při více než dvanácti otočeních nádoby. Přičemž do 2 minut po ukončení míchání sedimentovalo 90 % buněk, během následujících minut se podíl usazených buněk již téměř neměnil, proto lze množství usazených kvasnic po 7 minutách sedimentace použít jako vyjádření flokulence jednotlivých kmenů kvasnic.

Kihn a kol. (1988b) ve své studii iniciovali flokulaci mimo jiné pomocí magnetického míchadla, u laboratorního kmene NCYC869 dosáhli stacionárního stavu po 2,5 min míchání, avšak pivovarské kmeny potřebují více času – přibližně 30 minut.

Vlivem míchání na flokulaci se zabývali také Stratford a Keenan (1988), podle nich je nejlepší variantou použití orbitální třepačky, kdy lze dobře stanovit počáteční rychlost, stacionární stav i velikost shluků buněk. Magnetické míchadlo totiž rozbíjí

velké shluky buněk, navíc s jeho větší rychlostí či velikostí roste i rychlost flokulace. Naopak vířivé míchání je až příliš účinné, neboť stacionárního stavu je dosaženo již po několika sekundách, což ovšem neumožňuje měřit počáteční rychlosti flokulace.

Stratford a Keenan (1987) taktéž zjistili, že existuje minimální rychlost míchání nutná pro iniciaci flokulace (např. pod 50 rpm při 6 mg sušiny/ml a pH 4,5 se buňky neshlukovaly) a že počáteční rychlost flokulace roste exponenciálně právě s rychlostí míchání. Mimo to se minimální práh míchání nutný pro iniciaci flokulace zvyšuje v závislosti na zvětšujícím se pH: od 50 rpm při pH 2,0 až po 80 rpm při pH 9,0. Avšak při 120 rpm má pH již jen malý vliv na počáteční rychlost flokulace.

Optimální podmínky pro flokulaci většiny spodně kvasících kvasinek nastávají, když koncentrace vápníku v médiu přesahuje 20 mg/l, pH roztoku se udržuje na 4,5 a teplota do 27°C. Nezbytná je také definovaná koncentrace buněk ($> 2 \cdot 10^7$ buněk/ml), dostatek srážek mezi buňkami, absence různých inhibitorů flokulace jako jsou manosa, glukosa a EDTA (van der Aar, 1996).

2.2.5. Selektivní inhibice vazebné aktivity jako nástroj poznání flokulace

α -MMP je derivát manosy obsahující methoxy skupinu na C₁ a slouží jako kompetitivní inhibitor manoso-specifických lektinů. Flokulace NewFlo kmenu poklesla již při malé koncentraci α -MMP, aglutinace buněk byla částečně inhibována 10 mM α -MMP ze 72,8 % na 58,8 % a zcela inhibována 100 mM α -MMP na 7,1 %. Flokulace Flo1 kmenu byla redukována až při koncentracích α -MMP vyšších než 100 mM. Z experimentů provedených Jinem a Speersem (2000) lze usoudit, že flokulace NewFlo kvasnic je citlivější na přítomnost cukru než flokulace Flo1 kmenů. Pozorovaný trend inhibice souhlasí s inhibicí manosou popisovanou i v jiných publikacích.

Kihn a kol. (1988a) se zaměřili na studium inhibice flokulace kmene NCYC869 pomocí některých manosových a glukosových derivátů. Na základě reakcí manosy a methyl-manosy, které způsobují znatelnou, avšak slabou inhibici, a manosaminu či N-acetylmanosaminu, jež neinhibují aglutinaci až do koncentrace 500 mM, dospěli k závěru, že v interakci s manosovým receptorem je důležitá axiální poloha OH skupiny na C₂. Zjištění, že p-nitrofenyl- α -manosa inhibuje výrazněji shlukování kvasinek než samotná manosa, ukázalo vysokou afinitu receptoru k hydrofobnímu nitrofenylovému residuu. Tudiž manoso-vazebné místo se nalézá v blízkosti hydrofobní oblasti, podobně jako je tomu u mnoha jiných lektinů. Silnější inhibice manosovým dimerem (3-O- α -D-manosyl-D-manosa) ve srovnání s monomerem vypovídá o tom, že receptor váže více než jeden manosový zbytek.

Účast α -mananů na flokulaci byla prokázána kompetitivní inhibicí manosou a konkanavalinem A (Miki, 1982). Konkanavalin A je sonda pro vysoce větvené α -manany kvasinek *S. cerevisiae*. Dále je flokulace nevratně inhibována narušením buněčné stěny zymolyasou, nebo redukcí či štěpením proteinů merkaptoethanolem a proteinasou K. Ač by se mohlo podle uvedených poznatků zdát, že flokulence kvasnic je velmi choulostivá vlastnost, kmen S646-1B si zachovává svou schopnost flokulovat i při řadě denaturujících podmínek (vaření, působení 6 M močoviny, 2 % Tritonu X-100 (detergentu), použití 2 % dodecylsulfátu sodného).

2.2.6. Síla a energie vazby

Vazebná energie mezi buňkami může být vyjádřena jako změna Gibbsovy standardní volné energie ($\Delta G^\circ = 3,39$ a $3,33$ kcal/mol pro Flo1 a NewFlo kmény). Jin a Speers (2000) vypočetli sílu buněčné vazby, když předpokládali, že interakční vzdálenost zymolektinu a mananu dosahuje 1 nm a že zymolektin je monovalentní.

Vazebné síly byly vyčísleny na $2,36 \cdot 10^{-11}$ N a $2,32 \cdot 10^{-11}$ N, tyto hodnoty jsou velmi blízké síle $2,2 \cdot 10^{-11}$ N potřebné k odtržení dvou buněk, jež byla získána reologickým studiem suspenze pivních kvasnic.

Vazebná energie elektrostatické interakce je mnohem větší (10 – 20 kcal/mol) než síla vodíkové vazby (2 – 10 kcal/mol), hydrofobní interakce (1 – 3 kcal/mol) či Van der Waalsovy interakce (0,2 – 2 kcal/mol). Vazebná energie flokulace svou velikostí patří do intervalu mezi vodíkovou vazbu a hydrofobní interakci.

2.2.7. Předčasná flokulace a vliv kvašení v CKT na kvalitu kvasnic

Závažným problémem při výrobě piva může být předčasná flokulace kvasnic. Nakamura a kol. (1997) vyvinuli novou metodu na určování faktoru předčasné aglutinace kvasnic. Dřívější ukončení kvašení způsobuje tzv. faktor předčasné flokulace kvasnic (PYF), který je přítomen ve sladu a přechází tak i do mladiny. Dříve byla tato vada sladu zjišťována kvasným testem, avšak tato metoda vyžadovala 16 dní a nebyla použitelná ve všech případech.

PYF faktor je vysokomolekulární kyselý polysacharid obsažený v ječmenu, a to zejména v obalových vrstvách zrn, kde je ho přibližně desetkrát větší množství než uvnitř obilek. Nový test má širší uplatnění a k jeho realizaci jsou zapotřebí pouze 4 dny, navíc pomocí něj je možné stanovit PYF faktor již z nezesladovaného ječmene. Výsledky jím získané dobře koreluje s hodnotami z tradiční metody.

Hlavní kvašení piva v současnosti často probíhá v cylindro-kónických tancích (CKT), což jsou nádrže o objemu 2000 hl a více. Kvasnice citlivě reagují na skladování na dně těchto cylindro-kónických tanků, kde jsou vystaveny stresovým faktorům např. různému množství alkoholu. Vyšší koncentrace alkoholu u dna je způsobena autofermentací díky utilizaci sacharidových rezerv kvasinek ve spojení s velkým zředěním mladinových cukrů. Proto kvasinky na dně CKT obsahují méně glykogenu (Powell a kol., 2004)

Glykogen a trehalosa patří mezi zásobní formy glukosy v kvasinkách. Glykogen je bohatě větvený glukan umožňující současně odbourávání glukosových jednotek ze všech větví. Hutter (2001) uvedl, že syntéza glykogenu kolísá během kvasného procesu. Ve stresových situacích je v buňkách glykogen přítomen ve větší koncentraci a slouží jako zásoba energie. Zatímco trehalosa se vyskytuje v menším množství a spíše chrání buňku před stresem než, že by poskytovala zdroj energie. Powell a kol. (2004) sledovali obsah trehalosy u kvasnic v závislosti na tom, jakým způsobem byly kvasinky oddělovány od mladého piva. U kvasinek z tzv. teplé sklizně se obsah trehalosy udržoval na nízké úrovni, ale u konvenční sklizně bylo její množství vyšší v důsledku stresu ze změny podmínek a z delšího skladování na dně nádoby. Použitá metoda sklizně kvasnic má vliv i na životaschopnost buněk, např. první frakce teplé sklizně obsahovala $(91,1 \pm 2,1)$ % viabilních buněk, oproti tomu konvenční sklizeň poskytovala pouze $(83,4 \pm 3,8)$ % životaschopných kvasinek. V druhé části teplé sklizně byla viabilita buněk nižší $(81,7 \pm 6,2)$ %.

Hodnota pH kvasnicového piva byla nejvyšší u vzorků ze dna cylindro-kónického tanku (pH 5,5), naopak pH piva z posledních frakcí (pH 4,3) se blížilo hodnotě pH konečného produktu. Vysoké pH kvasnicového piva souvisí s lýzou buněk, vrstvy kvasnic na dně CKT obsahují buňky ve špatném fyziologickém stavu, proto je zdejší pH vyšší. Podobný gradient byl pozorován i u teplot (1°C – 8°C) (Powell a kol., 2004). Zvýšené teploty uvnitř kónusu mohou být důsledkem autofermentace, při níž buňky spotřebovávají glykogenové zásoby, generují teplo, oxid uhličitý a ethanol (Cahill a kol., 1999).

Hodgson a kol. (1999) došli na základě fluorescenčního barvení buněk calcofluorem (1mg/ml) k závěru, že kvasnice usazené mezi středem a horní částí kónusu jsou nejvhodnější k opětovnému zakvašování. V této oblasti se totiž nalézají populace mladých kvasinek, jež obsahují 50 % až 65 % panenských buněk a které zároveň vykazují nejlepší kvasné výsledky. Na dně CKT se ve větší míře objevují velké staré buňky a naopak v pivu zůstává množství malých panenských buněk.

Kvasinky mohou být znovu použity k zakvašení až dvacetkrát, avšak v pravidelných intervalech je nutná propagace, aby se předešlo infekcím, eliminovali se respiračně deficientní mutanti apod. Opakované zakvašování má svá úskalí. Problémem může být nižší viabilita sklizených kvasnic, ztráta hořkosti a redukované chmelové aroma piva, ale i zvýšené riziko autolýzy buněk a chudá utilizace látek v CKT (Cahill a kol., 1999).

Podrobnosti o vlivu kvašení v cylindro-kónických tancích jak na kvalitu kvasnic, tak na chuť piva lze nalézt mimo jiné v Kaneda a kol. (1992).

2.2.8. Přehled metod měření flokulace

Většina zmíněných poznatků o flokulaci kvasinek byla získána pomocí různých metod, jež byly odvozeny z Helмова testu, a proto jej zde uvedeme v mezinárodně uznávané podobě (American Society of Brewing Chemists). Metody některých dalších autorů, kteří se ve značné míře právě tímto testem inspirovali, jsou shrnuty v přehledové tabulce 2-1.

Helmův test:

Sedimentace vzorku kvasnic je pozorována v roztoku CaSO_4 pufovaném na pH 4,5.

Chemická činidla:

- Mycí roztok siranu vápenatého – rozpustíme 0,510 g CaSO_4 v 1 litru destilované vody.
- Pufovaný roztok CaSO_4 – rozpustíme 0,510 g CaSO_4 , 6,80 g CH_3COONa a 4,05 g CH_3COOH v 1 litru destilované vody. Výsledný roztok by měl mít pH 4,5.
- Mladina (10 – 12°P) – sterilizovaná při 100°C po dobu 20 min ve třech následujících dnech.
- Mladinový agar – přidáme 2 g agaru ke 100 ml mladiny (činidlo c) v 500 ml Erlenmeyerově baňce. Zahříváme do rozpuštění a sterilizujeme 20 min při 121°C.
- Normální slaný roztok – rozpustíme 9 g NaCl v 1 litru destilované vody a sterilizujeme 20 min při 121°C.

Metoda:

Příprava vzorku kvasnic: Rozředíme vzorek kvasnic normálním slaným roztokem (činidlo e) na koncentraci 10^6 – 10^7 buněk/ml. Nalijeme přibližně 15 ml roztaveného mladinového agaru (činidlo d) do Petriho misek a necháme ztuhnout. Naneseme očka kvasinkové suspenze na 3 agarové plochy a inkubujeme 3 – 7 dnů při 25°C. Naočkujeme kvasnice z agarových misek do tří 1000 ml baněk obsahujících 200 ml mladiny (činidlo c). Inkubujeme staticky 3 dny při teplotě 25°C. Přemístíme 5 – 6 g suspenze do 30 ml mycího roztoku CaSO_4 (činidlo a) a odstředíme.

Určení sedimentačního objemu: V trojím provedení odměříme 10 ml pufovaného roztoku CaSO_4 (činidlo b) do 15 ml centrifugačních zkumavek a přidáme 1 g promytých kvasnic. Rozptýlíme kvasinky a umístíme je do vodní lázně o teplotě 20°C na 20 min. Protřepeme a po dalších 10 min změříme objem kvasinkové suspenze.

Stanovení flokulačního typu:

- Flokulující kvasinky: Suspenze se rychle rozděluje do dvou vrstev blízko hladiny kapaliny. Toto rozhraní rychle padá a je měřeno po 10 min.

- 2) Neflokulující kvasinky: Rozhraní se formuje mnohem pomaleji blízko dna zkumavky. Rozhraní je měřeno opět po 10 min.

Samotný Helmův test podává jen velmi omezené informace o flokulaci, flokulační typ se posuzuje pouze pohledem. Proto byla navržena spousta jiných metod, které určují flokulaci spektrofotometry. K měření by se měla používat vlnová délka, při které dochází k maximu absorpce. To je závislé na poměru indexů lomu média a kvasnic, poměru velikosti částice a vlnové délky, na rozměrech a distribuci shluků. Nicméně pro měření flokulace se používají vlnové délky 600, 620, 660 nebo 700 nm (Speers a Ritcey, 1995).

Další nedostatky Helmoveho testu odhalili D'Hautcourt a Smartová (1999), došli totiž k závěru, že čas určený ke kultivaci buněk podle Helmovy metody je dostatečný pouze pro Flo1 kmeny, protože NewFlo kmeny potřebují delší dobu kultivace, aby se plně projevila jejich flokulence. Taktéž ověřili, že použití EDTA při promývání kvasinek neovlivňuje pozdější flokulaci měřenou v pufru s Ca^{2+} ionty. Promývání kvasinek roztokem EDTA je všeobecně považováno za nezbytný procedurální krok v měření flokulace.

Helmove metoda a metody z ní odvozené jsou založené na poznatku, že flokulující kvasinky potřebují ke zdárnému průběhu flokulace přítomnost vápenatých iontů. Existuje však ještě druhá skupina metod, jež se zaměřila na skutečnost, že povrch flokulujících buněk je hydrofobnější než povrch neflokulujících buněk. Mezi nejzajímavější techniky z této kategorie patří ta vytvořená Akiyamou-Jibikiovou a kol. (1997). Jejich chromatografická metoda měření flokulace využívá hydrofobní interakce buněčného povrchu (HICF). Z chromatografické kolony s fenylsepharosovým gelem CL-4B se při promývání kolony 100 mM acetátem sodným (pH 4,2) s obsahem 1,0 M NaCl nejprve vyplavují slabě hydrofobní kvasinky a po záměně eluentu za 30 % isopropanol jsou sebrány silně hydrofobní kvasinky. Následně se změří absorbance sebraného eluentu při 660 nm. Metoda je časově nenáročná, neboť její realizace zabírá pouze 15 min.

Silně hydrofobní frakce obsahují většinu flokulujících buněk, u neflokulujících kmenů je počet buněk v těchto frakcích nízký. Smíšená kultura v poměru 1:1 flokulujících a neflokulujících kvasinek se téměř rovnoměrně rozdělí mezi silně a slabě hydrofobní frakci. Množství hydrofobních buněk tedy reprezentuje intenzitu flokulace.

Metoda HICF byla vyzkoušena na 75 kmenech spodně fermentujících kvasnic, její výsledky dobře korelují s Helmovou metodou. Navíc je HICF metoda, na rozdíl od Helmoveho testu, vhodná pro posuzování flokulace i u slabě flokulujících kmenů. HICF metodou byl sledován vývoj hydrofobicity buněčného povrchu a flokulence během kvašení v mladině. V případě neflokulentních kmenů bezprostředně po přidání kvasnic do mladiny jejich HICF hodnoty prudce stouply, v následující rané exponenciální fázi se snížily a opět postupně rostly během stacionární fáze růstu. Flokulující kmeny se liší pouze tím, že opětovný nárůst hydrofobicity buněčného povrchu nastává již na konci exponenciální fáze růstu. Kvasinky tedy ztrácejí flokulenci v rané fázi růstu a znovu ji získávají v pozdní exponenciální nebo rané stacionární fázi. Zlomový bod, v kterém začínají kvasinky flokulovat a sedimentovat souvisí s časem, kdy původní 11,5 % extrakt mladiny je zredukován na méně než 7 %.

Van der Aar a kol. (1993) pomocí měření kontaktního úhlu vody našli souvislost mezi buněčným cyklem kvasinek a změnami v hydrofobicitě jejich buněčné stěny. Těsně před ukončením buněčného dělení se kvasinky z flokulujícího kmene stávají hydrofobnější, kontaktní úhel se posunul z 52° na 75° , zatímco neflokulující buňky zůstávají jen mírně hydrofobní (52°).

Tabulka 2-1 Vyběr několika metod měření flokulace buněk

Autoři metody	Hustota suspenze (buněk/ml)	Roztoky, jimiž byl vzorek před měřením promývan	Odstředování	Míchání použité pro iniciaci flokulace	Teplota měření	Čas mezi mícháním a měřením	Roztok, v němž probíhalo měření flokulace	Způsob měření
Bourdaudhui a kol. (2004)	10^8	3 × deionizovaná voda; 1 × CaSO ₄ pufr (0,51 g/l)	1 min. 6000 × g	30 s; pak vzorek 5 × převrácen v 15 s	25°C	10 min	pufr*; kontrolní vzorek: 0,5 M EDTA, pH 7,0	0,1 ml vzorku + 0,9 ml deionizované vody, absorbance 600 nm
Boxová a kol. (2001)	$1 \cdot 10^8$	1 × destilovaná voda; 1 × 250 mM EDTA; 3 × destilovaná voda; 1 × 50 mM citrát sodný (pufr), pH 4,5	čas vždy 5 min, otáčky: 4500 rpm; 1500 rpm; 4500 rpm	10 s vortex; horizontálně na orbitální třepačce při 100 rpm 2 h	20°C	1 min	citrátový pufr, CaCl ₂ kontrolní vzorek: 0,1 ml bez Ca ²⁺ + 9,9 ml 50 mM EDTA	odebráno 0,2 ml suspenze pod meniskem + 1,8 ml 250 mM EDTA, absorbance 620 nm
Kihn a kol. (1988a, 1988b)	10^8 laboratorní; $28,5 \cdot 10^6$ pivovarské kmeny	3 × destilovaná voda; 1 × 2 mM EDTA, pH 8 1 × destilovaná voda	5 min, 2500 × g, 4°C	15 s vortex; třepáno při 60 rpm 5 min (lab.) či 30 min (piv.)		5 min (lab.); 15 min (piv.) kmeny	0,1 mM HCl, 0,5 mM Ca ²⁺ , dolito destilovanou vodou do 5 ml	absorbance 660 nm
Soares a Mota (1997)	$1 \cdot 10^8$	2 × 250 mM EDTA; 1 × 250 mM NaCl, pH 2,0; 1 × 250 mM NaCl, pH 4,5	5 min, 4500 × g, 4°C	18 × převrácení	20°C		24 ml 250 mM NaCl, pH 4,5 + 1 ml 100 mM CaCl ₂ , pH 4,5 (výsledné 4 mM Ca ²⁺)	200 – 1000 μl odebráno z hladiny 20 ml v 25 ml válci, rozpuštěno v 250 mM NaCl, pH 2,0, absorbance 620 nm
Stratford a Keenan (1988)	$2 \cdot 10^8$	2 × 250 mM EDTA	5 min, 2000 × g	4 druhy, př. 3 ml vzorek ve 4 ml kyvetě 1 × /s převrácen	25°C	5 min	50 mM citrátový pufr, pH 3,0, 5 mM EDTA, 50 mM CaCl ₂ (konečná koncentrace 10mM)	5 mm pod meniskem odebráno 0,5 ml, dolito 250 mM EDTA na 3 ml, absorbance 600 nm

(* složení pufru: 0,51 g/l síranu vápenatého, 6,8 g/l acetátu sodného, 4,05 g/l ledové kyseliny octové, 4 % ethanolu)

Je známo, že schopnost kvasinkových kmenů flokulovat je přímo úměrná velikosti hydrofobicity jejich povrchu nebo nízkému povrchovému napětí. Azeredová a kol. (1997) používali k určení komponent povrchového napětí kvasinek tři kapaliny (vodu, glycerol a diiodmethan) se známými komponentami povrchového napětí, jedna z nich musí být nepolární (v tomto případě diiodmethan). Preferenční přitahování mezi buňkami flokulujících kmenů, zodpovědné za shlukování buněk, může být vysvětleno nižší volnou energií hydrofobní interakce ΔG_{iw}^{tot} mezi buňkami a molekulami vody, tudíž je upřednostňována vzájemná interakce mezi buňkami. ΔG_{iw}^{tot} nabývá menší hodnoty pro flokulující buňky než pro neflokulující.

2.3. Vitalita a viabilita kvasnic

Viabilita je definována jako schopnost buněk se množit a vykazovat metabolickou aktivitu. Kvasinky si zachovávají metabolické funkce po dlouhou dobu, přestože již třeba ztratily schopnost se rozmnožovat.

Termín vitalita se používá pro popis kvasné kapacity, dýchací efektivity buněk, schopnosti kvasinek přijímat kyslík a jejich metabolické aktivity. Vitalita je tedy funkcí fyziologických a biochemických podmínek kvasinek (Fernández a kol., 1991).

Stanovení viability a vitality kvasinek před zakvašením je důležité pro zajištění stále kvality piva a řádného průběhu kvašení. Dlouhé skladování a fyziologický stres vznikající během pivovarského procesu mohou vážně ohrozit životaschopnost kvasinek. Vitalita sklizených kvasnic odráží kvalitu použitých zákvasných kvasnic, složení mladiny, podmínky kvašení a sklizně. Kvasnice s nižší vitalitou a viabilitou produkují pivo s menší stabilitou pěny, to je pravděpodobně způsobeno uvolňováním proteasy do piva díky autolýze buněk. Vitálnější kvasinky fermentují rychleji a efektivněji.

2.3.1. Měření životaschopnosti buněk pomocí barviv

Viabilitu kvasnic lze zjišťovat barvením buněk, např. Cahill a kol. (1999) měřili viabilitu barvením buněk methylenovou modří. Pouze 75 % kvasinek svrchního kvašení bylo schopno života po dvou týdnech skladování při 4°C, před skladováním obsahovala tato populace 97 % živých buněk. Kvasinky spodního kvašení se zdají být odolnější, neboť jejich populace i po 17 dnech skladování obsahovala 90 % životaschopných buněk, přičemž na počátku experimentu tam bylo 95 % živých buněk.

Methylenová modř je průmyslově používaný standard pro stanovení viability, přestože efektivita tohoto barvení je poněkud kontroverzní při měření viability menší než 90 %. Proto se uvažuje o jejím nahrazení methylenovou violetí, jež poskytuje reprodukovatelnější a přesnější výsledky (Van Zandyckeová a kol., 2003).

Viabilitu lze také určovat pomocí barvení buněk fluorescenčními barvivy, které je považováno za méně subjektivní než např. barvení methylenovou modří. Neboť fluorescenční barviva poskytují lepší rozlišení mezi mrtvými a živými buňkami – to demonstrovali Graham a Caiger již v roce 1969. Během 90. let se stala fluorescence běžným způsobem určování viability buněk, a to jak živočišných, tak bakteriálních či kvasinkových.

Existují tři základní mechanismy fungování fluorescenčních barviv:

- 1) Barviva, jež se váží na nukleové kyseliny, mohou buď procházet skrz plazmatickou membránu, a tak detekovat živé buňky. Anebo nemohou volně pronikat přes membránu a do buněk se dostávají až v okamžiku, kdy je membrána poškozena,

tudíž označují mrtvé buňky. Intenzita vyzařované fluorescence závisí na afinitě těchto barviv k nukleovým kyselinám.

- 2) Fluorescenční sondy měřící membránový potenciál buněk mohou být buď kladně, nebo záporně nabitě. Záporně nabitá barviva vstupují volně pouze do mrtvých buněk díky tomu, že mrtvé buňky ztrácejí svůj membránový potenciál.
- 3) Poslední skupinu tvoří barviva, která fluoreskují teprve po jisté přeměně uvnitř buňky. MgANS (hemihorečnatá sůl 1-anilino-8-naftalensulfonové kyseliny) proniká do neživotaschopných buněk, kde se váže na cytoplasmatické proteiny a generuje žlutozelenou fluorescenci. Avšak MgANS funguje špatně v přítomnosti vysoké koncentrace látek narušujících membránu, jako je ethanol. Barvivo FUN1 (2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidien)-1-fenylchinolinium jodid) prochází membránou a ve vakuolách *S. cerevisiae* tvoří válcové struktury (CIVS), jež vyzařují červenou fluorescenci. Ostatní barviva, např. fluorescein diacetát nebo karboxyfluorescein diacetát (CFDA), jsou hydrolyzována esterázami v živých buňkách, což je činí světélkujícími. Tyto barviva unikají z buněk porušenými membránami a v důsledku toho zůstávají mrtvé buňky neobarvené.

Van Zandyckeová a kol. (2003) provedli srovnávací experimenty flouoroforů s methylenovou violetí. Nejlepší shody bylo dosaženo při použití oxonolu a berberinu, zbylá barviva projevovala drobně nepřesnosti zejména pak propidium jodid, který byl shledán zcela nevhodný pro měření viability, a FUN1, jenž stále podhodnocoval životaschopnost buněk.

2.3.2. Princip acidifikačního testu

Zatímco viabilitu kvasinek lze poměrně dobře měřit pomocí barvení buněk širokou škálou barviv, vitalitu lze patrně nejlépe stanovit na základě acidifikačního testu. Okyselení vnějšího prostředí patří mezi základní projevy buněčné odezvy na nejrozličnější stimuly – přidání substrátu či soli (např. KCl), nebo okysličení média v nepřítomnosti substrátu (Sigler a Höfer, 1991). Test acidifikační síly vypovídá o zdraví kvasinek, informace z něj získané mohou sloužit k předpovědi průběhu kvašení, tolerance k různým teplotám skladování a schopnosti redukovat vicinální diketony (Fernández a kol., 1991).

Acidifikační křivka je charakteristická pro daný kmen kvasinek a buněčnou historii. Nejlepšími substráty pro acidifikační testy kvasinek *S. cerevisiae* jsou: glukosa, fruktosa, manosa, sacharosa, galaktosa, maltosa (ta je na rozdíl od ostatních cukrů transportována H^+ -symportem a může tedy způsobit počáteční alkalizaci vnějšího prostředí) a ethanol (v provzdušněných suspenzích). Saturace nastává při 20 – 30 mM koncentraci glukosy a přibližně 10 mg sušiny kvasnic/ml. Saturací kinetika protonového toku má dvě části, jež korespondují přibližně s nízkoafinitním konstitutivním systémem přijímání glukosy (usnadněnou difúzí) a vysokoafinitním mechanismem (H^+ -symportem) spojeným s expresí glukokinasy.

Když aerobní hladovění v destilované vodě přesáhne 4 – 5 h, začne se zvyšovat pH suspenze v důsledku přijímání H^+ při současném vylučování K^+ a díky produkci NH_3 v deaminačních reakcích, také rozsah acidifikace silně klesá. Hladovění je doprovázeno poklesem vnitrobuněčné hladiny ATP a respirační rychlosti. K podobnému oslabení acidifikační odezvy na přidání substrátu dochází i po vystavení kvasinek různým inhibitorům, zvýšené teplotě, kyselosti a jiným nepříznivým faktorům. Acidifikační odpověď buněk na přidání substrátu může být tedy použita jako diagnostický nástroj pro stanovení metabolické schopnosti buněk např. v průmyslových kulturách

Okyselení vnějšího prostředí během glukosou indukované acidifikace pramení z vylučování CO_2 a organických kyselin ven z buňky, z činnosti plasmatické H^+ -ATPasy, dále pak z mechanismů kontrolujících proudění K^+ a možná i jiných iontů.

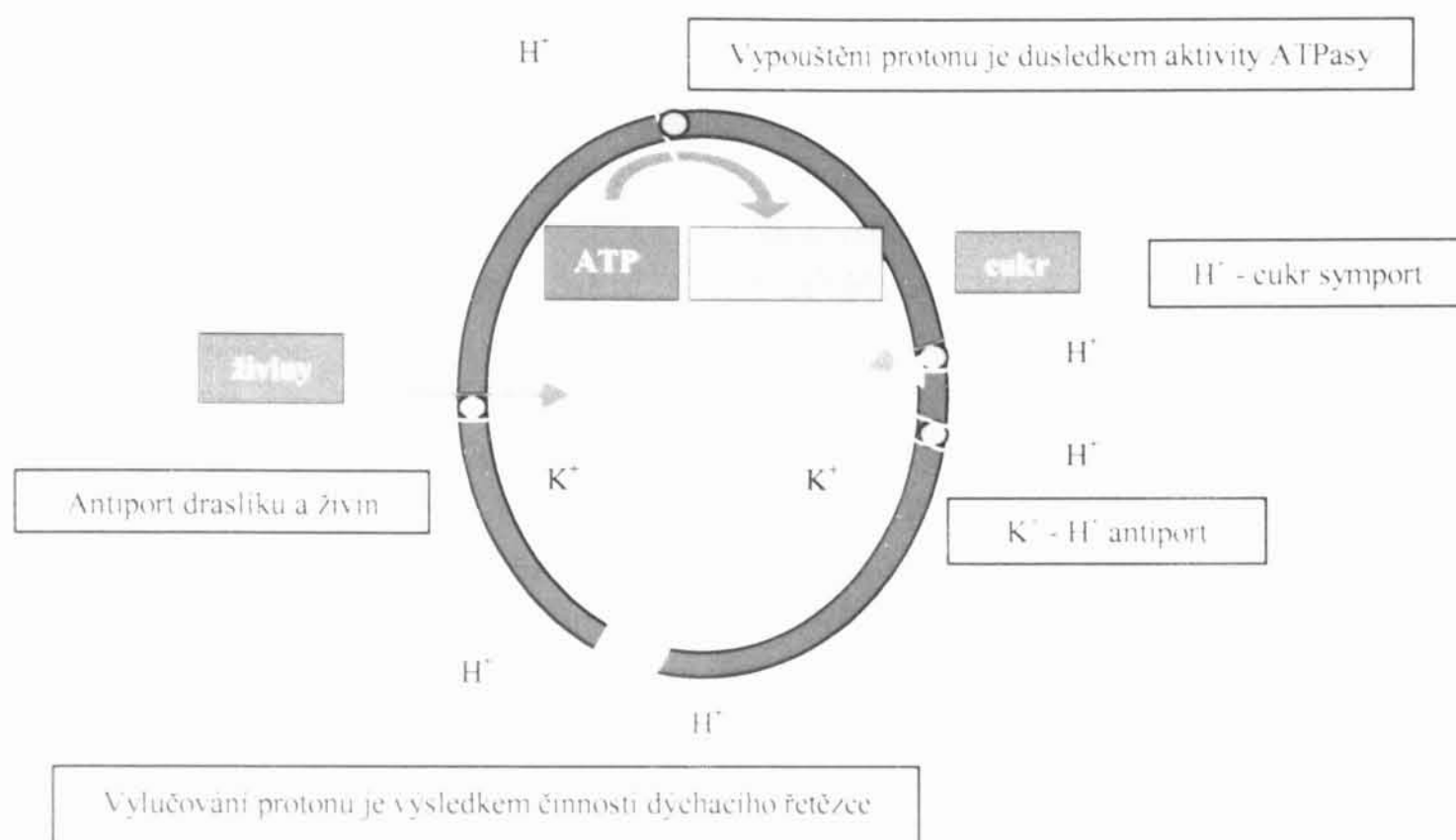
První událostí po přidání glukosy je přechodný rozmach endogenního dýchání a tvorby CO_2 z vnitřních zdrojů. Rychlost výroby CO_2 během tohoto rozkvětu je 500 – 600 μl za minutu na 1 mg sušiny, tj. asi 100× rychlejší než produkce určená Warburgovým manometrem při delších časových intervalech. Tato tvorba CO_2 z mobilizovaných vnitřních zdrojů rychle opadá, v souvislosti s vyčerpáním kyslíku ze suspenze a prudkým nárůstem NADH/NAD^+ poměru, a je nahrazena produkcí CO_2 z přidaného substrátu. Alkoholové kvašení 100 mmol glukosy vydá 140 – 190 mmol CO_2 . Obvyklá koncentrace CO_2 ve vodě, která je v rovnováze se vzduchem, činí $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Dohromady s CO_2 vzniklým z glukosy se může koncentrace CO_2 v suspenzi vyšplhat asi na 1 – 2 mmol/l (při 10 mg sušiny kvasnic/ml). Dosud není přesně známo, kolik CO_2 prochází skrz buněčnou membránu jako takového a kolik v podobě HCO_3^- . Avšak propustnost kvasinkové plasmatické membrány pro HCO_3^- je $10^{-8} - 10^{-7}$ cm/s ve srovnání s 0,3 – 0,6 cm/s pro CO_2 . Nicméně kvasinky obsahují anhydrasu, která může katalyzovat $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ rovnováhu.

Druhým krokem následujícím po přidání glukosy k suspenzi *S. cerevisiae* je alkoholové kvašení, které vede k produkci acetátu, butylenglykolu, acetoinu, acetaldehydu, glycerolu a sukcinátu. Sukcinát vzniká v citrátovém cyklu a podílí se na okyselení vnějšího prostředí kvasinek.

V neposlední řadě přispívá k okyselení vnějšího prostředí svou činností kvasinková ATPasa. Ta je umístěná v plasmatické membráně kvasinek a patří k E_1E_2 typu nebo P-typu ATPas, které přemísťují kationty skrz plasmatické membrány buněk zvířat, rostlin, eukaryotních mikroorganismů i některých bakterií. ATPasa je přibližně ze dvou třetin zanořena do cytoplasmy a obsahuje residua pro vázání ATP a enzymovou fosforylaci. Ta je závislá na navázání transportovaného kationtu, jenž je typický pro daný druh ATPasy: H^+ , Na^+ nebo Ca^{2+} , zatímco zpět do cytoplasmy je většinou přemísťován K^+ . V ATPasách, které pumpují K^+ do cytoplasmy, je K^+ nezbytný pro hydrolyzu fosfoenzymu.

Enzym alternuje mezi 2 hlavními stavy E_1 a E_2 , a tvoří přechodný fosforylovaný intermediát, v kyselém prostředí stabilní, v zásaditém labilní β -aspartylfosfát. Jeho přeměna je podstatná pro rychlost hydrolyzy ATP (20 – 60 $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$ proteinu za min). V nepřítomnosti nukleotidů je enzym převážně ve stavu E_1 , během ATP hydrolyzy pak hladina E_2 narůstá. Transportní krok zahrnuje hydrolyzu 1 ATP za současného vyloučení 1 H^+ . Protony se váží na E_1 formu na vnitřním membránovém povrchu a jsou uvolňovány z E_2 formy na venkovním povrchu. V nepřítomnosti substrátu jsou vazebná místa obou povrchů většinou neprotonovaná a pumpa je udržována v rovnováze, v okamžiku acidifikace cytoplasmy však pumpa značně zrychlí svou činnost. Analogicky ji může spouštět okyselení vnitřku buňky během glukosou indukované acidifikace, zatímco konečně nízké extracelulární pH způsobí nárůst obsazení H^+ -vazebných míst na vnějším povrchu, tudíž pumpu zpomalí.

Zasoba energie pro živinový H^+ -symport je jednou z fyziologických rolí ATPasy, jinou je její účast na regulaci buněčného pH. Ke konci exponenciální fáze rustu *S. cerevisiae* dvakrát až třikrát klesá aktivita jejich ATPas. Aktivita enzymu se liší u buněk pěstovaných na různých cukrech v závislosti na způsobu, jakým jsou tyto cukry transportovány do buňky. ATPasa je vratně aktivována glukosou, maltosou, trehalosou a galaktosou. Tento proces je doprovázen nárůstem fosforylace enzymu, zásaditým posunem v pH optimu a zvýšením afinity k ATP (Sigler a Höfer, 1991).



Obr.2-4 Schéma transportních dějů v plasmatické membráně kvasinek. Modifikovaný obrázek z práce Fernández a kol. (1991).

Acidifikační scénář:

- 1) Glukosa je rychle přijímána buňkami a je fosforylována na membráně vhodnými kinasami. Fosforylace má za následek okamžité vnitřní okyselení díky uvolňování protonů ve fosforylační reakci. Vnitrobuněčné okyselení může způsobit otevření iontových kanálů v membráně, což přináší depolarizaci membrány, její rozsah zásadně závisí na vnějším pH (obr.2-4).
- 2) Následně je H^+ -ATPasa fosforylována na glukose závislou reakcí a její aktivita vzrůstá. Ve stejnou dobu se snižuje hladina vnitrobuněčného ATP kvůli fosforylaci substrátu (a tvorbě cAMP) tak, že buněčný energetický mechanismus (buněčné dýchání) je silně stimulovaný.
- 3) Rozmach tvorby CO_2 redukuje hyperpolarizační efekt enzymu a spolu s únikem iontů vede k nárůstu ΔpH .
- 4) Zvýšení ΔpH je spojeno s přijímáním K^+ ; glukosa vedle aktivování H^+ -ATPasy, aktivuje také kvasinkový systém přijímání K^+ . Navzdory jeho částečné kompenzaci vypouštěním H^+ , masivní přítok K^+ do buňky způsobuje pomalou, ale trvalou membránovou depolarizaci a alkalizaci vnitřku buňky.
- 5) Vyšší vnitřní pH_i nadále blokuje K^+ kanály a při nízkém $\Delta\psi$ proudí K^+ ven z buněk. Tento K^+ proud může být kompenzován odtokem organických aniontů (sukcinátu aj.), které se nahromadily v buňkách.
- 6) Vyčerpání glukosy přináší postupné navýšení pH_0 (protože méně energie je potřeba pro H^+ -ATPasu) a slabý nárůst $\Delta\psi$ kvůli značnému odtoku K^+ . Při anaerobních podmínkách přetrvává značně dlouho extracelulární hladina organických kyselin, zatímco při aerobních jsou kyseliny znovu přijímány buňkami (Sigler a Höfer, 1991).

Acidifikace bez substrátu:

Mechanismus acidifikace *S. cerevisiae* v nepřítomnosti substrátu závisí na hladině kyslíku v suspenzi. Okysličení suspenze v nepřítomnosti substrátu výrazně ovlivňuje proudění K^+ skrz membránu, buněčnou hladinu ATP a jiné charakteristiky. Okysličení, které s sebou nese obvykle přechodné okyselení média, může být způsobeno rozptýlením buněk v čerstvém médiu (vzduchové bubliny), nebo přidáním peroxidu vodíku do buněčné suspenze.

Přenos buněk do čerstvého média s obsahem kyslíku vyvolá dočasný nárůst endogenního dýchání podobný tomu, jaký je pozorován při přidání substrátu. Schopnost buněk spontánně okyselovat prostředí při přechodu do čerstvého média závisí na růstové fázi a slábne s hladověním. Spontánní okyselení nenastává u respiračně deficientních mutantů a u kyanidem ošetřených buněk. Jedná se tedy o stimulaci endogenního dýchání a produkci CO_2 analogickou k té, co následuje okamžitě po přidání substrátu.

Stejně jako substrátem indukovaná acidifikace, tak i spontánní acidifikace je ovlivněna aerobním hladověním, které vede k tvorbě amoniaku v deaminačních reakcích. Hladovění má také za následek snížení buněčné hladiny ATP a pokles počáteční rychlosti endogenního dýchání. Součet spontánní a substrátem indukované acidifikace, měřený při definovaných podmínkách, který odráží schopnost buněk mobilizovat endogenní substráty a využít exogenní, klesá lineárně s pokračujícím hladověním.

Samotné provzdušnění média bez přítomnosti substrátu může aktivovat membránovou H^+ -ATPasu. Přidání H_2O_2 k suspenzi kvasinek přináší vývoj kyslíku následovaný intenzivním dýcháním. Extracelulární pH může poklesnout až na $\approx 3,5$. Proces tedy zahrnuje aktivaci H^+ -ATPasy, poněvadž hodnoty vnějšího pH $< 4,5$ není možné dosáhnout pouze pomocí CO_2 , avšak nedochází k žádnému vypouštění organických kyselin a přílivu K^+ do buňky. Na rozdíl od glukosou indukované acidifikace, se zdá být H^+ odtok kompenzován draselnými kationty. Když extracelulární hladina K^+ poklesne pod určitou úroveň, peroxidem indukovaná acidifikace hyperpolarizuje membránu, a tak se zastaví jak další vylučování H^+ , tak endogenní dýchání, ačkoliv by zbývající hladina O_2 v suspenzi stačila pro jeho další pokračování (Sigler a Höfer, 1991).

2.3.3. Vitalitracce a jiná měření vitality kvasnic založená na změně pH média

Mezi kvantitativní metody určování vitality kvasnic patří měření obsahu glykogenu v buňkách, redukčního potenciálu kvasinek, uvolňování CO_2 nebo třeba stanovení specifické rychlosti přijímání kyslíku. Avšak tyto metody jsou většinou časově náročné na rozdíl od AP testu Opekarové a Siglera (1982). Acidifikační síla (AP) vyjadřuje součet změny pH, k níž dojde po rozptýlení kvasinek ve vodě, a substrátem indukované změny pH po přidání glukosy k suspenzi, AP odráží hladinu buněčných zdrojů energie. Buňky, jejichž AP se pohybuje mezi 2,5 a 1,5, jsou v dobrém fyziologickém stavu, ty s hodnotami AP v intervalu od 1,0 do 0 jsou částečně poškozené a kvasinky s $\text{AP} < 0$ jsou již značně poničené.

Rodrigues a kol. (2004) vyvinuli novou metodu na určování vitality kvasinek nazvanou vitalitracce, jež je schopna předpovědět i kvasnou schopnost. Principem vitalitracce je změření času, jaký potřebují kvasinky na změnu pH okolního prostředí z pH 10 na 6,5. Čas nutný ke snížení pH na 6,5 je ve vztahu k produkci CO_2 a protonů jako metabolických ukazatelů. Kvasinky s lepší metabolickou aktivitou totiž snižují pH rychleji. Během testování nebyly buňkám poskytnuty žádné vnější zdroje energie, a tak byly protony a CO_2 produkovány výhradně z vnitřních zásob energie, což také svědčí o vitalitě buněk. Test tedy nepřímou ukazuje velikost těchto zásob. Výsledky vitalitracce se dobře shodují s acidifikačním testem.

Patino a kol. (1993) se rozhodli používat jako indikátor metabolické aktivity kvasinek tzv. CAP (Cumulative Acidification Power). Jedná se pouze o jiné zpracování výsledků acidifikačního testu. Hodnoty pH zaznamenávané v minutových intervalech se přepočtou na koncentraci protonů, dále se vypočte absolutní změna koncentrace protonů (PACC) jako absolutní rozdíl mezi po sobě následujícími koncentracemi protonů. CAP

tvorí součet dvaceti PACC hodnot. Vyšší citlivost CAP oproti AP není zapříčiněna jen eliminací logaritmické škály, ale i skutečností, že CAP bere v úvahu nemonotónní charakter acidifikační křivky. Rozdíly obou přístupů jsou ilustrovány tabulkou 2-2, kde G označuje kvasinky, jež byly po 56 generaci pěstovány v mladině s obsahem glukosy, M pak buňky kultivované v maltosové mladině a G/M značí kvasinky G, které byly poprvé po 56 generacích kvašeny s maltosou. V tabulce 2-2 jsou taktéž uvedeny výsledky acidifikačních testů, v kterých byla jako substrát použita glukosa anebo maltosa.

Tabulka 2-2: Srovnání hodnot acidifikační síly (AP) a kumulativní acidifikační síly (CAP). Podle Patino a kol. (1993)

druh kvasinek	AP		CAP ($\cdot 10^{-6}$)	
	glukosa	maltosa	glukosa	maltosa
G	2,27	2,202	93	31
M	2,15	2,19	86	83
G/M	2,13	2,03	84	81

CAP profily lépe vystihují metabolické odlišnosti mezi kvasinkami. CAP G kvasinek nabývá trojnásobné velikosti, když je k buňkám během acidifikačního testu přidána glukosa oproti maltose. U kvasinek M činí rozdíl v CAP pro oba substráty pouze 3,6 %.

3. Experimentální část

3.1. Bližší seznámení se zkoumanými kmeny kvasinek *S. cerevisiae*

V této práci jsme se zaměřili na pivovarské kmeny kvasinek spodního kvašení. Kvašení piva při použití těchto kmenů probíhá asi 7 dnů při teplotách pod 15°C a po skončení fermentace kvasinky sedimentují. Kmeny svrchního kvašení fermentují kratší dobu při teplotách kolem 20°C a kvasinky jsou na konci kvašení vynášeny na povrch tekutiny. Pro některé experimenty jsme využili také pekařské droždí. Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* používané pro výrobu pekařského droždí nemají na rozdíl od pivovarských kmenů genetické sklony k flokulaci, protože flokulace buněk by vedla k produkci droždí krupičkovité konzistence a horší kvality (Janderová a Bendová, 1999).

Sbirka pivovarských kmenů Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS) obsahuje 115 kmenů pivovarských kvasinek. Pro účely diplomové práce bylo vybráno 10 kmenů, jejichž některé provozní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 3-1. Podrobněji jsme se věnovali kmenu 95 vzhledem k jeho oblibě v českých pivovarech.

Tabulka 3-1: Provozní charakteristika používaných kmenů

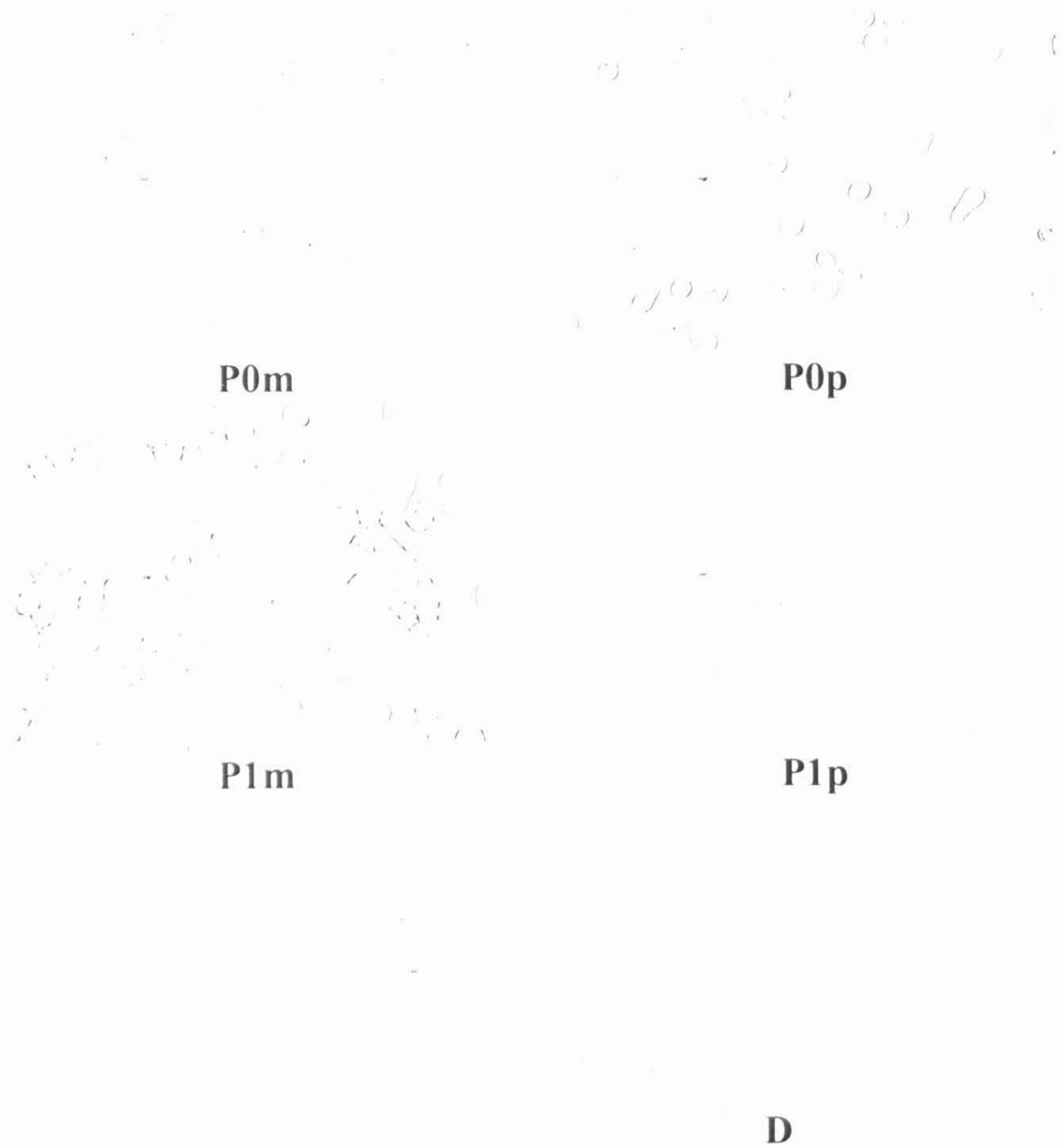
Kmen	Prokvašení mladiny	Sedimentace
3	středně	
6	středně	velmi dobrá
8		
9	středně	dobrá
11	hluboko	
12	středně / hluboko	velmi dobrá
26	hluboko	dobrá
32	středně	dobrá
95	hluboko	dobrá
98	hluboko	dobrá

Experimenty byly prováděny v několika etapách. Na obrázku 3-1 jsou zachyceny buňky pivovarských kvasinek kmene 95 z pivovaru, kde byly použity pro kvašení piva v cylindro-kónických tancích při teplotě 12°C. Jedná se o synchronizované kultury buněk ve stacionární fázi růstu. Populace kvasinek, jež prošla jedním kvašením v cylindro-kónickém tanku (P1m, P1p), i ta, která měla být teprve použita pro kvašení (P0m, P0p), obsahovaly velmi rozmanité buňky co do velikosti i tvaru, ale žádná z nich nebyla ve stadiu pučení. Několikanásobné promytí buněk v destilované vodě a citrát-fosfátovým pufru s roztokem EDTA a následné uchování těchto kvasinek v citrát-fosfátovém pufru tyto buňky (P0p, P1p) nijak viditelně nepoškodilo. Tuto sérii vzorků doplňuje pekařské droždí (obr 3-1 D), jehož buňky jsou drobnější a kulatější než buňky pivovarského kmene.

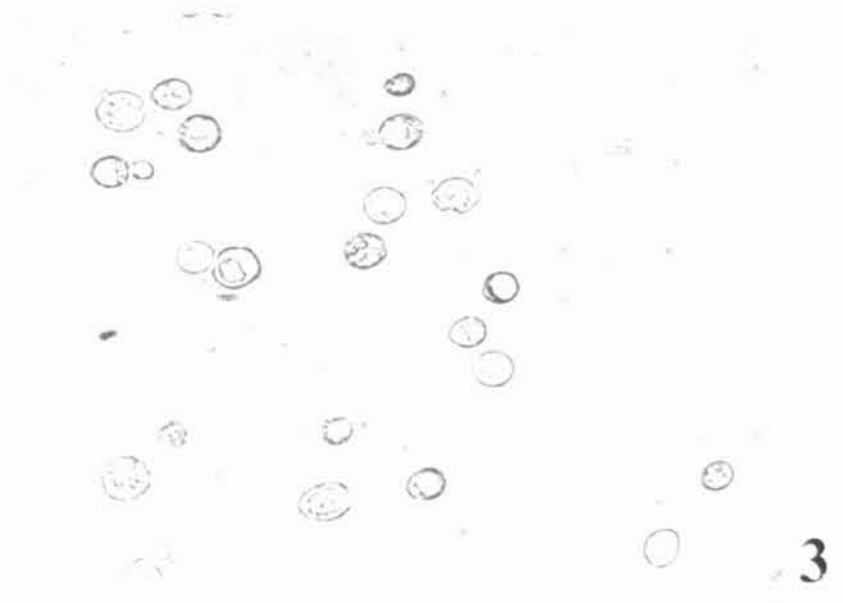
Na obrázku 3-2 je zobrazeno oněch 10 kmenů pivovarských kvasinek, jejichž charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 3-1. Na rozdíl od předešlých průmyslově pěstovaných kvasinek, obsahovaly tyto vzorky množství pučících buněk v různém stadiu pučení. Tyto kvasinky byly laboratorně pěstovány v mladině v kvasných válcích a po devíti či deseti dnech fermentace byly odděleny od mladého piva. Kvasinky byly

tříkrát promyty destilovanou vodou a podrobeny acidifikačním testům, dále byly promyty podle procedury popsané v kapitole 3.3. a změřeny jejich sedimentační křivky i velikosti buněk pod mikroskopem. Postup a výsledky kvantitativní analýzy kvasinek, jejichž vzorky jsou na obrázcích 3-1 až 3-3, je možné nalézt v kapitole 4.1.

Flokulace byla studována opět na kvasinkách z kmene 95 a to, jak z pivovaru (obr.3-3a), tak z malého pokusného CKT ve VÚPS (obr.3-3b), tj. z provozních i poloprovazních podmínek. Ve vzorku z VÚPS byly nalezeny pučící buňky, což by naznačovalo, že kvasinky nebyly odebrány ve fázi, kdy by měly mít nejvyšší sklony k flokulaci. Toto je také patrně jedním z důvodů, proč tyto kvasinky flokulovaly hůře než ty z pivovaru, mezi nimiž se pučící buňky nevyskytovaly.



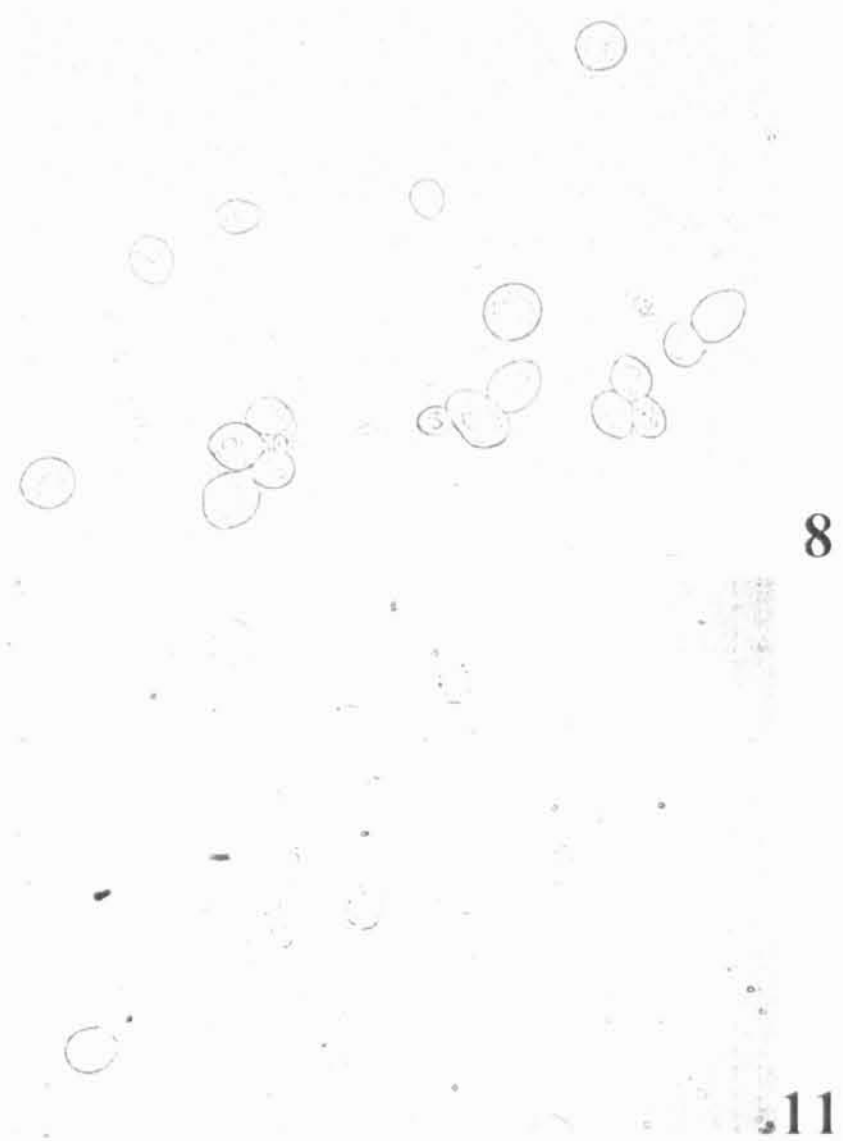
Obr.3-1 Mikroskopické snímky kvasnic. P0m označuje pivovarské kvasinky odebrané před nasazením v cylindro-kónickém tanku uchovávané v mladině, P0p pak označuje tytéž kvasnice po promytí v destilované vodě a citrát-fosfátovém pufru. Obdobně P1m a P1p jsou označení kvasnic odebraných po prvním kvašení v CKT. Poslední snímek (D) zobrazuje buňky pekařského droždí rozptýlené v citrát-fosfátovém pufru.



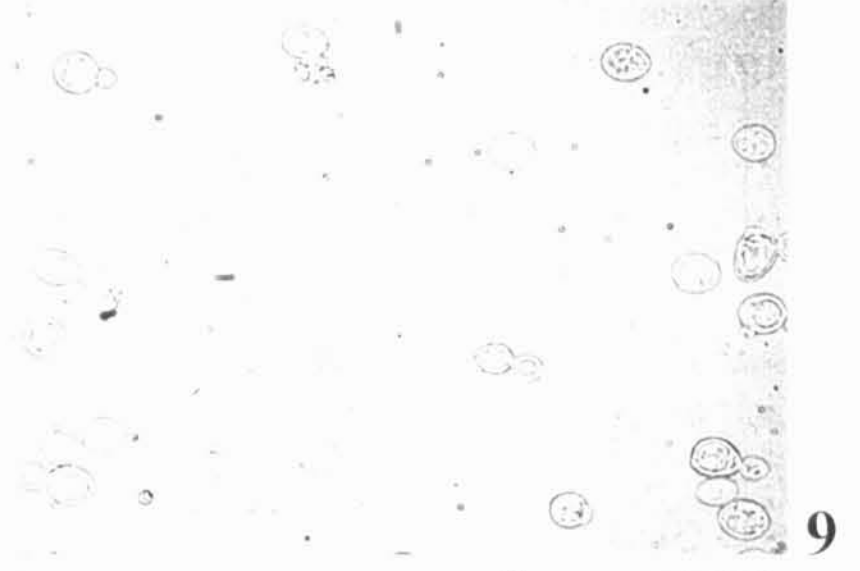
3



6



8



9



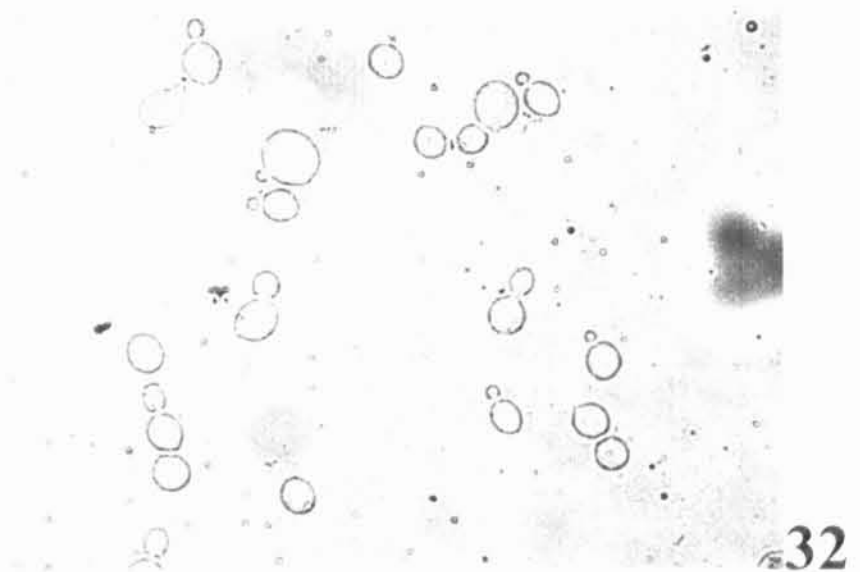
11



12



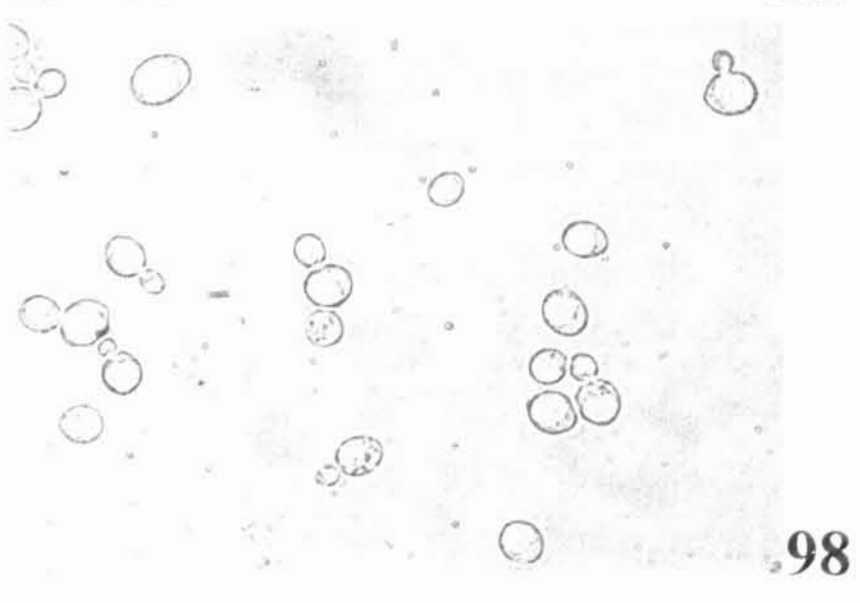
26



32

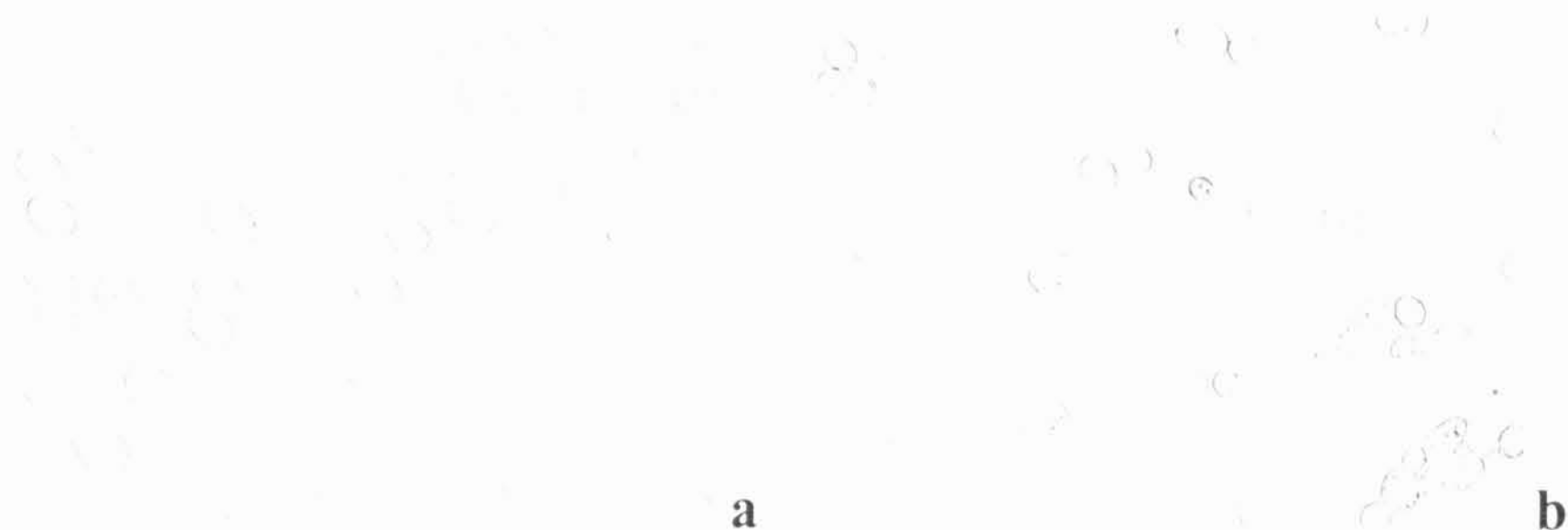


95



98

Obr.3-2 (Na předchozí straně) Mikroskopické snímky deseti kmenů pivovarských kvasinek. Čísla u obrázků se shodují s čísly, pod kterými jsou tyto kmeny vedeny ve sbírce kvasinek ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském (VÚPS). Charakteristiky jednotlivých kmenů lze najít v tabulce 3-1.

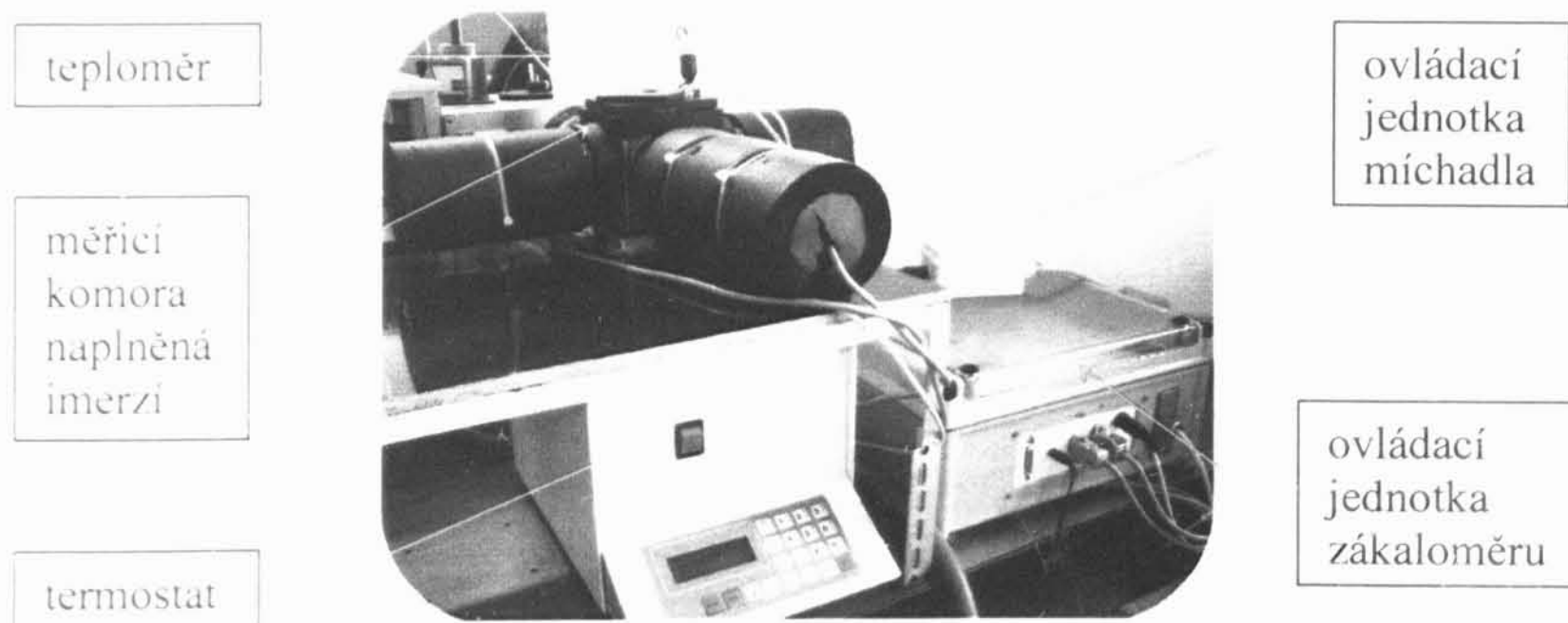


Obr.3-3 Mikroskopické snímky kvasinek kmene 95. a) kvasinky z cylindro-kónického tanku z pivovaru, b) kvasinky odebrané z pokusného cylindro-kónického tanku ve VÚPS.

3.2. Měřicí aparatury

3.2.1. Aparatura pro měření sedimentace a flokulace

Fotografie zákaloměru (UZLP), který jsme používali pro měření sedimentace a flokulace, je na obr. 3-4. Hlavní součástí zákaloměru je tepelně izolovaná měřicí komora, jež je naplněna destilovanou vodou, do níž je ponořen teploměr. Destilovaná voda tak slouží k termostatování vzorků i jako imerze. Zákaloměr je vybaven vnějším termostatickým systémem, který je schopný udržet dlouhodobě konstantní teplotu v měřicí komoře, a to v rozsahu 15 – 40°C. Nedílnou součástí zákaloměru je ovládací jednotka, která je propojena s počítačem. Flokulaci kvasinek jsme iniciovali magnetickým míchadlem, jehož motorek je umístěn na dně měřicí komory. Díky ovládací jednotce lze míchání vypnout bez přerušení nahrávání dat.



Obr.3-4 Aparatura pro měření sedimentace a flokulace kvasinek (UZLP), kterou vyvinul a zhotovil kolektiv Oddělení optotermální spektroskopie KCHFO pod vedením RNDr. Miroslava Dienstbiera a doc. Ing. Petra Sladkého, CSc.

Zákaloměrem lze určit koncentraci, velikost buněk případně i jiné vlastnosti kvasničné suspenze. Kvasinky v roztoku se chovají jako rozptylová centra, na kterých se rozptyluje úzký paprsek světla. Zdrojem světla v zákaloměru je LED dioda s vlnovou délkou 660 nm. Záření emitované diodou prochází soustavou čoček skrz skleněné okénko do měřicí komory, v jejímž středu se nachází zkumavka se vzorkem. Část záření se po interakci se vzorkem rozptýlí a část projde. Podle směru, v kterém rozptýlené světlo registrujeme, rozeznáváme transmisí (detektor záření je umístěn ve směru paprsku vycházejícího ze zdroje), nefelometrií (paprsek světla je buňkou rozptýlen do směru kolmého na původní směr paprsku) a dopředný rozptyl, při němž zaznamenáváme záření odchylené o malý úhel blízký 15° . Používaný turbidimetr umožňuje registrovat elastický rozptyl světla ve všech třech úhlech současně. Výstupními údaji jsou Zn a Zf, tj. zákaly, které jsou dány poměrem intenzity světla rozptýleného do úhlu 90° či 15° a intenzity prošlého záření, tyto poměry jsou dále přepočítávány pomocí kalibrační křivky zákalového standardu. Jako zákalový standard se používá roztok formazinu a výsledný zákal se pak udává v jednotkách EBC (European Brewery Convention).

Další možnosti uplatnění zákaloměru lze najít v publikacích Gabriel a kol. (1994), Sladký a Cisařová (1999), Sladký a kol. (1998, 2001) nebo Sladký a Dienstbier (2001 a 2003).

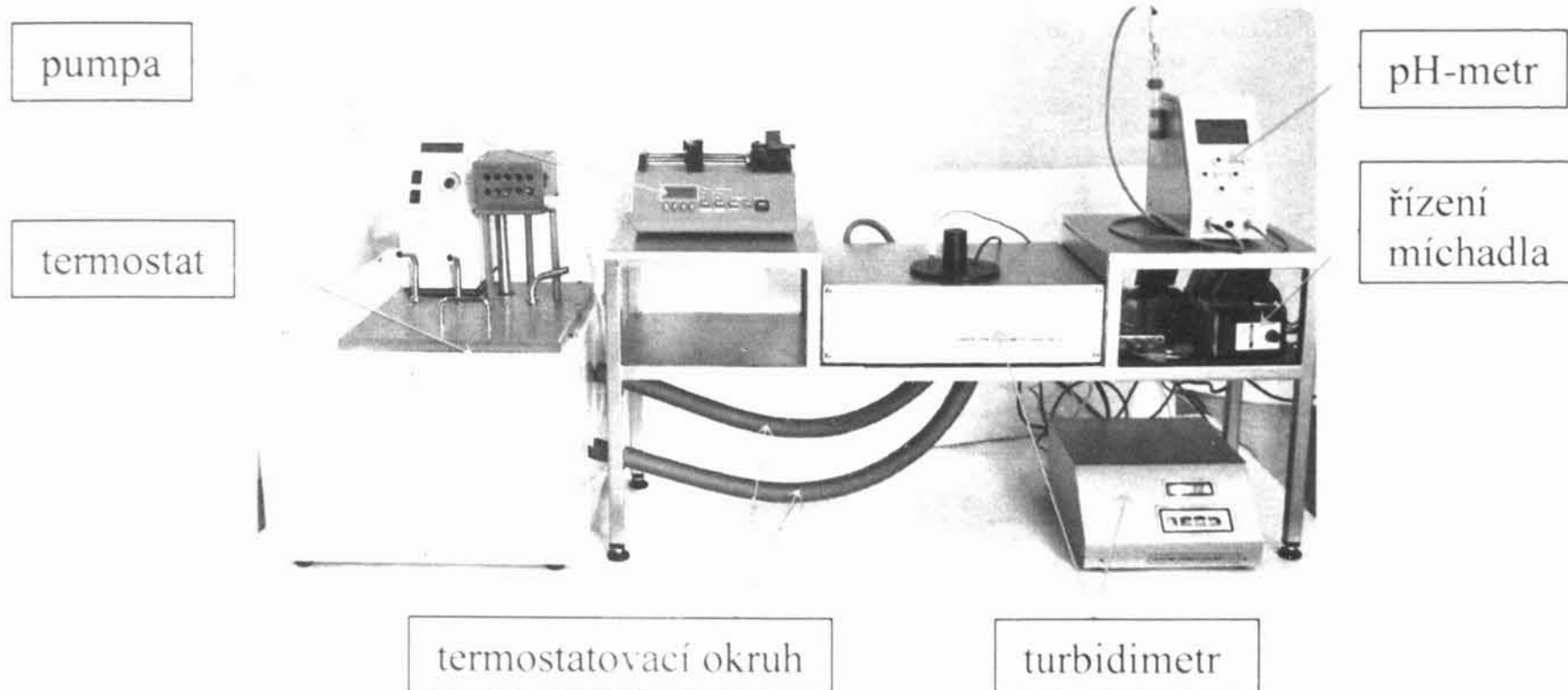
3.2.2. Aparatura pro měření acidifikačních testů

Především za účelem měření acidifikačních testů byl v roce 2005 pod vedením RNDr. Miroslava Dienstbiera v rámci spolupráce s VÚPS sestaven prototyp turbidimetrické titrační aparatury, jehož součástí je i laboratorní turbidimetr/zákalometr LT01. Tato aparatura (obr.3-5) je vybavena výkonnějším termostatem s kapalinovou lázní, jenž je schopný pracovat v širokém intervalu teplot od -10°C až po $+80^\circ\text{C}$ s přesností $\pm 0,1^\circ\text{C}$. V lázni termostatu je kromě standardního čerpadla, které lze použít k míchání lázně či termostatování vnějšího zařízení kapalinou z lázně termostatu, ještě navíc nezávislé čerpadlo spojené s teplotním výměníkem a výstupem mimo termostat. Takto je realizován uzavřený cirkulační okruh s oběhem imerzní kapaliny v měřicí komoře zákalometru. Oddělení tohoto okruhu od kapaliny v lázni termostatu umožnilo minimalizovat objem kapaliny, kterou lze jednoduše měnit bez nutnosti vypouštění celé naplně termostatu a udržovat tak imerzní kapalinu v zákalometru čistou, což je nezbytné pro jeho správnou měřicí funkci.

V této aparatuře je zařazen i pH-metr se skleněnou elektrodou vybavený externím teploměrem a magnetické míchadlo s regulovatelnou rychlostí míchání. Také optická část doznala drobných změn, tudíž zákalometr poskytuje údaje v nefelometrickém a transmisním kanálu. Vzhledem k rozměrům měřicí komory lze provádět měření vzorků o objemech 5 – 200 ml v závislosti na použitém typu vzorkovnice a v rozsahu zákalů od 0 do 1000 EBC.

Podobně jako UZLP lze i turbidimetr LT01 vybavit dávkovací pumpou s možností programového nastavení a řízení řady funkcí (rychlost dávkování, požadovaná dávka titrantu, proměnlivá rychlost dávkování, zpoždění...). Podrobnosti o technických možnostech turbidimetru LT01 lze nalézt v textu Dienstbiera a kol. (2005).

Všechny součásti aparatury LT01 (stejně tak UZLP) lze plně ovládat ručně nebo počítačem. Řídicí program MZN, jenž z větší části vytvořil Mgr. Petr Gabriel, komunikuje s jednotlivými přístrojovými komponentami, zobrazuje graficky průběh měřených veličin (hodnotu pH, turbidity-zákalu, teploty) na obrazovce PC a současně je ukládá do souboru pro následné zpracování a vyhodnocení.



Obr.3-5 Laboratorní turbidimetr/zákalometr LT01. Aparaturu vyvinul a zhotovil kolektiv Oddělení optotermální spektroskopie KCHFO pod vedením RNDr. Miroslava Dienstbiera.

Při měření všech acidifikačních testů byla rychlost míchání nastavena na první stupeň a termostat byl nařízen na 25°C. V době měření neměl pH-metr připojený teploměr, tj. pracoval s automatickou korekcí teploty na 25°C.

3.3. Příprava vzorků a metody měření

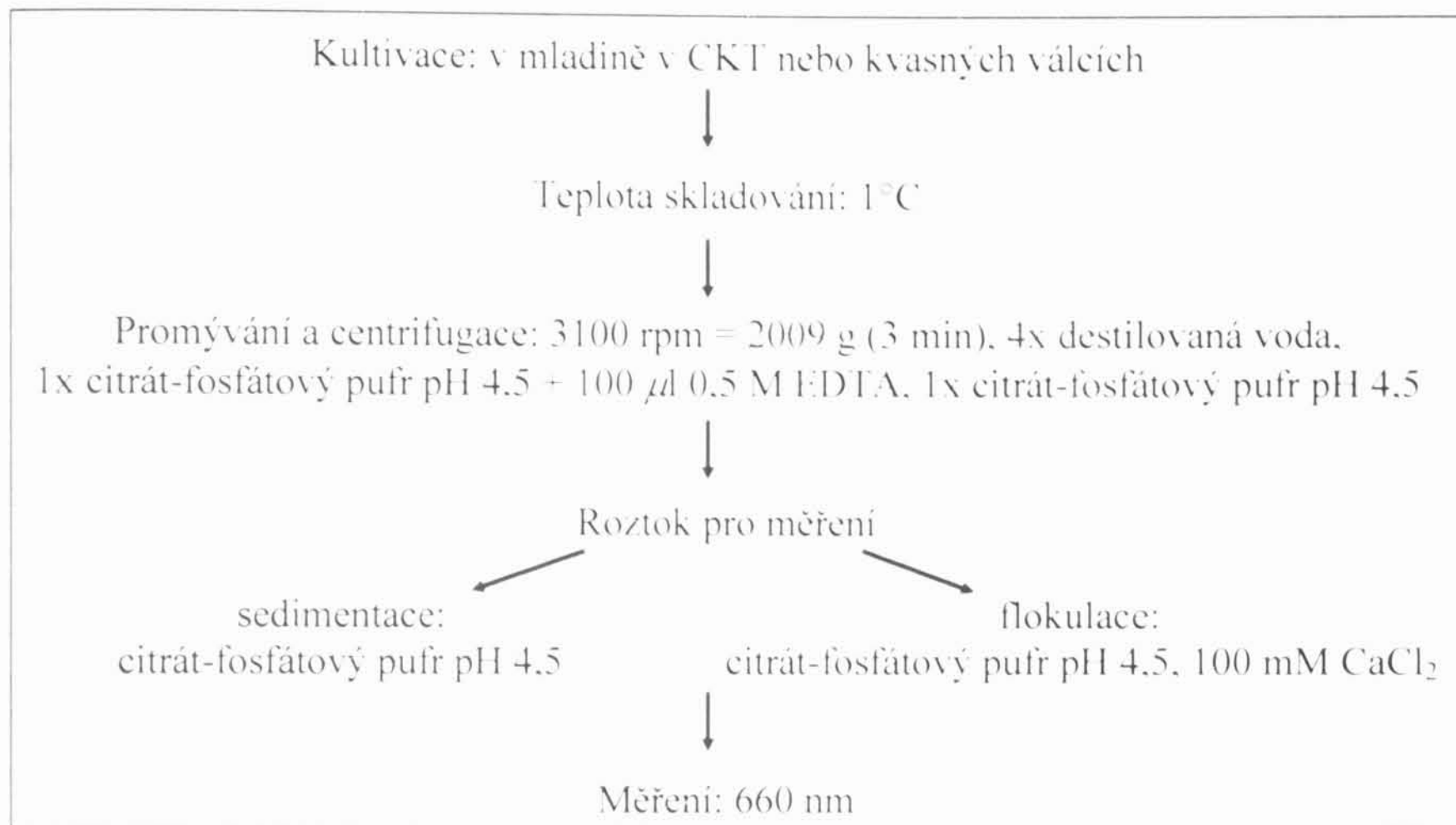
Po prostudování literatury zabývající se měřením flokulace kvasinek jsme shledali, že žádná z popsaných metod přípravy vzorků a jejich měření není plně použitelná v našich podmínkách. Proto jsme přistoupili k vyvinutí nové metody, která do jisté míry čerpá z publikací citovaných v kapitole 2.2.

Kvasinky odebrané v pivovaru z CKT rozmícháme v mladině, 100 až 200 ml této suspenze přelijeme do 0,5 l lahví a doplníme destilovanou vodou. Suspenzi protřepeme a necháme alespoň 30 min v klidu při teplotě 1°C. Tímto postupem výrazně zpomalíme doposud probíhající proces kvašení piva a značně si tak usnadníme další manipulaci s kvasinkami. Po uplynutí daného času odpipetujeme 10 ml kvasničné suspenze do centrifugačních zkumavek.

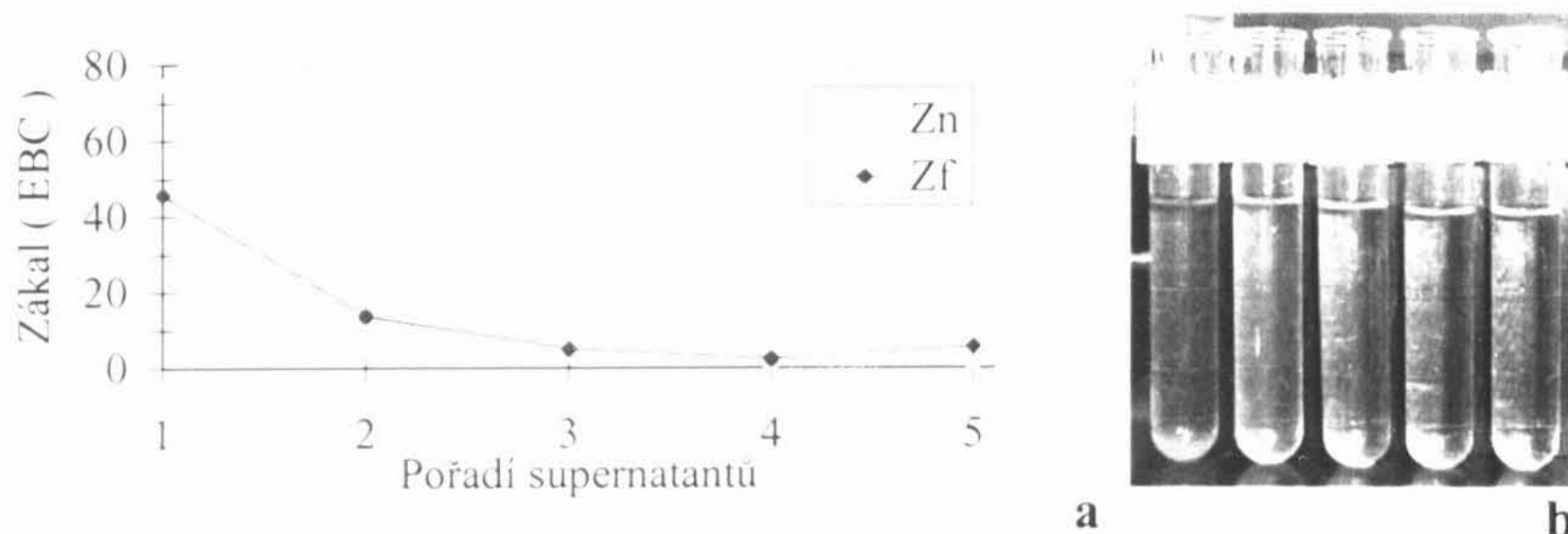
Obsah zkumavek důkladně rozmícháme a centrifugujeme 3 min při 3100 rpm (2009 g). Slijeme supernatanty a sedimenty doplníme destilovanou vodou do 10 ml, protřepeme a opět centrifugujeme, postup opakujeme třikrát. Jako pátý mycí roztok použijeme 100 µl 0,5 M EDTA (výsledná koncentrace 5 mM EDTA) a citrát-fosfátový pufr pH 4,5. Poté kvasinky promyjeme samotným citrát-fosfátovým pufrem (pH4,5), avšak tento supernatant již neslíváme a kvasinky v něm skladujeme při teplotě 1°C. Tímto postupem (obr.3-6) lze kvasinky účinně promýt a zároveň zbavit flokulace, a to i při vysokých koncentracích (kvasinkový sediment nezřídka zaujímal až 50 % objemu vzorku).

Promýváním odstraníme z povrchu kvasinek zbytky růstového média i případné produkty metabolismu a snížíme chybu dalšího měření. Hodnoty zákalů supernatantů z obrázku 3-7b jsou zaznamenány v grafu na obrázku 3-7a. Optimálním řešením se ukázalo být pět promývacích cyklů (šestý mycí roztok sloužil zároveň jako skladovací), protože vyšší počet mytí již nepřinášel požadované zlepšení. Dále si lze povšimnout mírného zvýšení zákalu při použití citrát-fosfátového pufru (pH 4,5) s EDTA, které je

pravděpodobně způsobeno uvolněním některých látek z povrchu buněk právě v důsledku změny pH roztoku.



Obr.3-6 Schéma metody měření sedimentace a flokulace kvasnic



Obr.3-7 Supernatanty z mytí pivovarských kvasinek. a) Vývoj zákalů supernatantů z promývání kvasinek. Zn označuje zákal roztoku měřený v úhlu 90°, Zf vyjadřuje zákal roztoku měřený v úhlu 15°. b) Fotografie supernatantů z mytí kvasnic, pořadí supernatantů je stejné jako v obr.3-7a. Autorem designu zkumavkového stojanu je doc. Ing. Petr Sladký, CSc.

Kostku pekařského droždí rozmícháme v destilované vodě a buňky promyjeme stejně jako pivovarské kvasinky. Droždí, které nemá přirozené sklony k aglutinaci, jsme použili jako standard pro vyladění promývací procedury. Ze srovnání průběhu sedimentační křivky pekařského droždí (obr.4-4 nahoře) a pivovarských kvasinek (obrázky 4-2 a 4-3 nahoře) v několika prvních minutách měření vyplývá, že navržená koncentrace roztoku EDTA je dostatečná, aby zabránila nechtěné flokulaci pivovarských kvasinek.

Na VÚPS bylo vypěstováno a třikrát promyto destilovanou vodou 10 kmenů pivovarských kvasinek. Odstředěné kvasinky jsme zalili 1 ml destilované vody a přes noc uskladnili při teplotě 1°C. Před měřením jsme suspenzi rozředili 39 ml destilované vody s pH 6.3 a důkladně protřepali. Pro acidifikační test jsme použili 15 ml této

suspenze, zbytek jsme odstředili a promyli pufrům s přídavkem EDTA, abychom dodrželi přípravu vzorku pro měření sedimentace kvasinek.

Na obrázku 3-6 je naznačen sled činnosti předcházejících měření sedimentace a flokulace kvasinek. Z promytých kvasnic slijeme supernatant (šestý mycí roztok) a naředíme je citrát-fosfátovým pufrům pH 4,5. Do zkumavky odpipetujeme 5 ml vzorku a v termostatovaném zákaloměru při teplotě 25 °C naměříme sedimentační křivku. Obdobně si počínáme při měření flokulace s tím rozdílem, že do zkumavky odpipetujeme pouze 4 ml kvasničné suspenze a vložíme magnetické míchadlo. Po první minutě míchání přidáme ke vzorku 1 ml citrát-fosfátového pufru, který obsahuje 0,5 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, výsledná koncentrace $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tak bude 100 mM. Poté, co se vytvoří shluky kvasnic a soustava dospěje do rovnovážného stavu, vypneme míchání. Tento okamžik je však kmenově závislý.

Při měření acidifikačních testů deseti pivovarských kmenů jsme vycházeli z prací Siglera a kol. (1981) či Opekarové a Siglera (1982). Kvasinky jsme rozmíchali v destilované vodě s upraveným pH 6,3 a 15 ml této suspenze jsme co nejrychleji odpipetovali do zkumavky, vložili do ní magnetické míchadlo, zasunuli pH sondu a spustili měření AP testu na turbidimetru LT01. Během 10 minut jsme zaznamenali první fázi acidifikačního testu bez přidaného substrátu, přibližně po 10 minutách jsme pomocí roztoku NaOH vyrovnali pH na 6,3, s výjimkou kmene 98, kde bylo nutno použít ještě několik kapek zředěné kyseliny chlorovodíkové na opětovné snížení pH. Po ustálení hodnoty pH kolem 6,3 jsme ke vzorku přidali 750 μl 21,8 % roztoku glukosy. Kmeny byly proměřovány v pořadí: 32, 3, 6, 8, 9, 11, 12, 26, 95 a 98, všechny acidifikační testy jsme uskutečnili v jeden den.

V experimentech jsme používali destilovanou vodu, přesněji řečeno deionizovanou vodu s vodivostí menší než $0,5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ upravenou reverzní osmózou zařízením Aqual 35. Zmiňovaný 10 mM citrát-fosfátový pufr jsme připravovali tak, že po rozpuštění 3,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a. od firmy Penta) v 1 litru destilované vody jsme po kapkách přidávali koncentrovaný roztok kyseliny citrónové (p.a., Lach-Ner, s.r.o.) až do nastavení požadovaného pH. Dále jsme používali $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA) a $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ od firmy Sigma a glukosu, jejímž výrobcem byla firma Lachema.

4. Výsledky měření

4.1. Sedimentace kvasnic

Na částici s hmotností m působí v kapalině o hustotě ρ a viskozitě η tři síly: tíhová síla G , vztlaková síla F_1 a odporová síla prostředí F_2 (Stokesův zákon). Částice o objemu V se pohybuje v kapalině rychlostí v . Pro velikost sil platí:

$$G = mg \quad (1)$$

$$F_1 = V\rho g \quad (2)$$

$$F_2 = 6\pi\eta rv \quad (3)$$

Po jistém čase se těleso pohybuje rovnoměrně přímočaře a síly G , F_1 a F_2 jsou v rovnováze.

$$G - F_1 - F_2 = 0 \quad (4)$$

Ze vzorce (4) můžeme po několika úpravách vypočítat velikost rychlosti sedimentace kulové částice.

$$mg - \frac{4}{3}\pi r^3 \rho g - 6\pi\eta rv = 0 \quad (5)$$

$$v = \frac{(3m - 4\pi r^3 \rho)g}{18\pi\eta r} \quad (6)$$

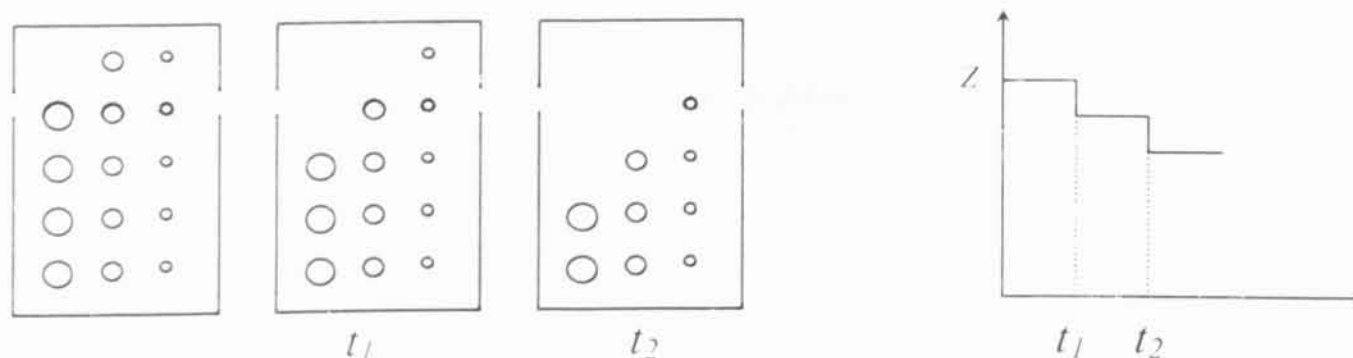
$$v = \frac{2(\rho_t - \rho)r^2 g}{9\eta} \quad (7)$$

V poslední rovnici ρ_t označuje hustotu tělesa, které se v kapalině pohybuje. Jelikož kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* tvoří nejčastěji buňky ve tvaru rotačního elipsoidu, modifikujeme vzorec (7).

$$v = \frac{2g(\rho_t - \rho) \sqrt[3]{a^2 b^4}}{9\eta}, \quad (8)$$

kde a reprezentuje velikost velké poloosy a b vyjadřuje velikost malé poloosy elipsoidu. Hustota kvasničných buněk se pohybuje mezi $1070 - 1090 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, buňky rodu *Saccharomyces cerevisiae* nejčastěji dosahují délek $3 - 15 \mu\text{m}$ a šířek $3 - 4 \mu\text{m}$. Ze vzorce (8) je patrné, že existuje přímá souvislost mezi velikostí částice a její sedimentační rychlostí. Proto jsme se rozhodli konfrontovat výsledky získané ze zákaloměru s měřením velikosti buněk pod mikroskopem.

Vzorek kvasnic vložíme do zákaloměru a v kinetickém módu programu MZN nahrajeme průběh sedimentace kvasinek. Předpokládejme, že na začátku experimentu v čase $t = 0$, jsou rozptylová centra o poloměrech $r_1 > r_2 > r_3$ rozmístěna rovnoměrně v celém objemu suspenze (obr.4-1).



Obr.4-1 Model sedimentace kvasinek a poklesu zákalu suspenze.

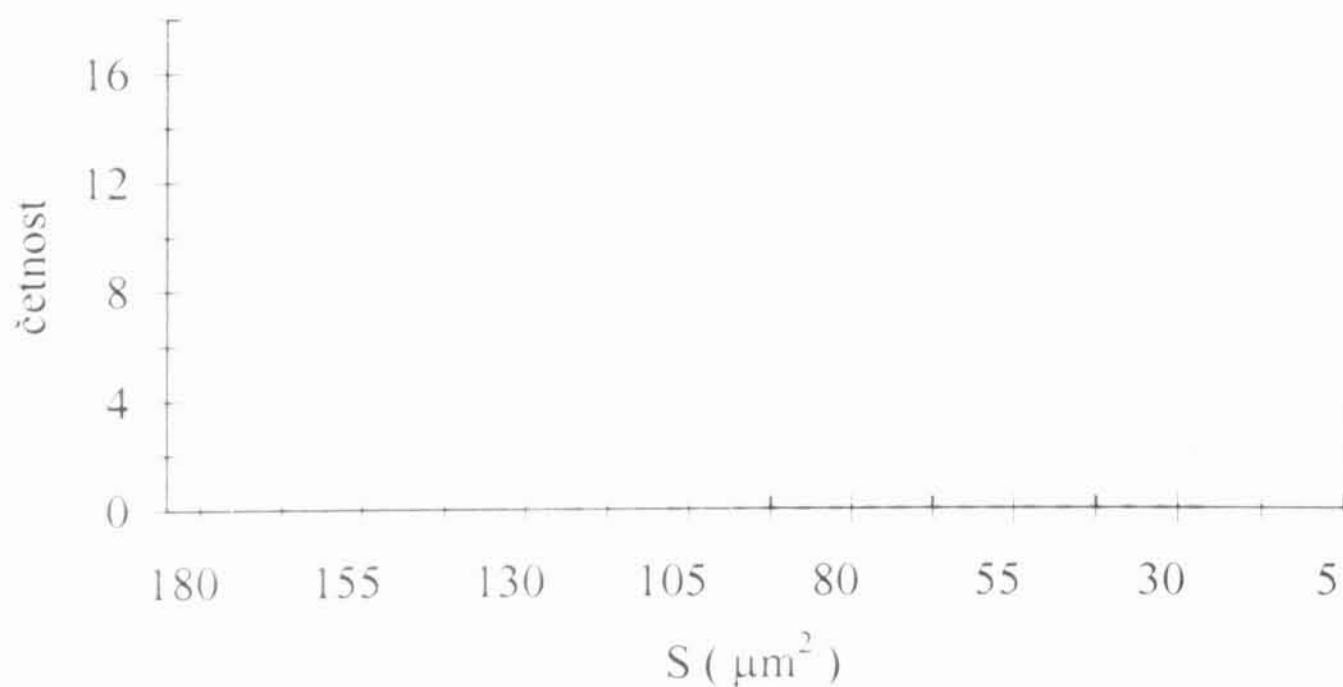
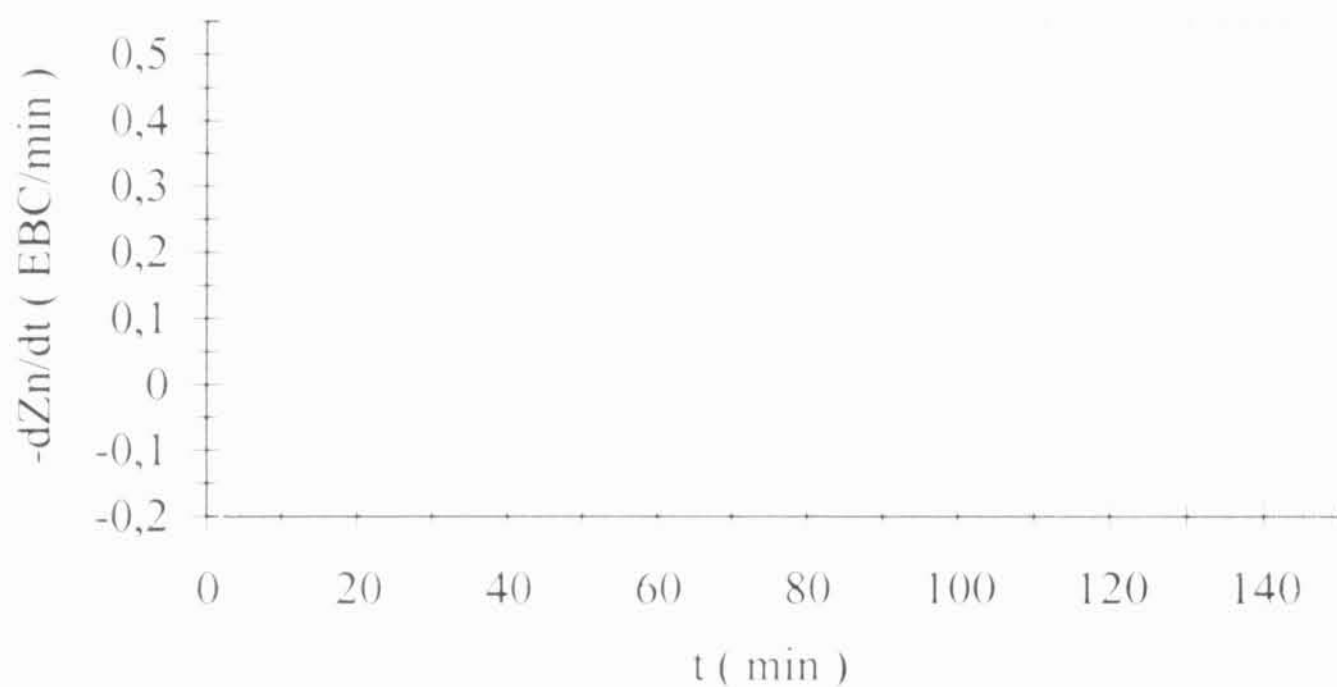
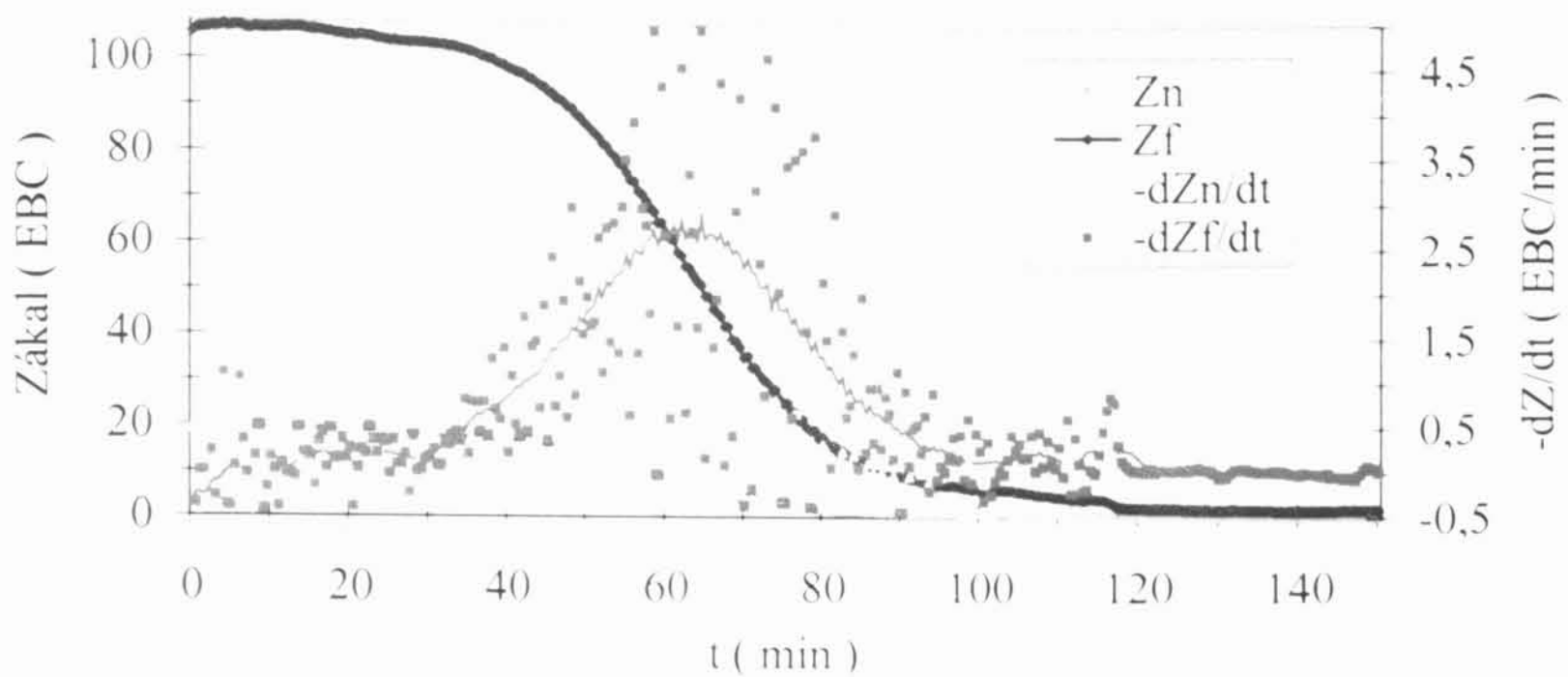
V čase $t = 0$ se kvasinkové buňky začnou pohybovat svými rovnořadnými rychlostmi $v(r)$ ve směru svisle dolů. Jestliže svazek světla prochází vzorkem v hloubce h pod hladinou suspenze, pak v čase $t_1 = \frac{h}{v(r_1)}$ projde horní vrstva center o poloměru r_1 svazkem, a tak tyto buňky přestanou přispívat k rozptylu, což se projeví poklesem intenzity rozptýleného záření. Podobně v čase $t_2 = \frac{h}{v(r_2)}$ již nepřispívají k rozptylu centra o poloměru r_2 a dále se snižuje velikost zákalu.

Derivace časového průběhu intenzity rozptylu světla během sedimentace obsahuje informaci o hustotě pravděpodobnosti $P(r)$, tedy o zastoupení různých velikostí rozptylových center ve studované suspenzi. Funkci $P(r)$ však nenalezneme přímo, ale vynásobenou intenzitou rozptylu na jednom centru, která též závisí na r (větší rozptylová centra mají větší účinný průřez rozptylu). Při reálném měření bude nalezená funkce $\frac{dZ}{dt}$ deformována ještě vlivem nenulové šířky svazku a vlivem nerovnoměrného rozložení intenzity záření podél příčného průřezu svazku. Dalek nebude nikdy splněna podmínka dokonale rovnoměrného rozmístění rozptylových center v čase $t = 0$. Na časovém průběhu intenzity rozptýleného záření se projeví i vliv kolísání počtu rozptylových center v objemu, z kterého je sbíráno rozptýlené záření. Tento jev bude tím výraznější, čím bude tento objem menší, a čím nižší bude objemová hustota rozptylových center ve vzorku, která však nemůže být nikdy příliš velká, aby nedocházelo k vícenásobnému rozptylu.

Reálný průběh sedimentačního experimentu je zobrazen nahoře na obr. 4-2, kdy jsme měřili sedimentaci kvasinek P0 (podrobnosti o označení lze nalézt v kapitole 3.1.). Ze závislosti sedimentace na koncentraci buněk vyplynulo, že je nejvhodnější měřit sedimentaci při koncentraci buněk takové, aby Z_n nepřesahovalo 40 EBC. Objem vzorku byl 5 ml stejně jako u všech následujících experimentů. Při analýze dat jsme se zaměřili na sedimentační křivku měřenou v úhlu 90° (Z_n), která není zatížena tak velkým šumem ve srovnání se zákalem měřeným v dopředném úhlu (Z_f).

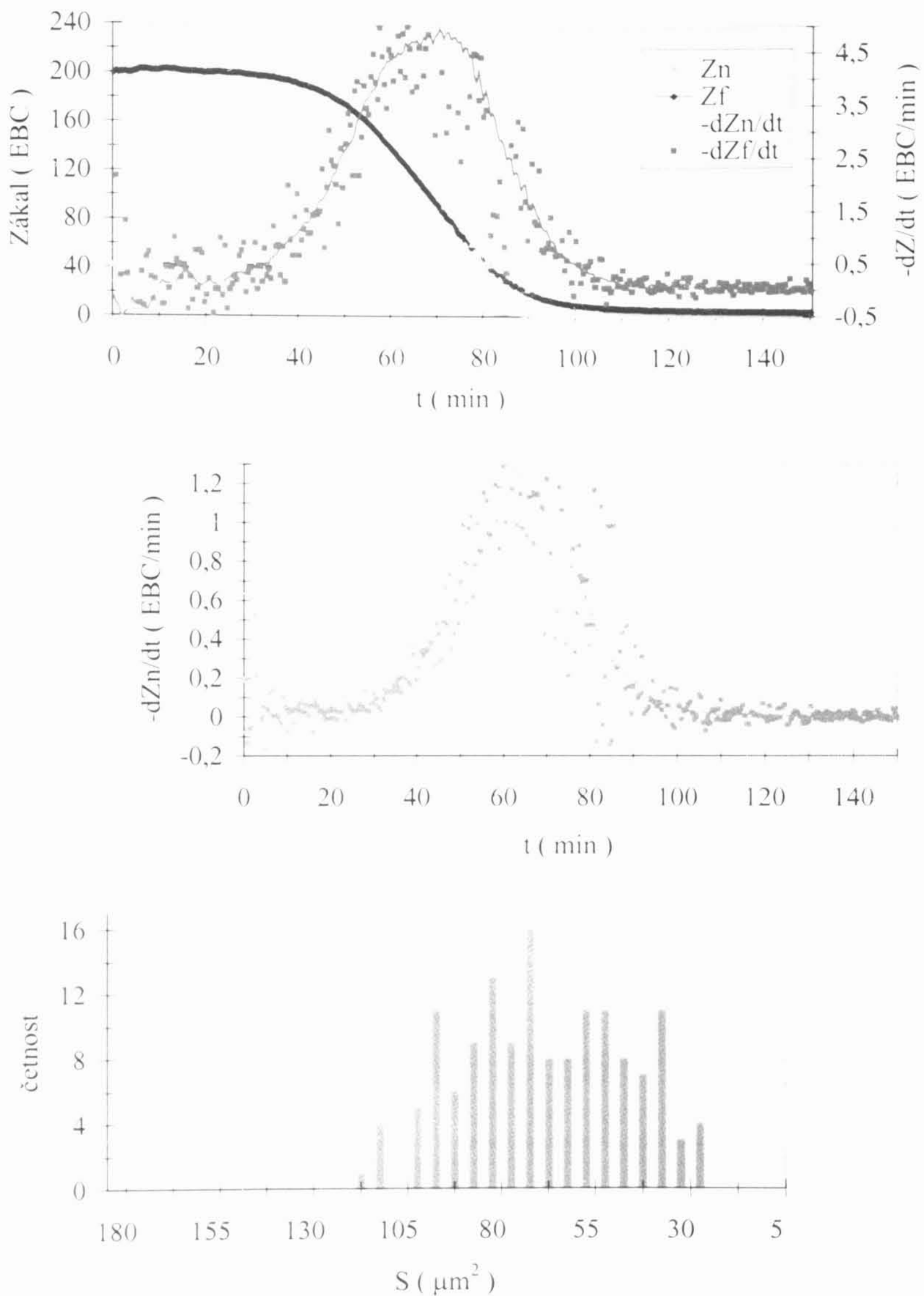
Derivaci časového průběhu zákalu suspenze během sedimentace kvasinek jsme počítali jako rozdíl funkčních hodnot Z_n či Z_f podělený časovým intervalem, výsledkem softwarového vyhlazení takto získaných dat jsou plné čáry v horních a prostředních grafech v obrázcích 4-2 až 4-15. Časovou derivaci sedimentační křivky Z_n (obr. 4-2 uprostřed) jsme na základě výše uvedených předpokladů porovnali se zastoupením jednotlivých velikostí kvasinkových buněk (obr. 4-2 dole) měřených pod mikroskopem. Na obrázku 4-3 je zachycena sedimentace kvasinek P1, na obrázku 4-4 pak sedimentace buněk pekařského droždí.

Kvasinky jsme pozorovali pomocí mikroskopu Olympus IX 70 vybaveného kamerou Pulnix TM-765E za použití imerzního objektivu Olympus UPlanApo, $60 \times / 1,20$ W, $\infty / 0,13 - 0,21$. K rozměrové kalibraci mikroskopických snímků jsme využili objektiv Olympus LCPlanFl, $20 \times / 0,40$, $\infty /$. Při určování velikostí kvasinek jsme postupovali následovně, u každého vzorku kvasnic jsme pořídili deset snímků tak, abychom zachytili alespoň sto buněk, obrázky jsme pomocí programu Lucia G on Mutech Verze 4.61 převedli do binární podoby, jež je vhodná k samotnému měření buněk, a to jsme provedli v programu ImageJ 1.33u. V programu Origin 7.0 jsme zhotovili histogramy z obsahů průřezů kvasinek. Jeden sloupeček v těchto histogramech (např. obr. 4-2 dole) odpovídá $5 \mu\text{m}^2$. Histogramy jsou zobrazovány prostorově posunutě vůči derivaci sedimentační křivky a s převrácenou osou x , aby byla lépe patrná analogie distribuce velikostí kvasinek (obr. 4-2 dole) s derivací sedimentační křivky (obr. 4-2 uprostřed).



Obr.4-2 Sedimentační charakteristika kvasinek P0 z kmene 95, tj. kvasinek před nasazením v CKT. *Nahoře* je zachycena sedimentace kvasinek, kde Zn značí zákal suspenze měřený v úhlu 90° , Zf vyjadřuje zákal kvasničné suspenze měřený v úhlu 15° . *Uprostřed* je zakreslena derivace sedimentační křivky $-dZn/dt$, jejíž tvar se podobá tvaru distribuce ploch průřezů buněk P0, která je zobrazena *dole*. Jeden sloupeček v tomto histogramu odpovídá ploše $5 \mu\text{m}^2$.

U většiny následujících grafů, kde to podmínky experimentů dovolily, jsme pro větší přehlednost a porovnatelnost dat zachovali stejný rozsah os.



Obr.4-3 Sedimentační charakteristika kvasinek P1 (kmen 95), které byly jedenkrát použity při kvašení v CKT. *Nahoře*: Sedimentace kvasinek P1. *Uprostřed*: Derivace sedimentační křivky. *Dole*: Distribuce ploch průřezů buněk P1. Vysvětlení veličin lze najít u obrázku 4-2.

Pomocí mikroskopu jsme změřili velikosti pivovarských kvasinek P0 a P1 v mladině (veličiny s indexem m) i v citrát-fosfátovém pufru (hodnoty označené indexem p) (obr.3-1). Budeme-li považovat počet proměřených buněk N za dostatečný, pak byl jasně patrný trend nárůstu velikosti kvasinek po přenesení z mladiny do pufru, který je pravděpodobně způsoben změnou osmotického tlaku prostředí. Taktéž buňky P1, které již byly použity při kvašení v cylindro-kónickém tanku, dosahovaly větších

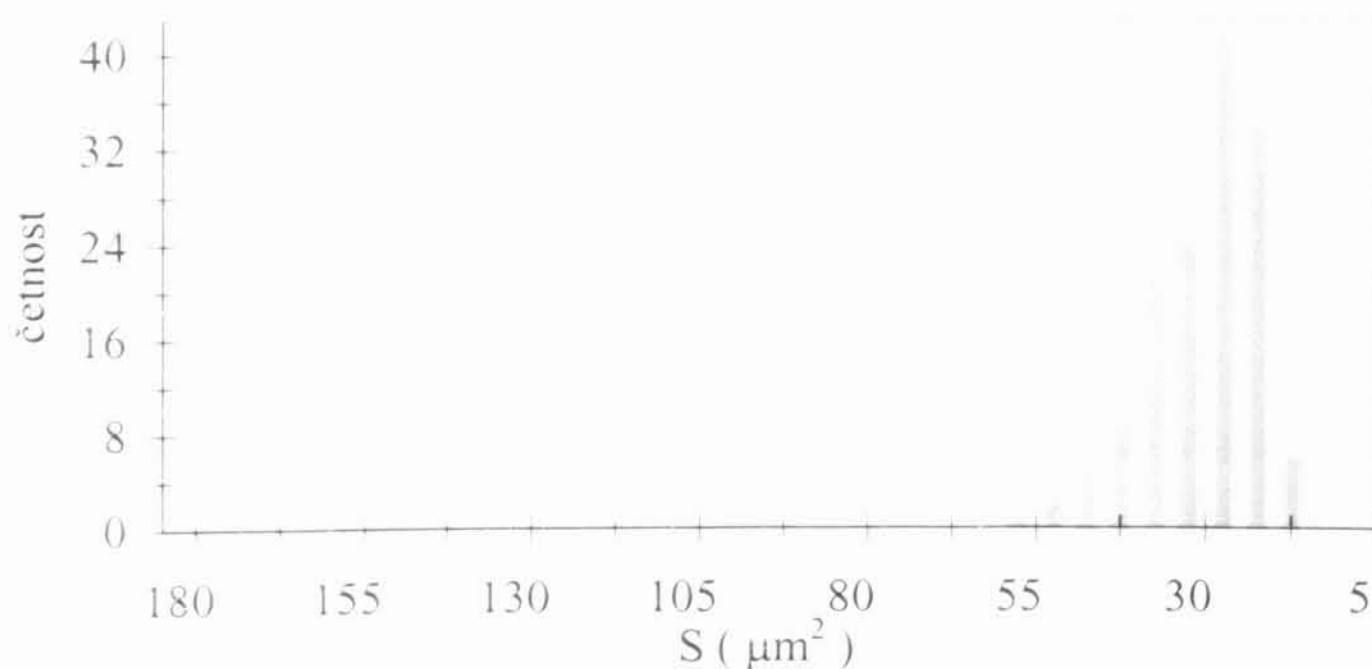
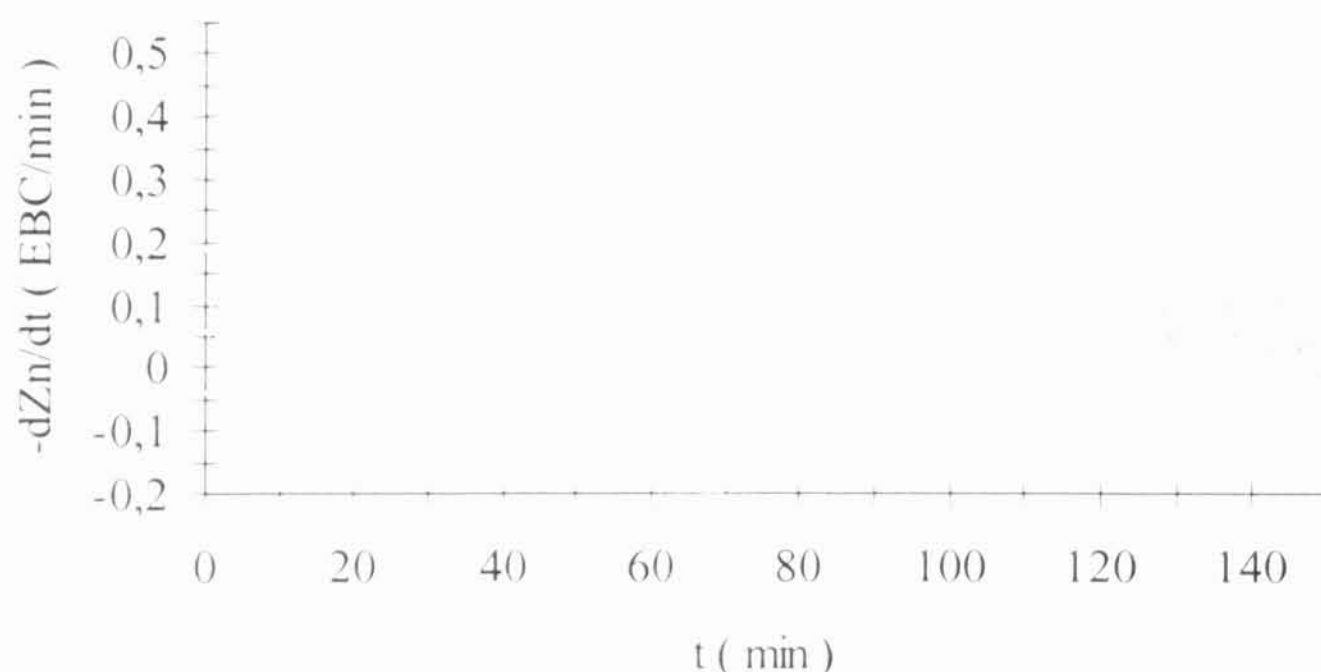
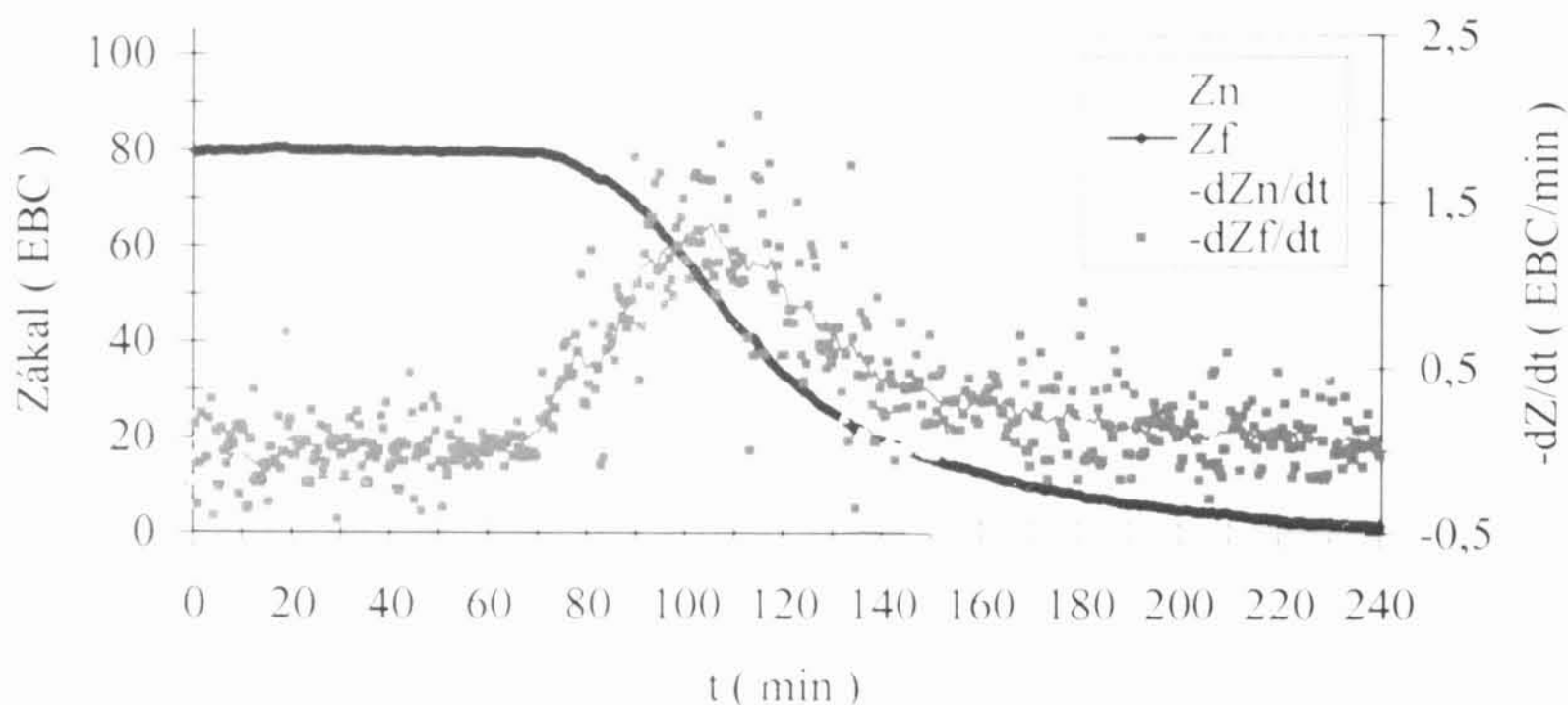
rozměrů než buňky P0, které doposud nebyly nasazeny v CKT. Tento jev lze vysvětlit tím, že starší kultury, v našem případě P1, obsahují větší množství starších a větších buněk než mladé kultury (P0) (Sinclair a kol., 1998).

$$S_{P0m} = (62 \pm 17) \mu\text{m}^2 \quad N = 142$$

$$S_{P0p} = (67 \pm 15) \mu\text{m}^2 \quad N = 211$$

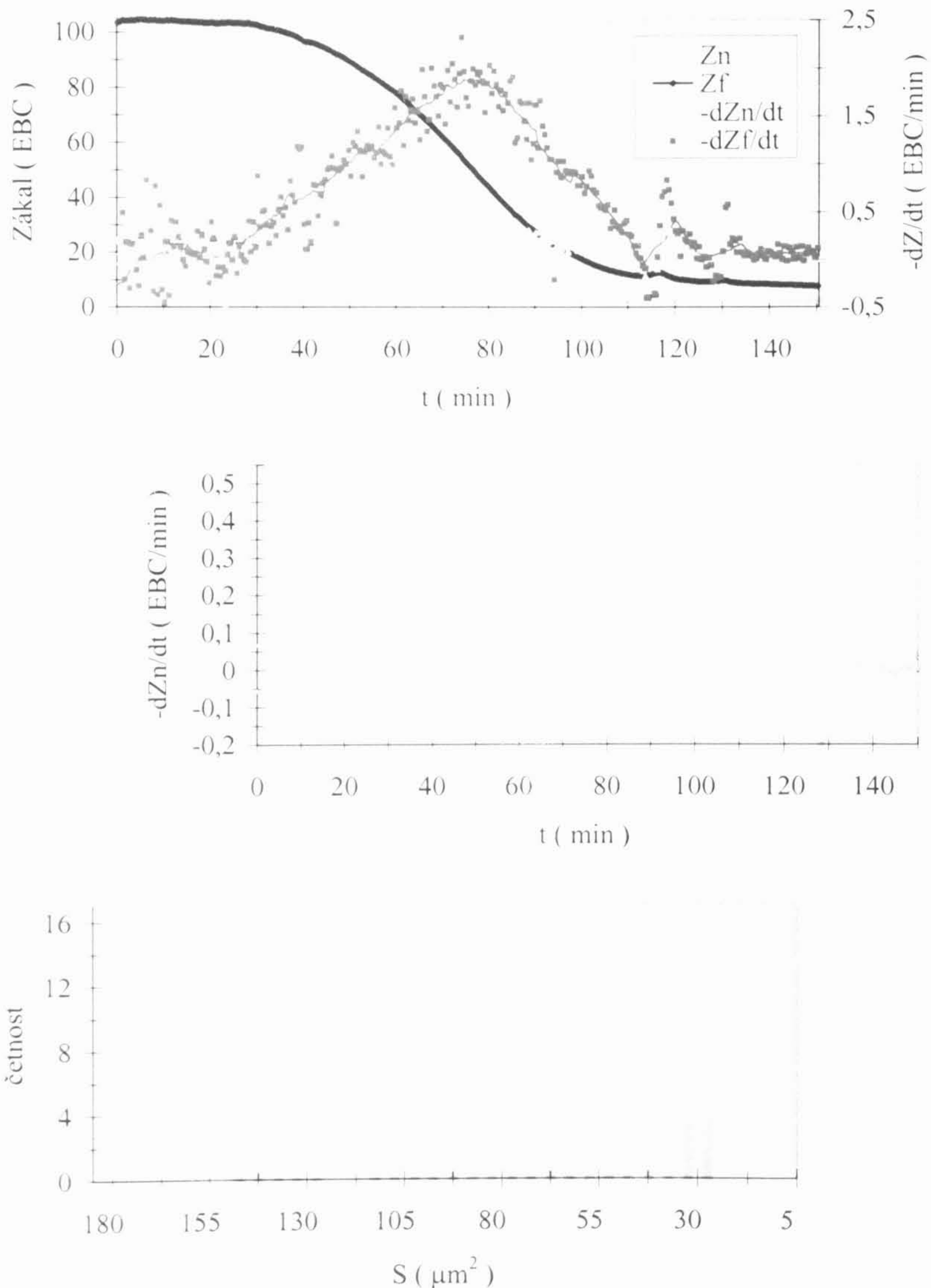
$$S_{P1m} = (66 \pm 22) \mu\text{m}^2 \quad N = 145$$

$$S_{P1p} = (70 \pm 21) \mu\text{m}^2 \quad N = 132$$



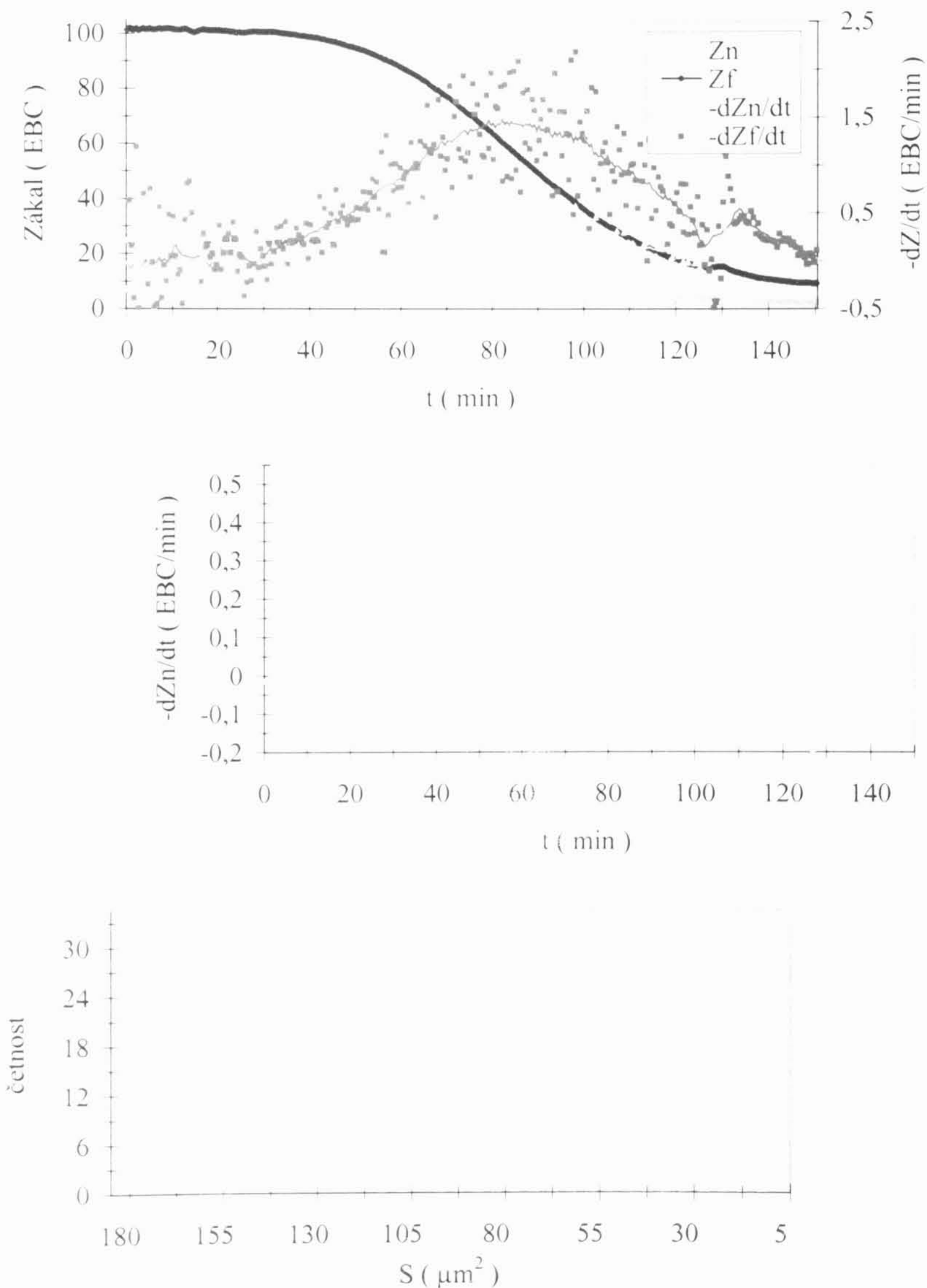
Obr.4-4 Sedimentační charakteristika kvasinek pekařského droždí. *Nahoře* je vyobrazena sedimentace buněk měřená v úhlech 90° a 15° spolu s derivacemi těchto křivek. *Uprostřed*: Derivace sedimentační křivky pekařského droždí. *Dole*: Distribuce ploch průřezů buněk pekařského droždí.

Z obrázku 4-4 vyplývá, že buňky pekařského droždí jsou velice drobné ve srovnání s pivovarskými kmeny a vynikají i úzkou distribucí obsahů průřezů buněk. K vypočtení průměrné plochy průřezu buňky pekařského droždí $S_D = (28 \pm 8) \mu\text{m}^2$ jsme použili 145 buněk. Žádná z buněk pekařského droždí stejně jako pivovarských kvasinek P0, P1 a P se v době měření nenacházela ve stádiu pučení, tudíž jejich distribuce velikostí a derivace sedimentačních křivek byly poměrně úzké ve srovnání s deseti laboratorně pěstovanými kmeny kvasinek.



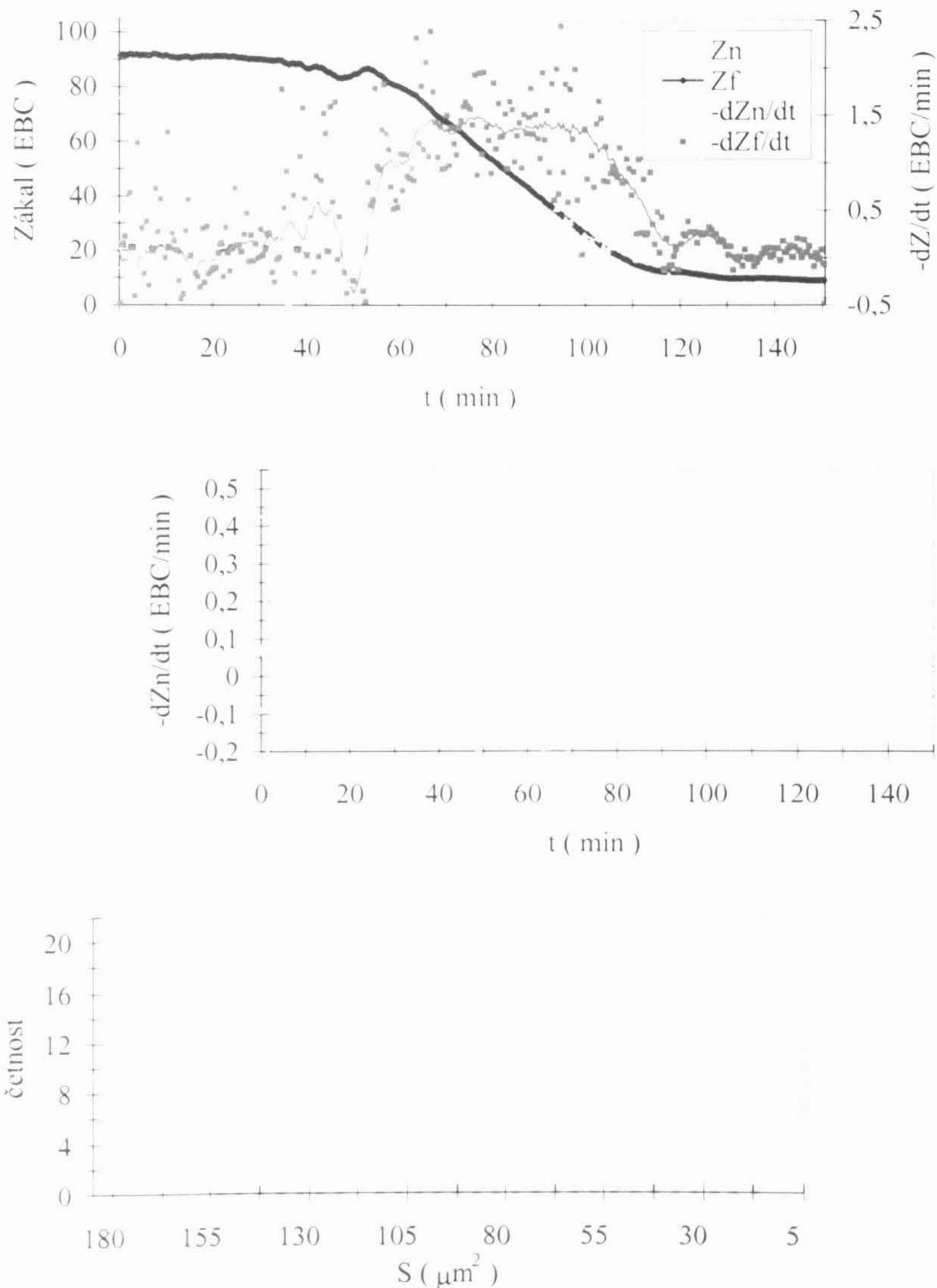
Obr.4-5 Sedimentační charakteristika kmene 3. *Nahoře:* Sedimentační křivky buněk tohoto kmene spolu s derivacemi těchto křivek. *Uprostřed:* Derivace sedimentační křivky kmene 3. *Dole:* Distribuce ploch průřezů buněk kmene 3. Vysvětlení veličin lze nalézt v legendě obrázku 4-2.

V horní a střední části obrázku 4-5 jsou shrnuty výsledky sedimentace kmene 3, z tvaru derivace sedimentační křivky lze vypočítat určitou podobnost s distribucí velikostí kvasinek (obr.4-5 dole), samozřejmě nesmíme zapomínat na jistá zkreslení, jež byla popsána na začátku této kapitoly. Při sestavování histogramu jsme změřili plochy průřezů 147 kvasinek, jejichž průměr činí $S_3 = (65 \pm 24) \mu\text{m}^2$. Ve vzorku jsme našli 31 % pučících buněk.



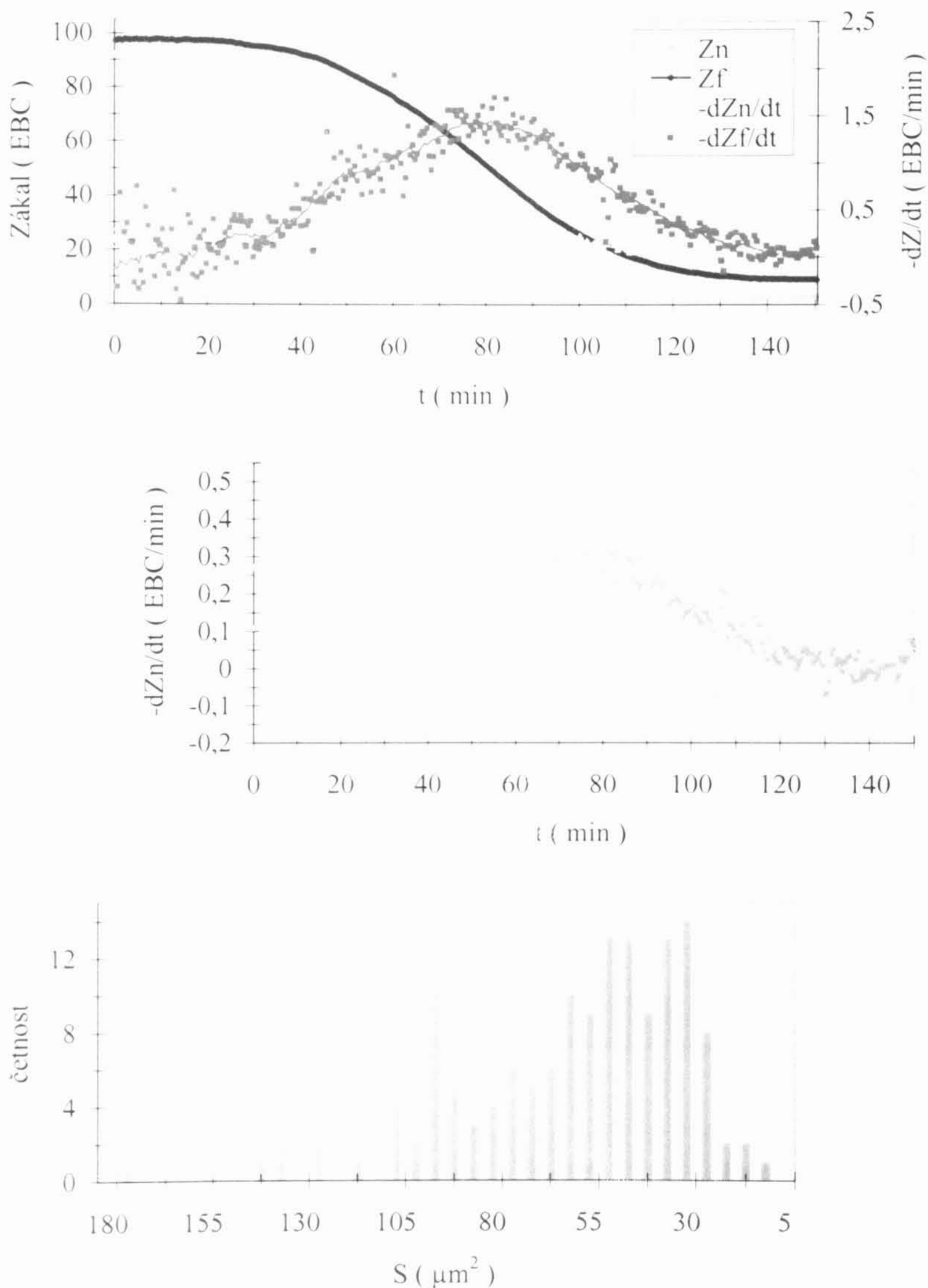
Obr.4-6 Sedimentační charakteristika kmene 6. *Nahoře* je zachycen vývoj zákalu během sedimentace buněk tohoto kmene měřený v úhlech 90° (Zn) a 15° (Zf). *Uprostřed* je zobrazena derivace sedimentační křivky kmene 6, *dole* pak distribuce ploch průřezů buněk kmene 6. Jeden sloupeček v tomto histogramu odpovídá ploše $5 \mu\text{m}^2$.

Obrázek 4-6 (nahore a uprostřed) obsahuje informace o sedimentaci kmene 6, jehož buňky dosahovaly plochy průřezu nejčastěji $S_6 = (46 \pm 18) \mu\text{m}^2$ (obr.4-6 dole), tuto hodnotu jsme vypočetli z 213 buněk. Ve vzorku kmene 6 se nacházelo 33 % buněk ve stádiu pučení. Sedimentace kmene 8 je zachycena na obrázku 4-7, sedimentační křivka tohoto kmene se výrazně liší od všech ostatních křivek patrně z důvodu poněkud nerovnoměrné distribuce ploch průřezů buněk, jejichž průměr byl $S_8 = (73 \pm 30) \mu\text{m}^2$ (obr.4-7 dole). Tuto hodnotu jsme stanovili na 150 buňkách, z nichž 44 % bylo v různém stádiu pučení.

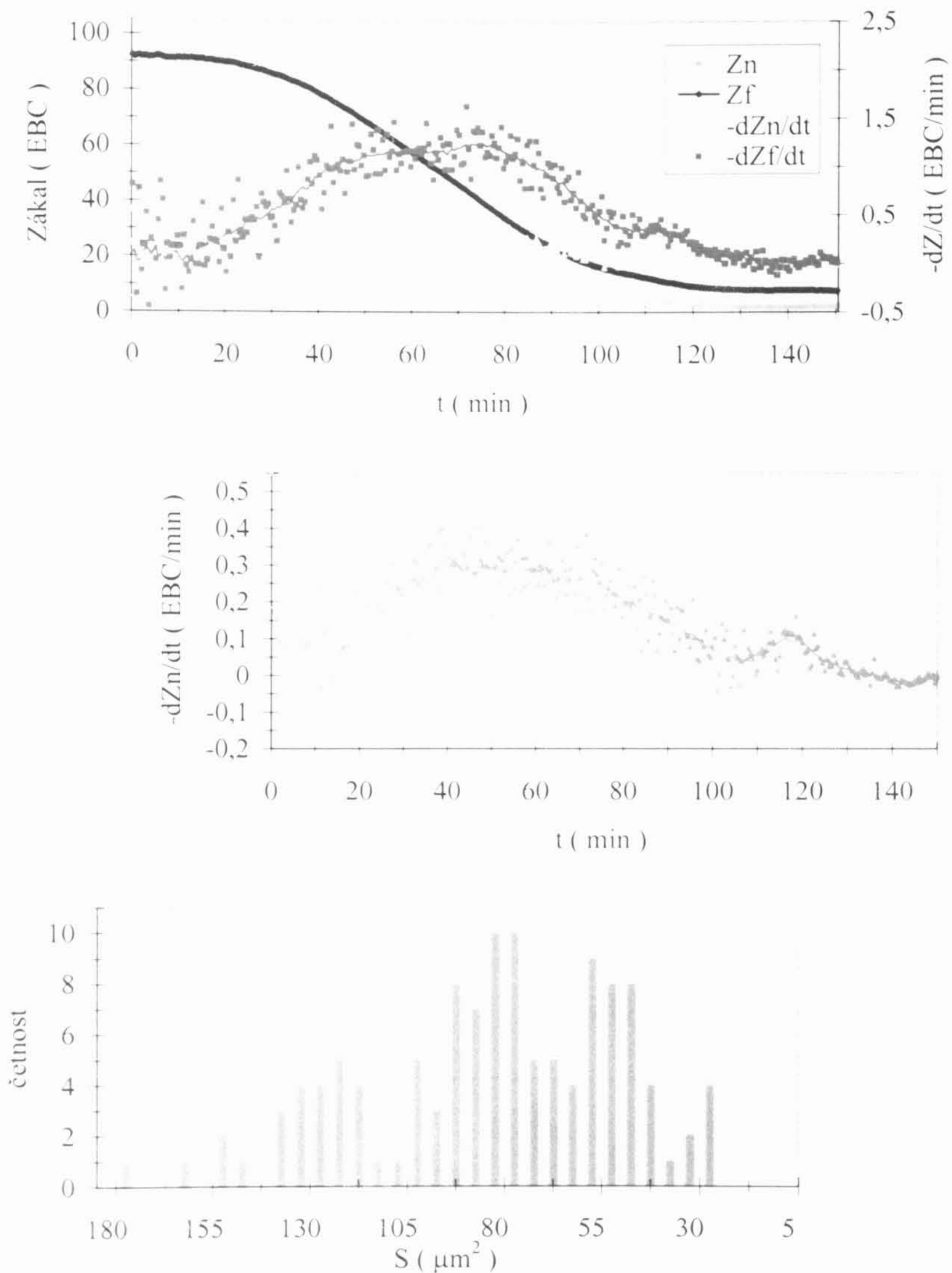


Obr.4-7 Sedimentační charakteristika kmene 8. *Nahore:* Sedimentační křivky buněk kmene 8 spolu s derivacemi těchto křivek. *Uprostřed:* Derivace sedimentační křivky kmene 8. *Dole:* Distribuce ploch průřezů buněk kmene 8. Vysvětlení veličin lze nalézt v legendě obrázku 4-2.

Průběh sedimentace kmene 9 je vyobrazen v horní a střední části obrázku 4-8, kvasinky daného kmene dorůstaly plochy průřezu v průměru $S_0 = (59 \pm 30) \mu\text{m}^2$ (obr.4-8 dole), k určení této hodnoty jsme použili 147 buněk, 33 % z nich v tu dobu pučelo.



Obr.4-8 Sedimentační charakteristika kvasinek kmene 9. *Nahoře* je zachycena sedimentace kvasinek, kde Zn značí zákal suspenze měřený v úhlu 90° , Zf vyjadřuje zákal kvasničné suspenze měřený v úhlu 15° . *Uprostřed* je zakreslena derivace sedimentační křivky $-dZn/dt$. *Dole* je zobrazena distribuce ploch průřezů buněk kmene 9. Jeden sloupeček v tomto histogramu odpovídá ploše $5 \mu\text{m}^2$.

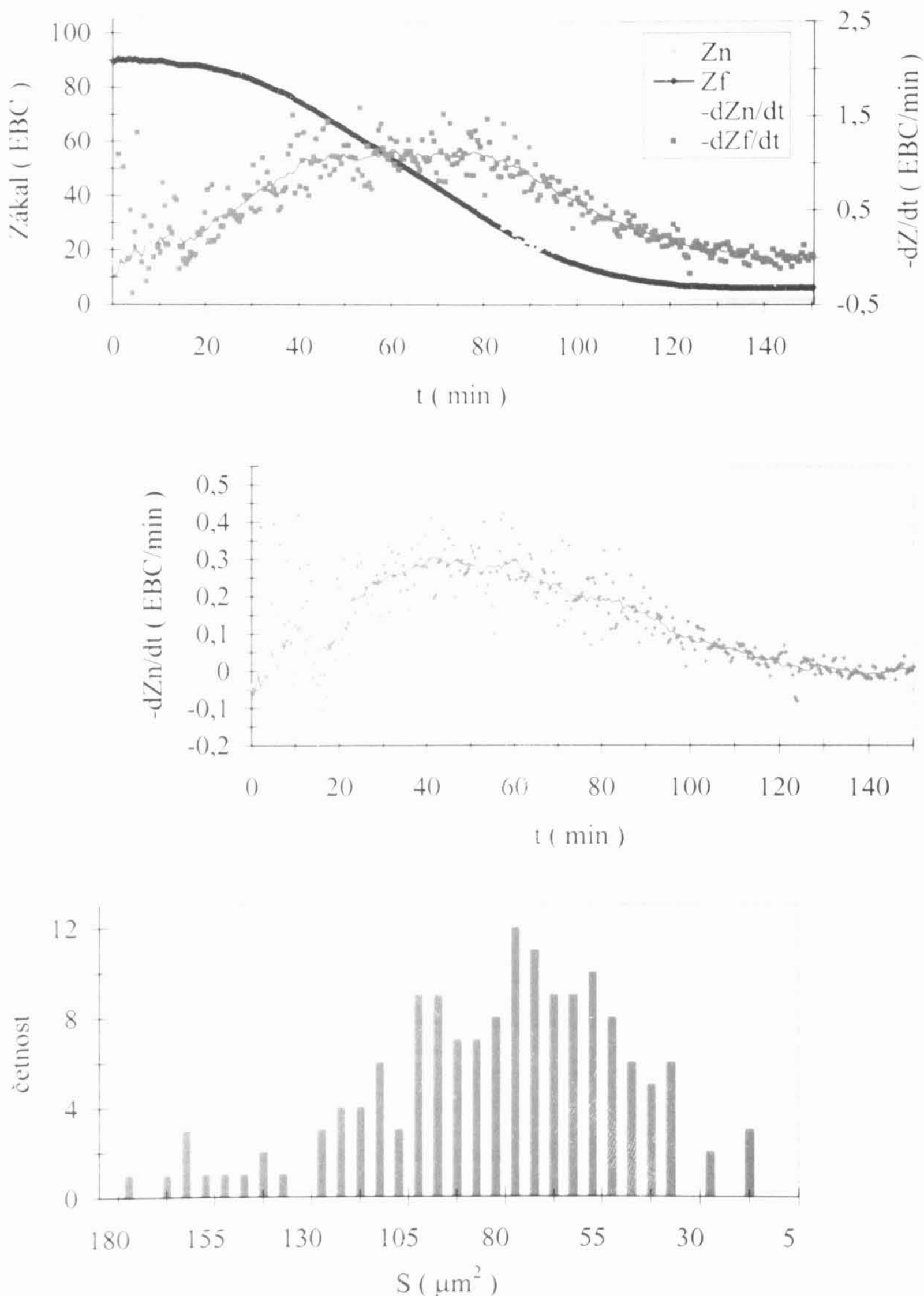


Obr.4-9 Sedimentační charakteristika kmene 11. *Nahoře*: Sedimentace buněk kmene 11 měřená ve dvou úhlech 15° a 90°. *Uprostřed*: Derivace sedimentační křivky kmene 11. *Dole*: Distribuce ploch průřezů buněk kmene 11. Podrobnější výklad veličin je podán u obrázku 4-8.

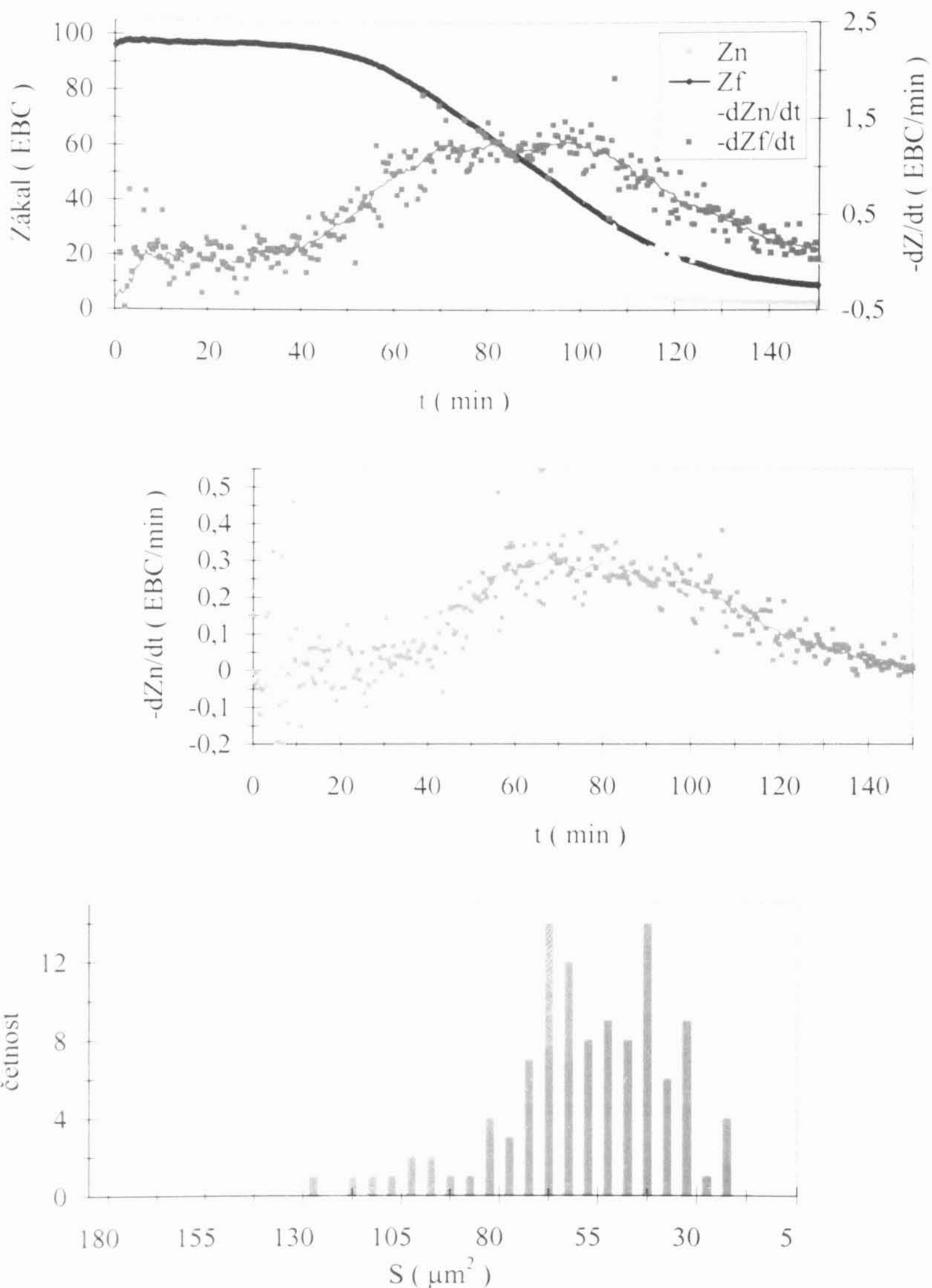
V obrázku 4-9 jsou znázorněny sedimentační charakteristiky kmene 11, jehož vzorek obsahoval 48 % pučících buněk, proto i průměr ploch průřezů jeho buněk $S_{11} = (80 \pm 33) \mu\text{m}^2$ patřil spolu s kmenem 12 $S_{12} = (80 \pm 32) \mu\text{m}^2$ k největším. Pro stanovení průměrné velikosti jsme v případě kmene 11 použili 120 buněk a pro spočtení S_{12} jsme využili 152 kvasinek, z nichž 40 % tvořily buňky pučící. Kmeny 11 a 12 mají velmi podobné distribuce velikostí buněk (obrázky 4-9 a 4-10 dole) i záporně vzaté derivace sedimentačních křivek (obrázky 4-9 a 4-10 uprostřed), což ukazuje

spolehlivost měření sedimentace kvasinek pomocí zákaloměru UZLP jako prostředku k určení velikosti buněk.

V horní a střední části obrázku 4-11 je zobrazen průběh sedimentace kmene 26, průměrná plocha průřezů buněk tohoto kmene dosahovala $S_{26} = (56 \pm 21) \mu\text{m}^2$, přičemž hodnotu jsme vypočetli ze 109 buněk, z nichž 48 % pučelo.

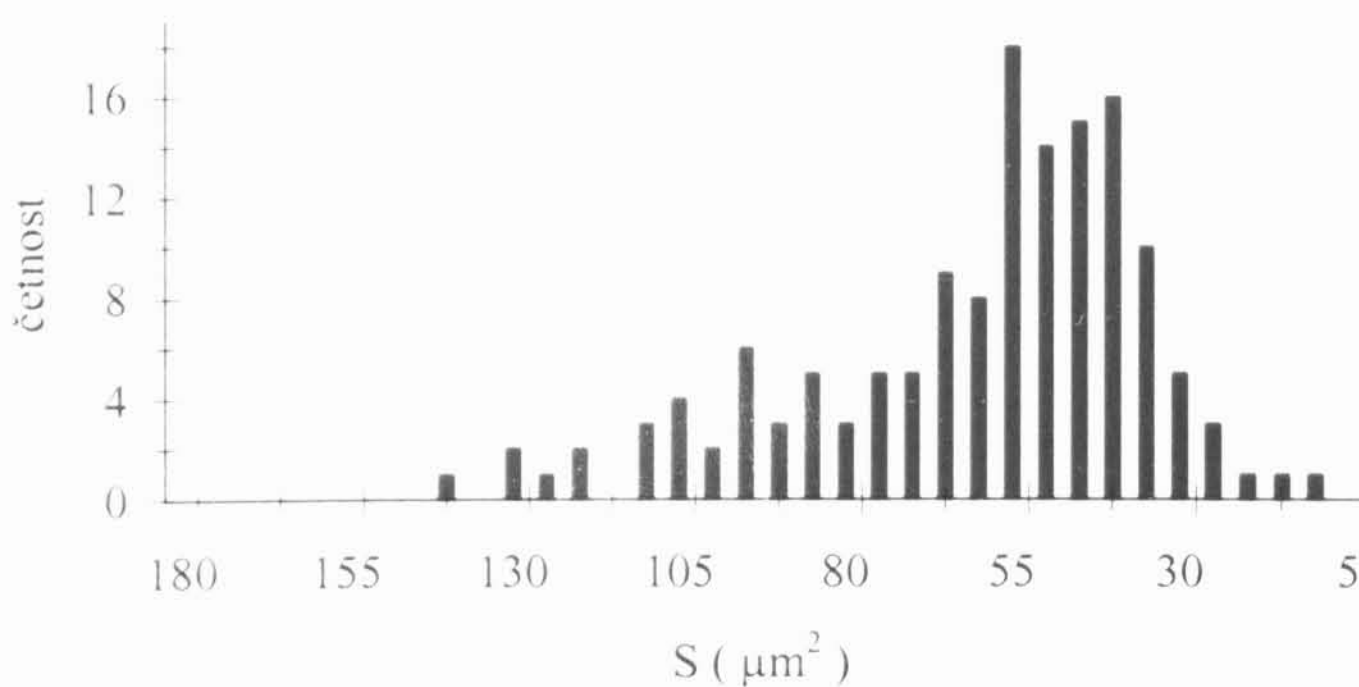
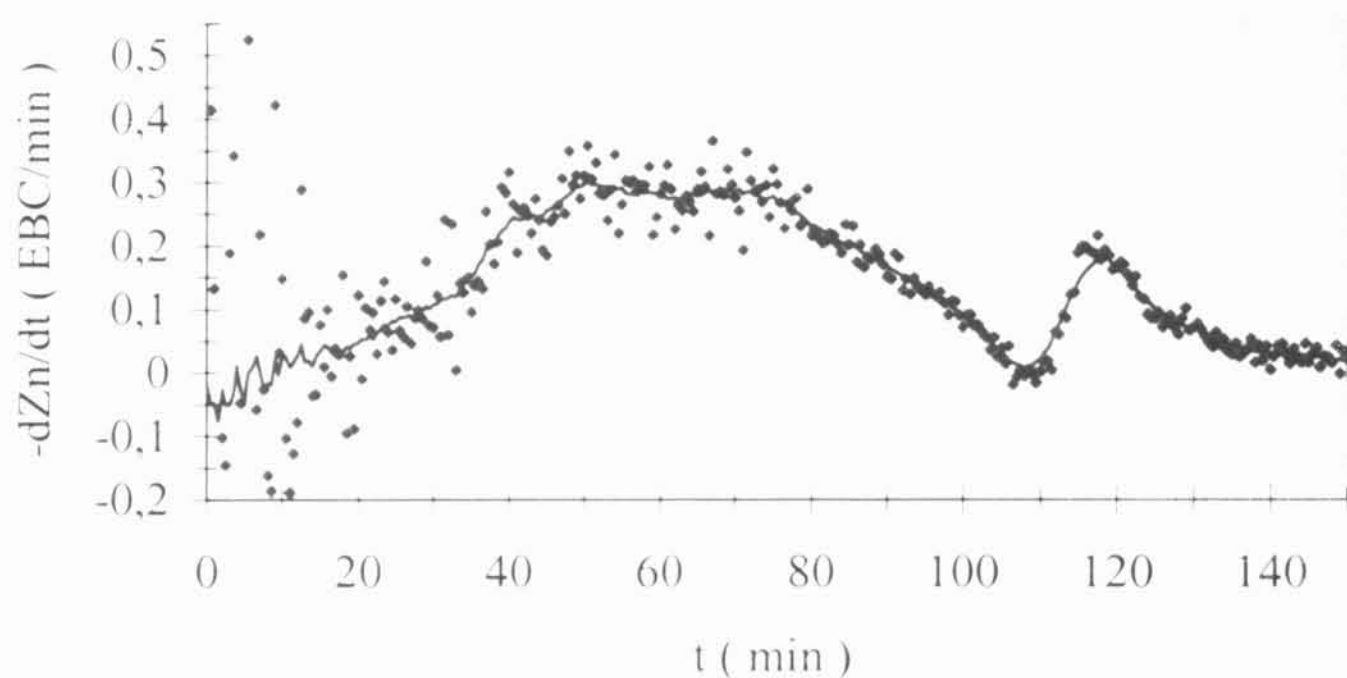
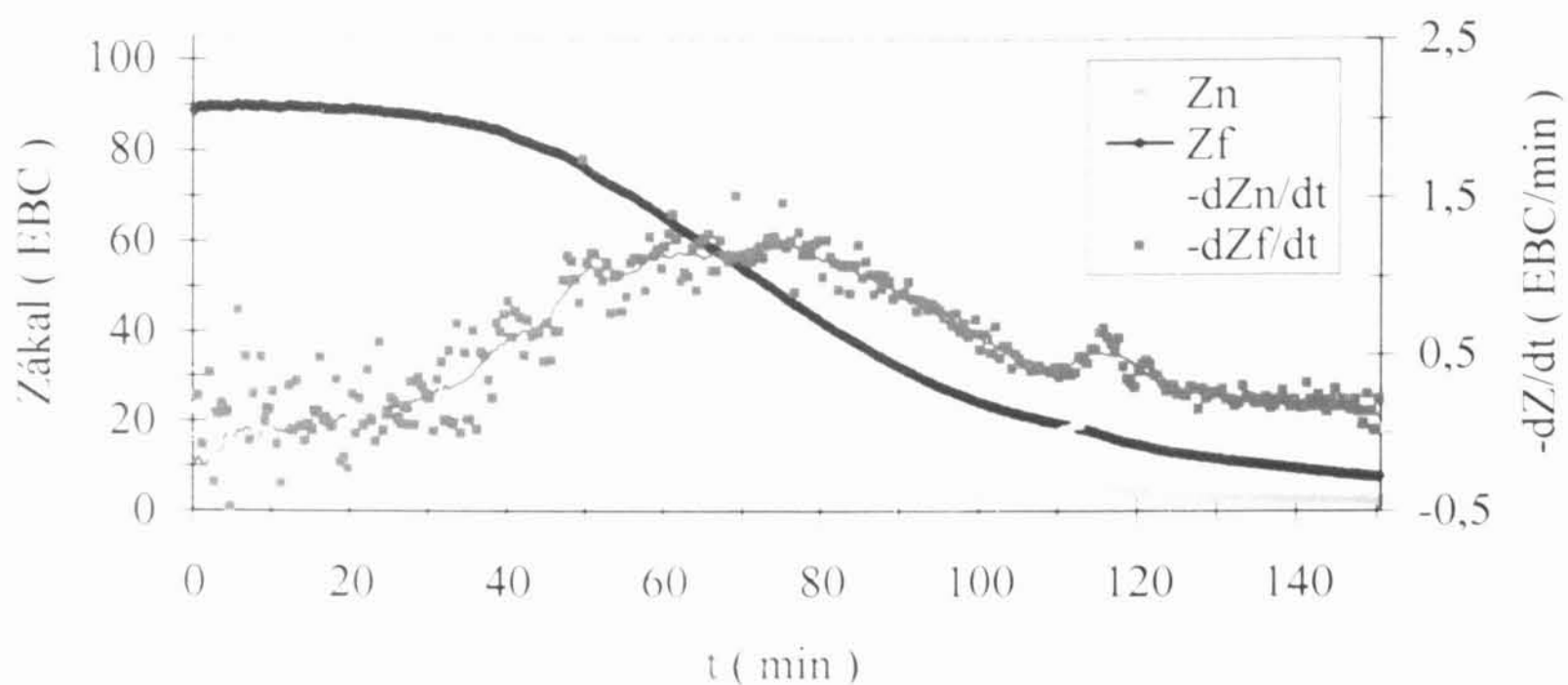


Obr.4-10 Sedimentační charakteristika kmene 12. *Nahoře:* Vývoj zákalu buněčné suspenze během sedimentace kvasinek kmene 12. *Uprostřed:* Derivace sedimentační křivky kmene 12 měřené pod úhlem 90° . *Dole:* Distribuce ploch průřezů buněk kmene 12. Podrobnější výklad veličin je podán u obrázku 4-8. Vyvinutou metodu měření sedimentace kvasinek nazval doc. Ing. Petr Sladký, CSc. Sedimtur.



Obr.4-11 Sedimentační charakteristika kmene 26. *Nahoře*: Sedimentace kvasinek kmene 26. *Uprostřed*: Derivace sedimentační křivky kmene 26. *Dole*: Distribuce ploch průřezů buněk kmene 26. Význam veličin je popsán v legendě obrázku 4-8.

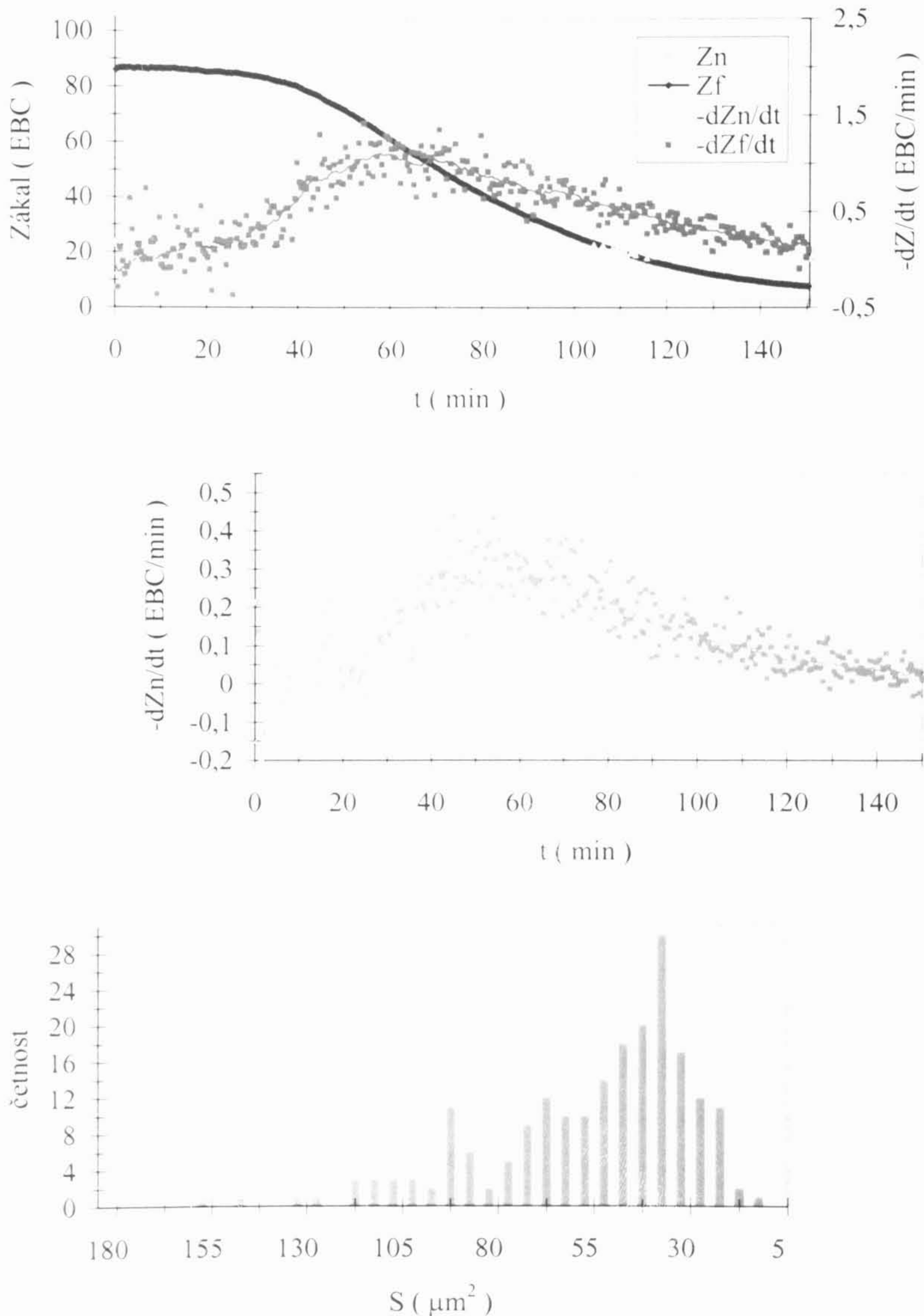
Buňky kmene 32 nabývaly průměrné velikosti $S_{32} = (60 \pm 26) \mu\text{m}^2$, kterou jsme změřili na 143 kvasinkách (obr.4-12 dole). Na obrázku 4-13 je nakreslena distribuce velikosti 208 buněk kmene 95, z nichž 37 % pučelo, aritmetický průměr ploch průřezů buněk tohoto kmene činí $S_{95} = (53 \pm 27) \mu\text{m}^2$. Vzorek kmene 98 obsahoval 42 % pučících kvasinek a průměrná plocha průřezů jeho buněk byla $S_{98} = (81 \pm 30) \mu\text{m}^2$, hodnota byla stanovena na 154 buňkách (obr.4-14).



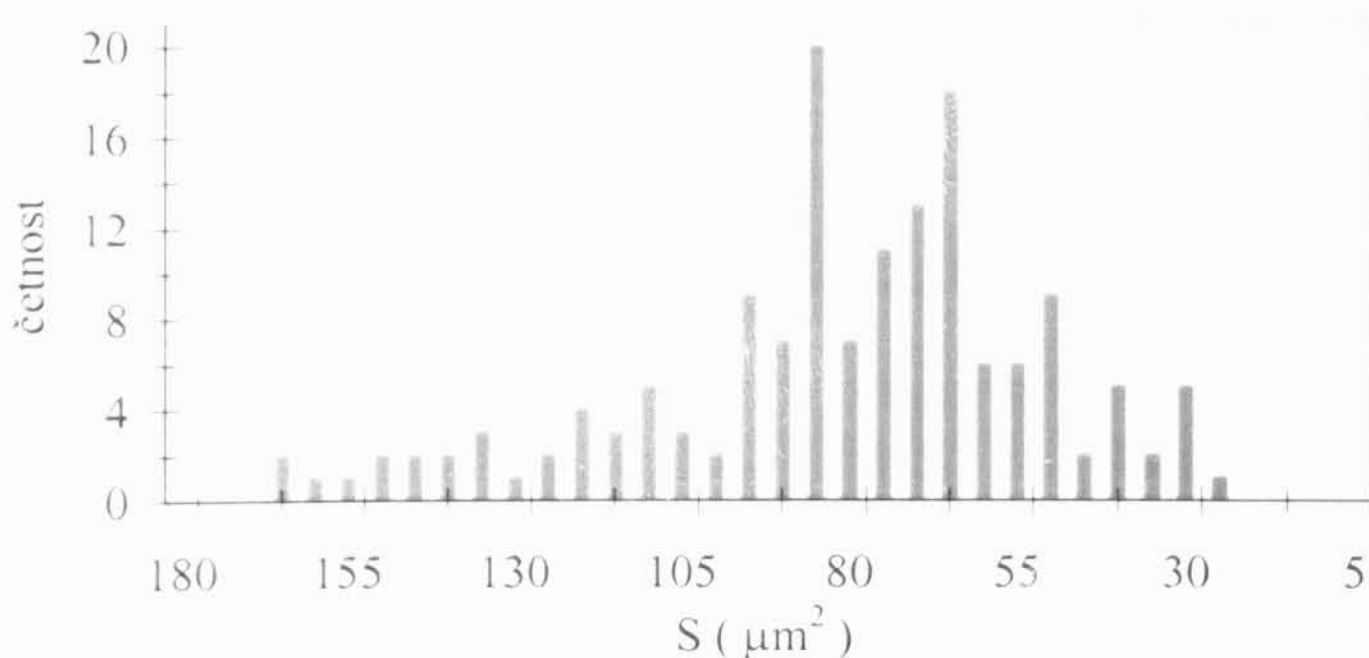
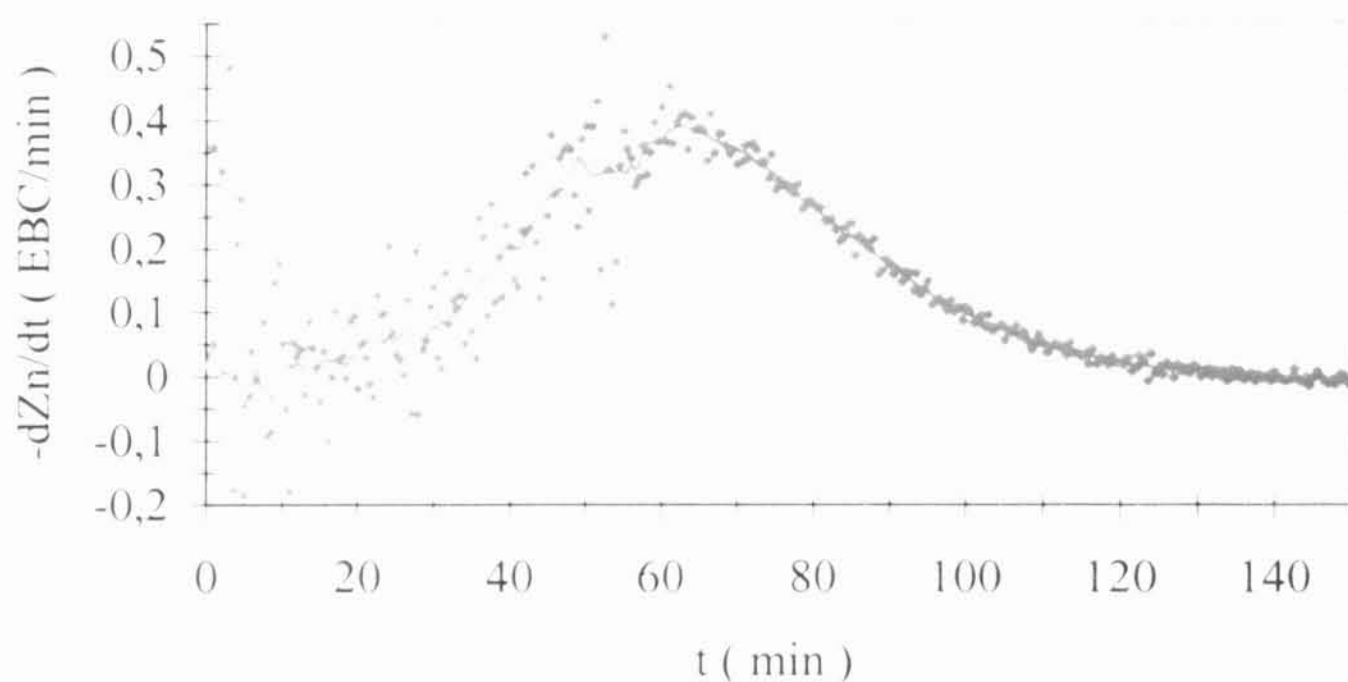
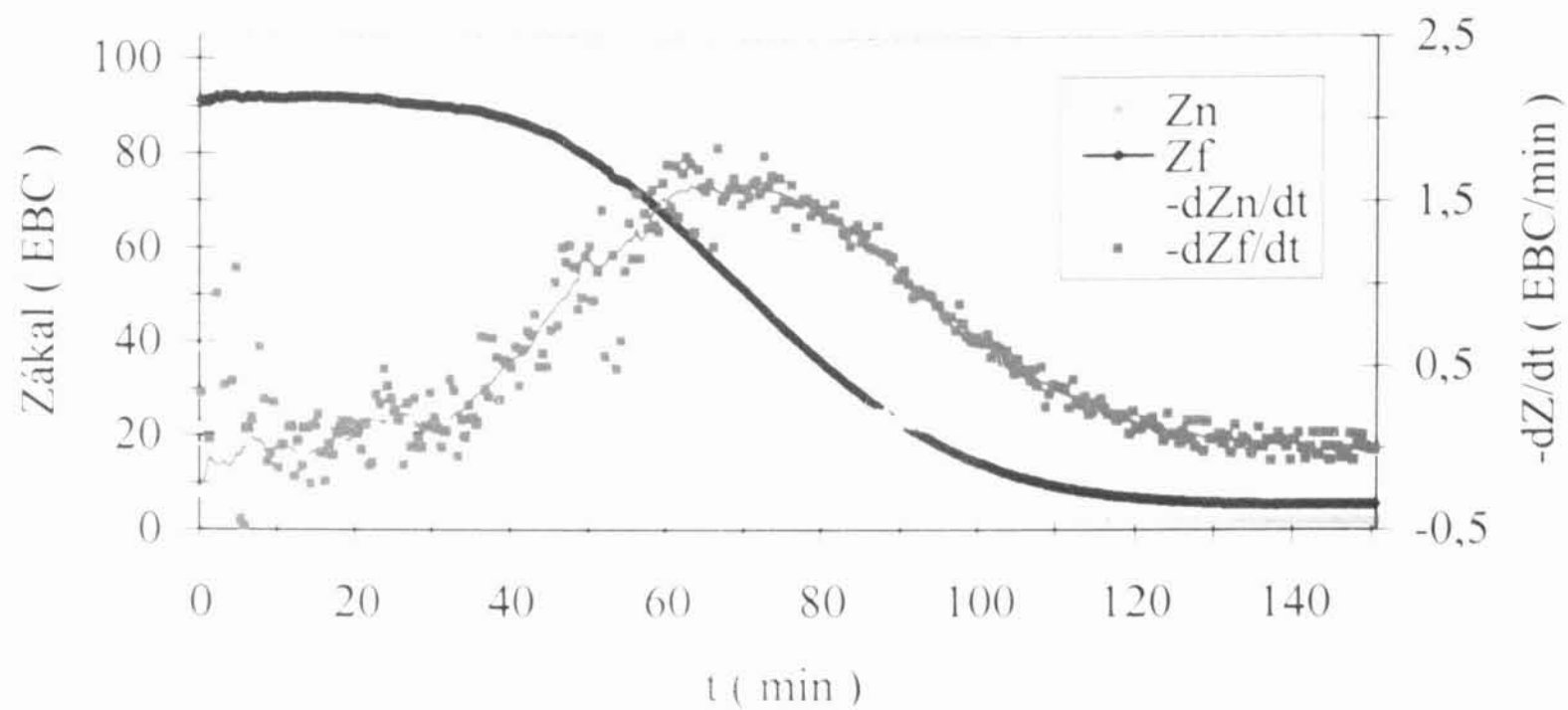
Obr.4-12 Sedimentační charakteristika kmene 32. *Nahoře* je vyobrazena sedimentace kvasinek kmene 32. *Uprostřed* se nalézá graf derivace sedimentační křivky kmene 32. *Dole* je znázorněna distribuce ploch průřezů buněk kmene 32. Význam veličin je popsán v legendě obrázku 4-8.

Kvasinky kmene 32, mezi nimiž jsme našli 33 % pučících buněk, byly izolovány z mladiny po 10 dnech kvašení podobně jako buňky kmene 3 nebo 95. Kmen 95 podle tabulky 3-1 je hluboko prokvášejícím kmenem na rozdíl od kmenů 3 a 32, jež se řadí mezi kmene středně prokvášející mladinu. To mimo jiné znamená, že kultury těchto kmenů potřebují kratší dobu, aby dospěly do stacionární fáze růstu, v které již buňky nepučí. Desátý den kvašení byly z mladiny izolovány ještě hluboko prokvášející

kmeny 11 a 12, jejichž vzorky obsahovaly značné množství pučících buněk (48 a 40 %), 48 % buněk ve stádiu pučení se našlo také ve vzorcích kmene 26, jež patří do skupiny hluboko prokvašujících kmenů a navíc byl spolu s ostatními kmeny 6, 8, 9 a 98 oddělen od mladiny již devátý den kvašení.



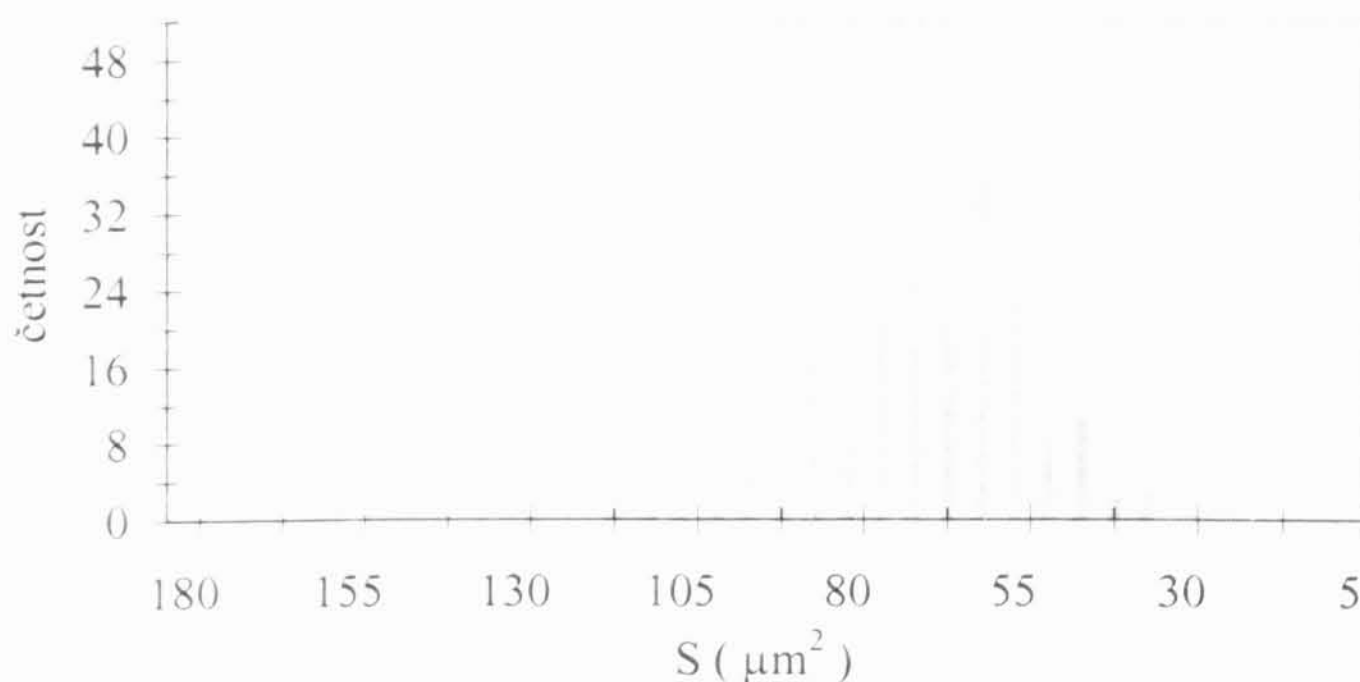
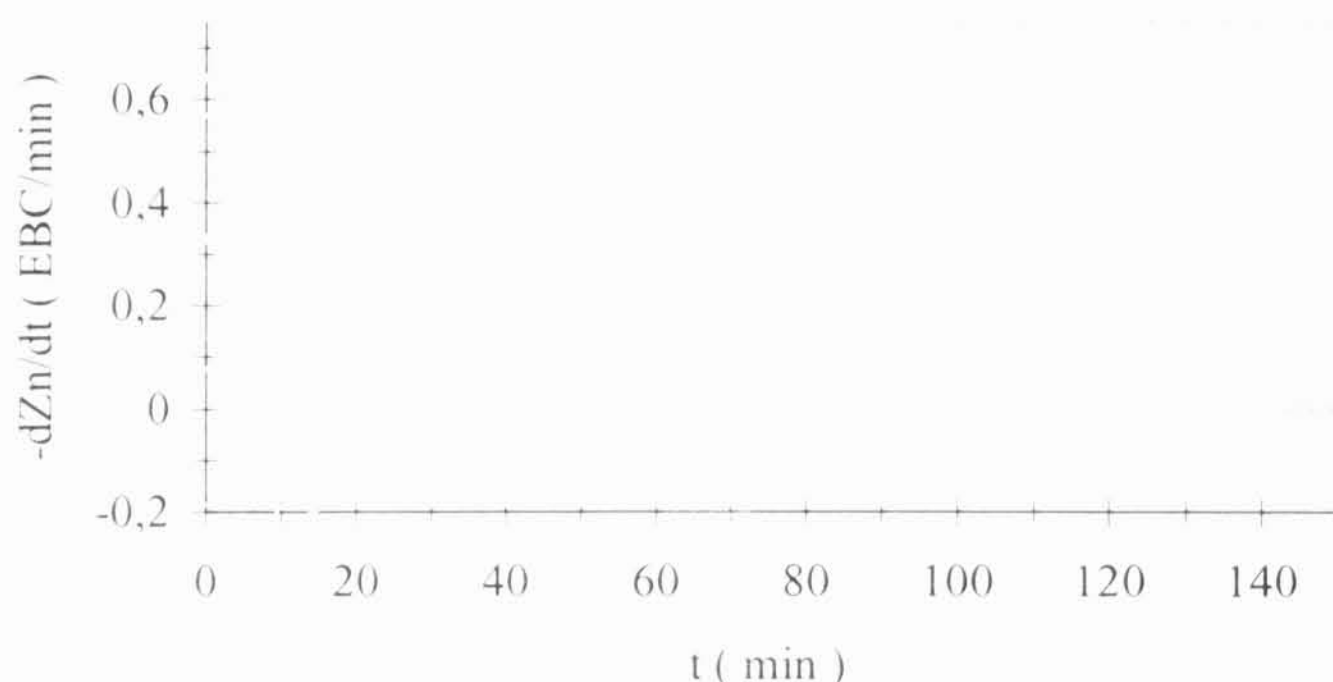
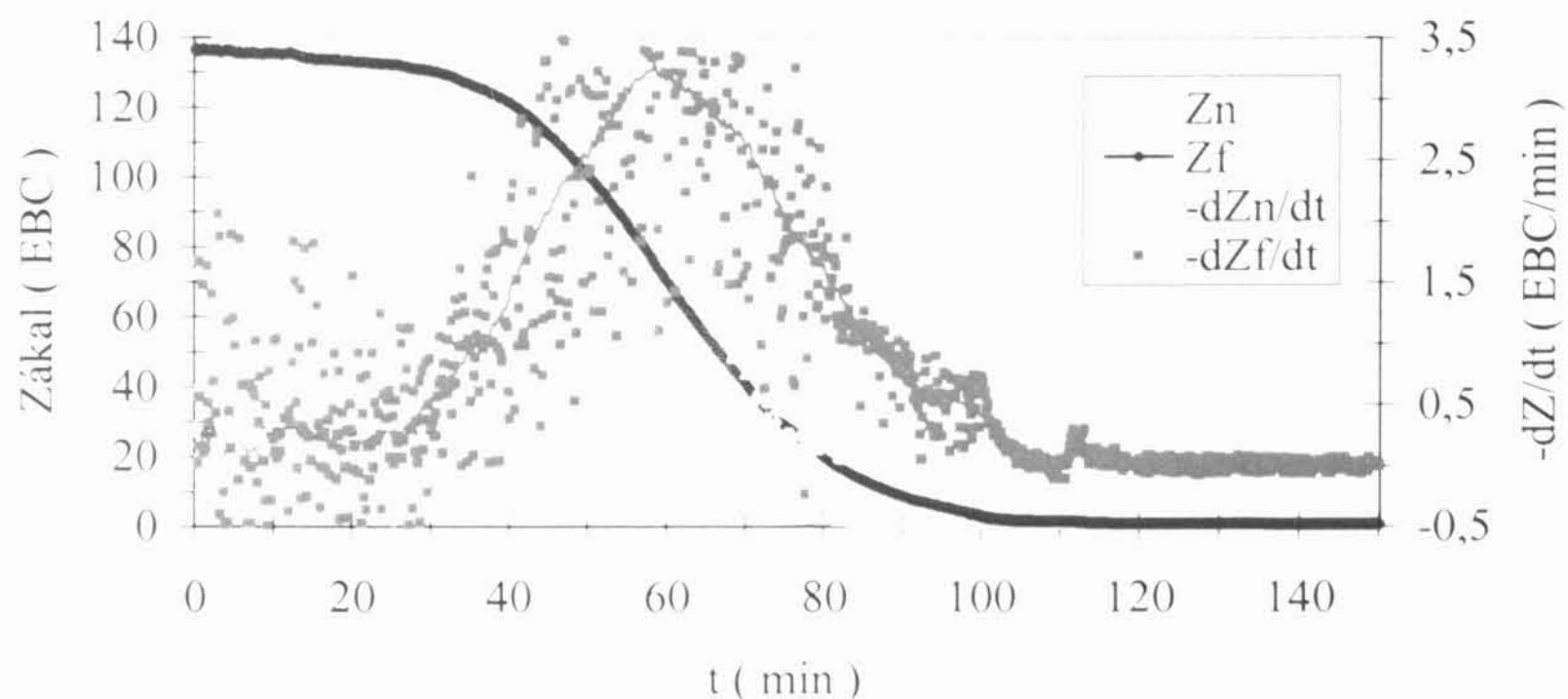
Obr.4-13 Sedimentační charakteristika kmene 95. Tyto buňky byly pěstovány v kvasném válci ve VÚPS na rozdíl od buněk kmene 95, jejichž charakteristiky jsou na obrázcích 4-2, 4-3 či 4-15. *Nahoře:* Průběh sedimentace kvasinek kmene 95. Zn označuje zákal suspenze měřený v úhlu 90° , Zf vyjadřuje zákal snímáný pod úhlem 15° . *Uprostřed:* Derivace sedimentační křivky kmene 95. *Dole:* Distribuce ploch průřezů buněk kmene 95.



Obr.4-14 Sedimentační charakteristika kmene 98. *Nahoře*: Sedimentace kvasinek kmene 98. *Uprostřed*: Derivace sedimentační křivky kmene 98. *Dole*: Distribuce ploch průřezů buněk kmene 98. Význam veličin je popsán v legendě obrázku 4-8.

První dva grafy na obr.4-15 znázorňují průběh sedimentace kvasinek kmene 95 z provozu pivovaru. Podle ploch průřezů buněk lze usoudit, že tyto buňky již byly minimálně jednou použity ke kvašení v CKT (bližší údaje nebyly k dispozici), neboť dosahovaly průměrné velikosti $S_p = (72 \pm 14) \mu\text{m}^2$ (hodnotu jsme určili z 340 buněk). Z obrázku 4-15 (dole i uprostřed) je patrné, že i tyto buňky stejně jako P0 a P1 byly odebrány ve stacionární fázi růstu, protože mezi nimi nebyly nalezeny žádné pučící buňky. Tento fakt se projevil poměrně úzkou a vcelku symetrickou distribucí ploch

průřezů buněk (obr.4-15 dole) i derivaci sedimentační křivky (obr.4-15 uprostřed), která nabývala ve srovnání s deseti výše zkoumanými kmeny úzkého maxima. Vývoj sedimentace tohoto kmene jsme měřili s frekvencí načítání dat 10 sekund, protože tento kmen kvasinek byl použit i pro měření různých flokulačních závislostí, které bylo vzhledem k rychlosti, s jakou flokulace probíhala, nutno vzorkovat každých 10 s. V ostatních sedimentačních experimentech byly body měřeny po 30 sekundách.

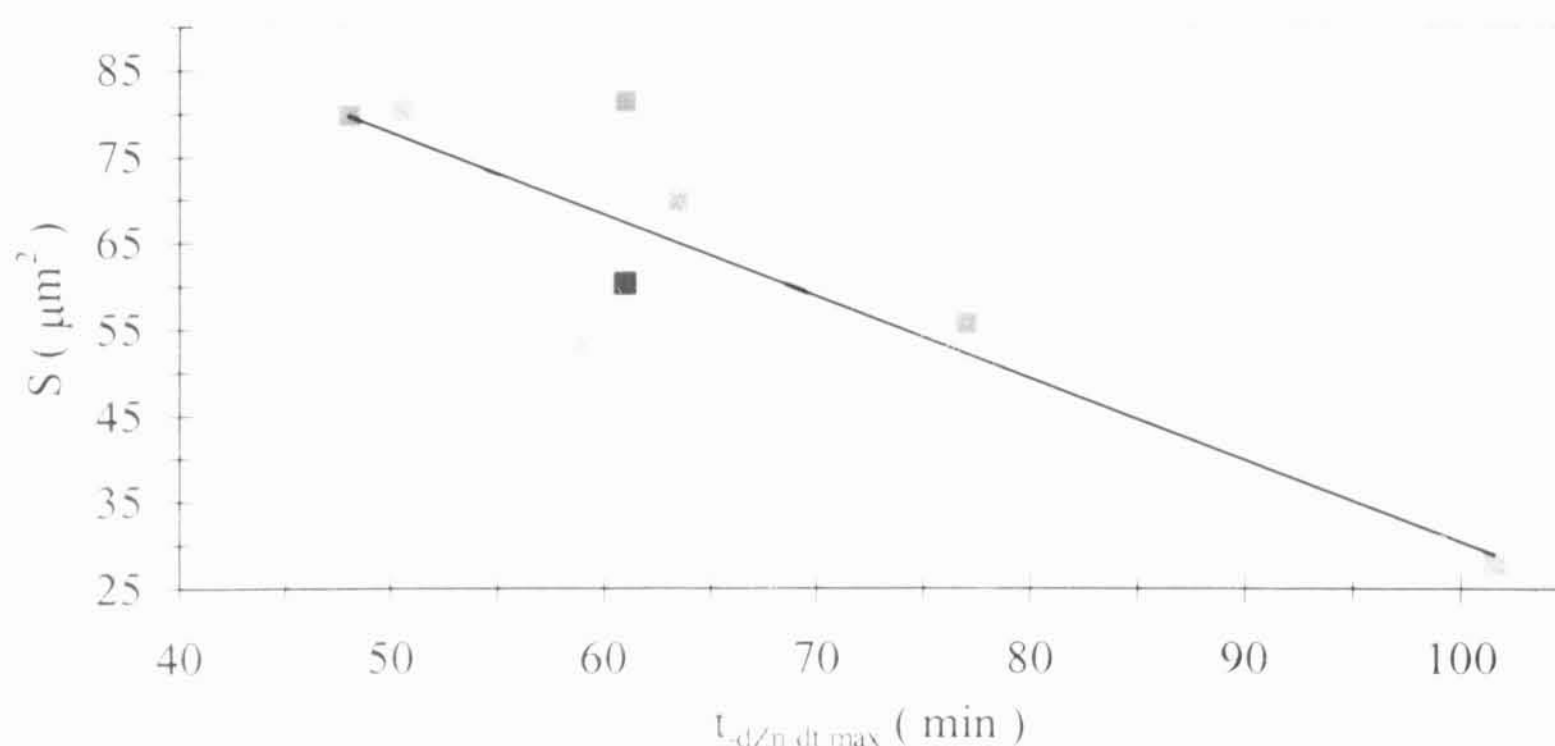


Obr.4-15 Sedimentační charakteristika kvasinek P (kmen 95), které byly použity při kvašení v CKT. *Nahoře:* Sedimentace kvasinek P. *Uprostřed:* Derivace sedimentační křivky. *Dole:* Distribuce ploch průřezů buněk P. Vysvětlení veličin lze najít v legendě obrázku 4-8.

Výsledkem všech výše zmíněných sedimentačních experimentů je obrázek 4-16, který zobrazuje vztah mezi velikostí buněk a jejich sedimentací a v budoucnosti by měl sloužit jako kalibrační křivka. Na svislé ose jsou vyneseny průměrné hodnoty velikostí průřezů buněk, na vodorovné pak časová maxima záporně vzatých derivací sedimentačních křivek, které jsme získali nařizováním příčinných závislostí pomocí programu Origin 7.0. Body v tomto grafu mají stejnou barvu jako derivace sedimentační křivky či distribuce velikostí buněk daného kmene, aby je bylo možné snadno identifikovat. Tuto přímku $S = a \cdot t_{-dZn/dt} + b$ lze využít k orientačnímu výpočtu velikosti kvasinek a z tvaru derivace sedimentační charakteristiky lze také určit, v jaké fázi růstu se kultura nachází, tj. zda obsahuje pučící buňky. Pokud budeme znát i čas odebrání buněk z mladiny, můžeme ze zastoupení pučících buněk usoudit, jak bude daný kmen prokvašovat mladinu a podle toho korigovat čas, jež by měly kvasinky strávit v mladině, aby ji správně prokvasily.

$$a = (-0,94 \pm 0,16) \text{ min}^{-1} \quad b = (125 \pm 11) \mu\text{m}^2 \quad R^2 = 0,743$$

Koeficient spolehlivosti R^2 představuje indikátor v rozsahu 0 až 1 udávající, jak přesně odpovídají předpokládané hodnoty závislosti skutečným naměřeným datům, v této souvislosti lze považovat $R^2 = 0,743$ za uspokojivý výsledek. Koeficienty a , b i R^2 lze samozřejmě ještě upřesňovat při dalších experimentech. Zároveň lze předpokládat, že je možné sestavit podobnou závislost pro každý kmen zvlášť tak, že by jednotlivé body reprezentovaly různé stádium vývoje kultury.

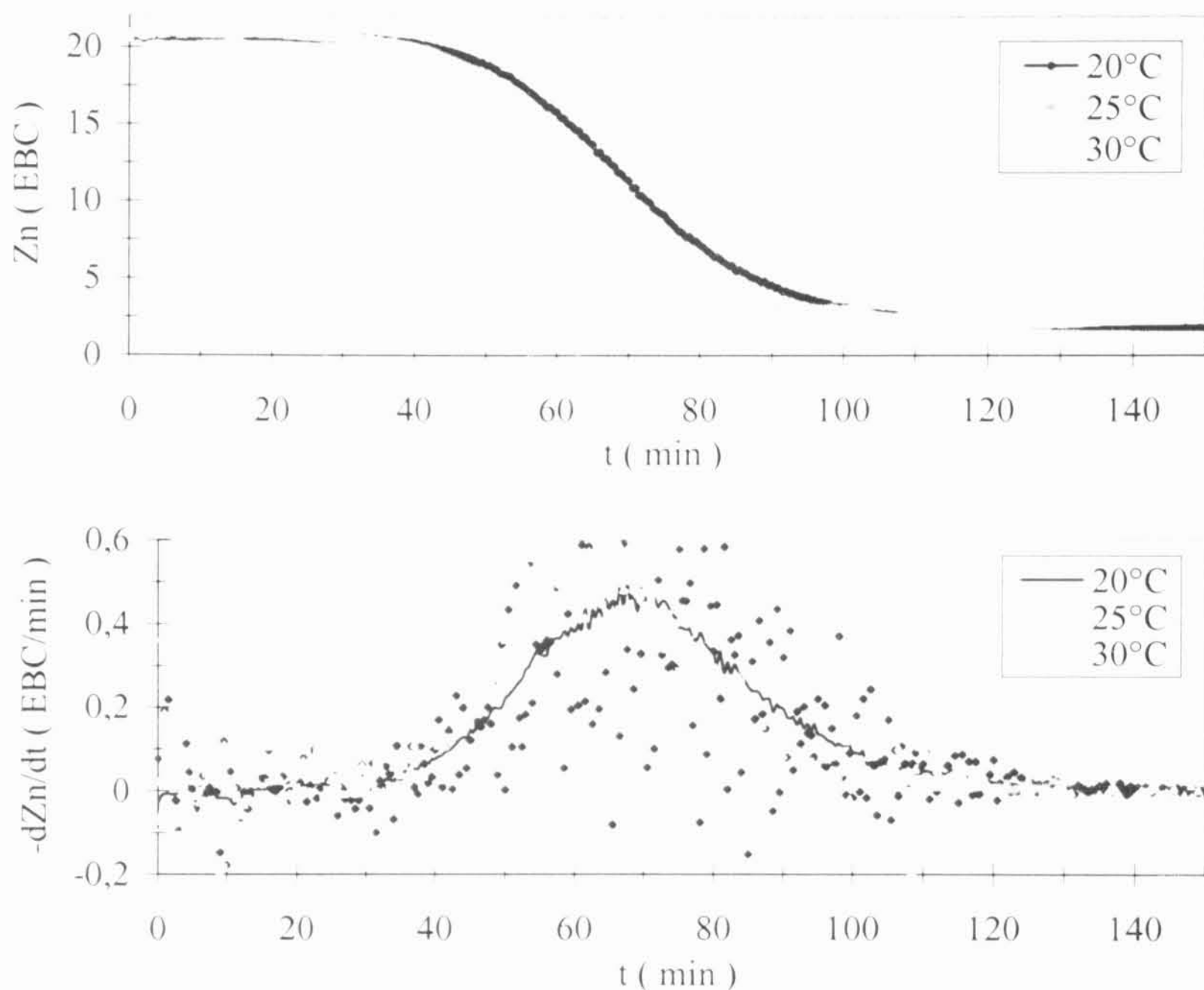


Obr.4-16 Kalibrační křivka pro výpočet průměrné plochy průřezu kvasinkové buňky S z časového maxima záporně vzatých derivací sedimentačních křivek měřených v úhlu 90° ($t_{-dZn/dt \text{ max}}$). Barvy bodů přísluší jednotlivým kvasinkovým kmenům tak, jak byly zavedeny v obrázcích 4-2 až 4-15.

Všechny sedimentační experimenty proběhly při teplotě 25°C , s výjimkou teplotní závislosti sedimentace kvasinek. Při měření sedimentace je nutné zachovávat konstantní teplotu, protože při vyšší teplotě buňky sedimentují rychleji, jak je vidět z obrázku 4-17.

Rozdíly hodnot sedimentačních rychlostí jsou zřejmé z tabulky 4-1, které byly vypočteny podle vzorce (8). V tabulce 4-1 jsou uvedeny hodnoty hustoty a viskozity vody při různých teplotách převzaté z tabulek Brože a kol. (1980) a vypočtené rychlosti sedimentace kvasinek při daných teplotách. Intervaly rychlostí zohledňují rozpětí rozměrů a hustot kvasinkových buněk (hodnoty hustoty a velikosti kvasinek byly uvedeny v úvodu této kapitoly). Nelze však předpokládat, že hodnoty sedimentačních rychlostí v tabulce 4-1 budou zcela odpovídat teplotní závislosti sedimentace, kterou

jsme měřili, protože naše měření probíhala v citrát-fosfátovém pufru, jehož hustota a viskozita nejsou zcela totožné s parametry vody, navíc použité buňky nebyly měřeny pod mikroskopem, tudíž není známa přesná distribuce jejich velikostí.



Obr.4-17 Nahoře je znázorněna teplotní závislost sedimentace kvasinek kmene 95. Z_n vyjadřuje zákal suspenze měřený v úhlu 90° . V dolní části obrázku je zakreslena teplotní závislost derivace sedimentační křivky kmene 95.

Tabulka 4-1: Teplotní závislost rychlosti sedimentace kvasinek *S. cerevisiae*. Rychlost v je vypočtena podle vzorce (8) za použití hodnot hustoty ρ a viskozity η vody při dané teplotě.

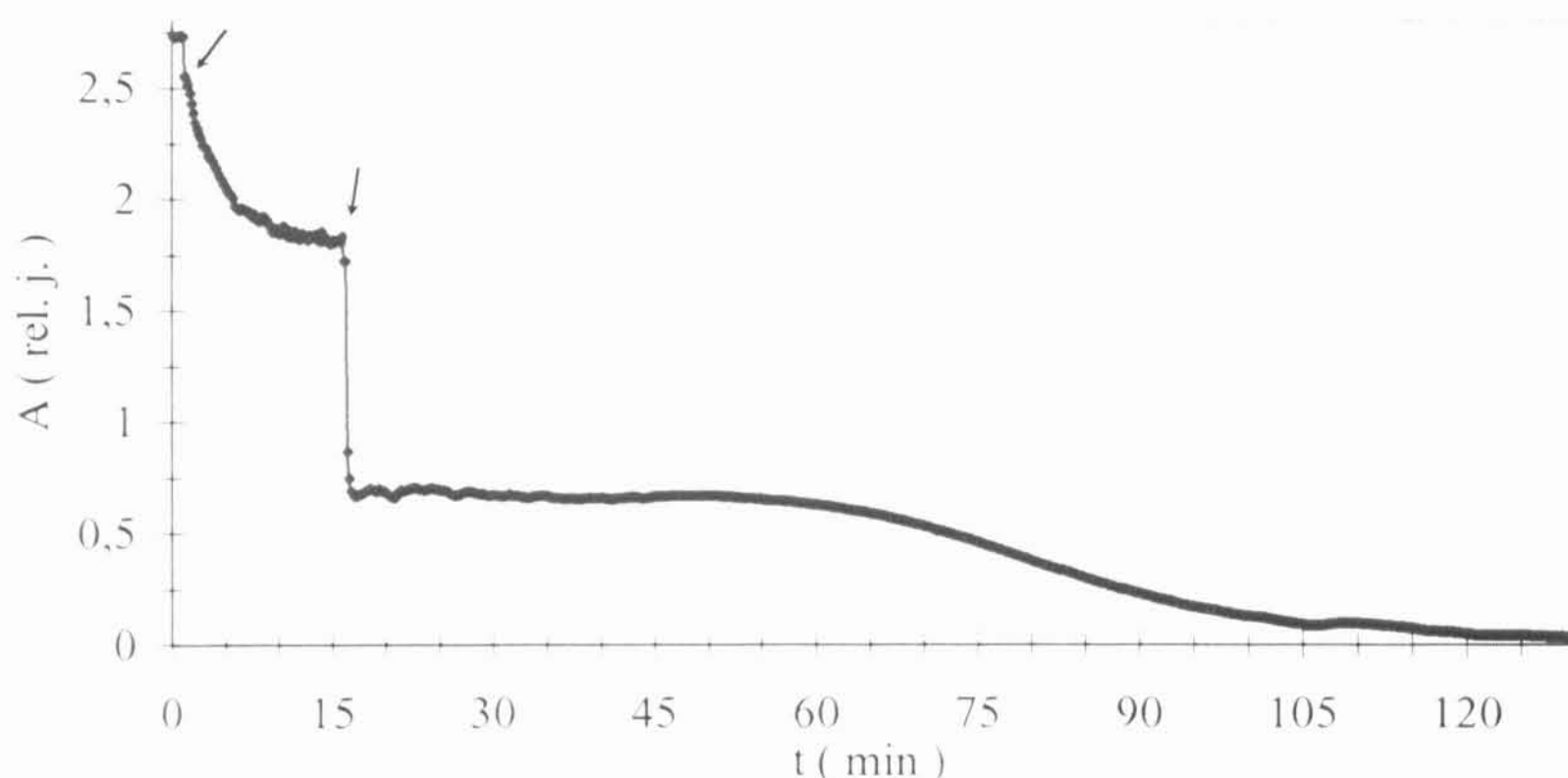
t $^\circ\text{C}$	ρ kg.m^{-3}	η $\text{m}^{-1}.\text{kg.s}^{-1}$	v m.s^{-1}
20	998,2063	$1,0019.10^{-3}$	$3,5.10^{-7} - 1,9.10^{-6}$
25	997,0480	$0,8909.10^{-3}$	$4,0.10^{-7} - 2,2.10^{-6}$
30	995,6511	$0,7982.10^{-3}$	$4,6.10^{-7} - 2,5.10^{-6}$

4.2. Flokulace kvasinek

Vzhledem k tomu, že doporučená koncentrace buněk pro optimální průběh flokulace by měla přesahovat 2.10^7 buněk/ml, tj. $Z_n > 150$ EBC a formazinový standard je pouze 1000 EBC (viz národní norma ČSN EN 27027 přijatá 14.1.1994), dali jsme v této kapitole přednost prezentování výsledků pomocí absorbance. Navíc při zvláště

vysokých koncentracích buněk se již uplatňuje i vícenásobný rozptyl světla, který by zkreslil hodnoty uváděné v Z_f i Z_n , tj. pomocí zákalů měřených v úhlech 15° a 90° .

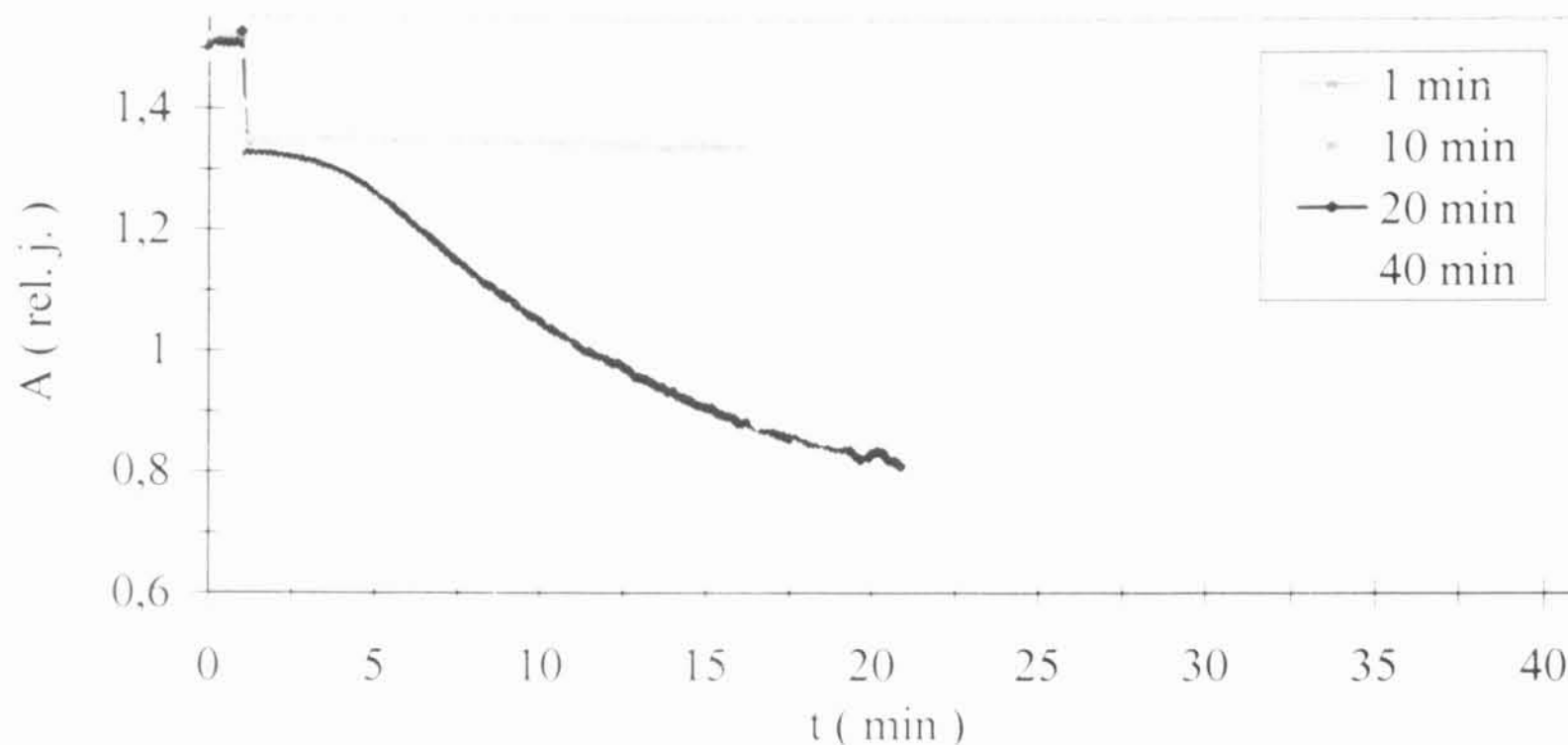
Na obrázku 4-18 je zobrazen typický průběh flokulačního experimentu. Do zákaloměru UZLP jsme vložili zkumavku se 4 ml kvasničné suspenze a magnetickým míchadlem, spustili měření i míchání vzorku. Po první minutě míchání jsme přidali 1 ml roztoku $0,5 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v citrát-fosfátovém pufru pH 4,5 (výsledná koncentrace byla 100 mM). Pokles absorbance v důsledku tohoto naředění suspenze označuje první šipka v obrázku 4-18. Dodáním vápenatých kationtů jsme splnili poslední podmínku, aby mohla zdárně začít flokulace kvasinek. Suspenzi kvasnic jsme míchali dalších 15 minut až do dosažení rovnovážného stavu, během tohoto času se postupně formovaly shluky kvasnic. Již záhy po přidání vápenatých iontů byly shluky kvasinek pozorovatelné pouhým okem a po 3 minutách bylo možné spatřit poměrně velké shluky kvasinek, jak se pohybují v relativně čirém objemu. Těsně před vypnutím míchání dosahovaly shluky kvasinek velikosti asi 1 mm.



Obr.4-18 Flokulace a sedimentace kvasinek kmene 95 z pivovaru. První šipka označuje přidání 1 ml roztoku $0,5 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v citrát-fosfátovém pufru pH 4,5 (výsledná koncentrace 100 mM, $5,96 \cdot 10^7$ buněk/ml). Druhá šipka ukazuje na čas, kdy bylo vypnuto míchání suspenze. Během následující minuty se usadí shluky kvasnic a poté už sedimentují pouze volné buňky.

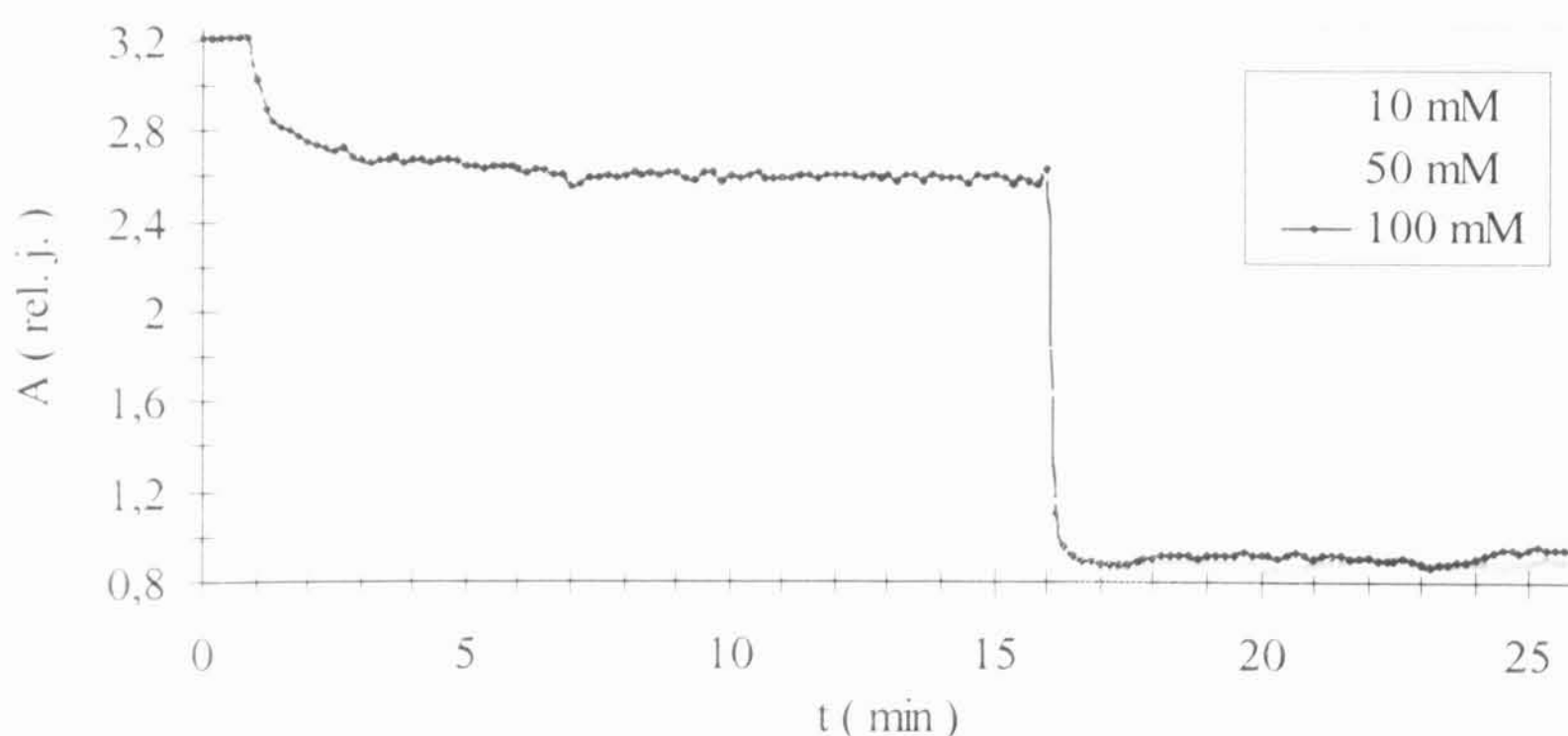
Druhá šipka v obrázku 4-18 upozorňuje na čas, kdy bylo zastaveno míchání suspenze, během následující minuty se usadily všechny shluky kvasnic a ve vzorku zůstaly pouze jednotlivé buňky, které postupně sedimentovaly. Tvar sedimentačně-flokulační křivky po sedmnácti minutách od začátku měření se tudíž nijak neliší od sedimentační křivky téhož typu kvasnic uvedené v obrázku 4-15 (nahore). Sedimentaci jednotlivých kvasinkových buněk jsme se podrobně věnovali v minulé kapitole, proto zde dále budeme uvádět pouze flokulační části experimentů.

V obrázku 4-19 je zaznamenána závislost flokulace kvasinek na délce míchání suspenze. Z obrázku je patrné, že míchání po dobu jedné minuty je nedostatečné pro navození flokulace, po vypnutí míchadla totiž absorbance vzorku neklesla, protože se nevytvořily shluky kvasinek, jejichž usazením by se mohla snížit. Je zřejmé, že pro iniciování flokulace je třeba suspenzi míchat, dokud se nezačne zvolna snižovat absorbance a v ideálním případě s vypnutím míchadla vyčkat až do doby, kdy se absorbance ustálí na určité hodnotě. Výhodou použití magnetického míchadla je, že dosahuje výborné reprodukovatelnosti, neboť jeho rychlost (200 rpm) je pevně dána možnostmi motorku, proto je také průběh ostatních křivek v obrázku 4-19 ve společném úseku zcela totožný.



Obr.4-19 Závislost flokulace kvasinek kmene 95 na délce míchání při koncentraci $1,26 \cdot 10^7$ buněk/ml

Závislost flokulace kvasinek na délce míchání jsme změřili na kvasinkách kmene 95 z pokusného CKT ve VÚPS (obr.3-3b, pro jednoduchost označme tyto kvasinky V), další flokulační charakteristiky jsme však museli proměřovat na kvasinkách kmene 95 z pivovaru (obr.3-3a, pojmenujme je P), protože buňky V během následujících dvou dnů zcela ztratily svou schopnost flokulovat. Jednou z příčin ztráty flokulence může být i to, že jsme ve vzorku našli jisté množství buněk ve stádiu pučení a specifický flokulační protein, jenž se podílí na flokulaci, je syntetizován až na konci buněčného cyklu. Proto jsme pozorovali u buněk V celkově slabší flokulaci oproti buňkám P, toto tvrzení dokládá i to, že pro vytvoření maximálního počtu a velikosti shluků buněk jsme v případě kvasinek V potřebovali 40 minut, zatímco při totožných počátečních podmínkách jsme u kvasinek P dosáhli stejného stavu již za 15 minut (viz obr.4-21, koncentrace $1,3 \cdot 10^7$ buněk/ml).

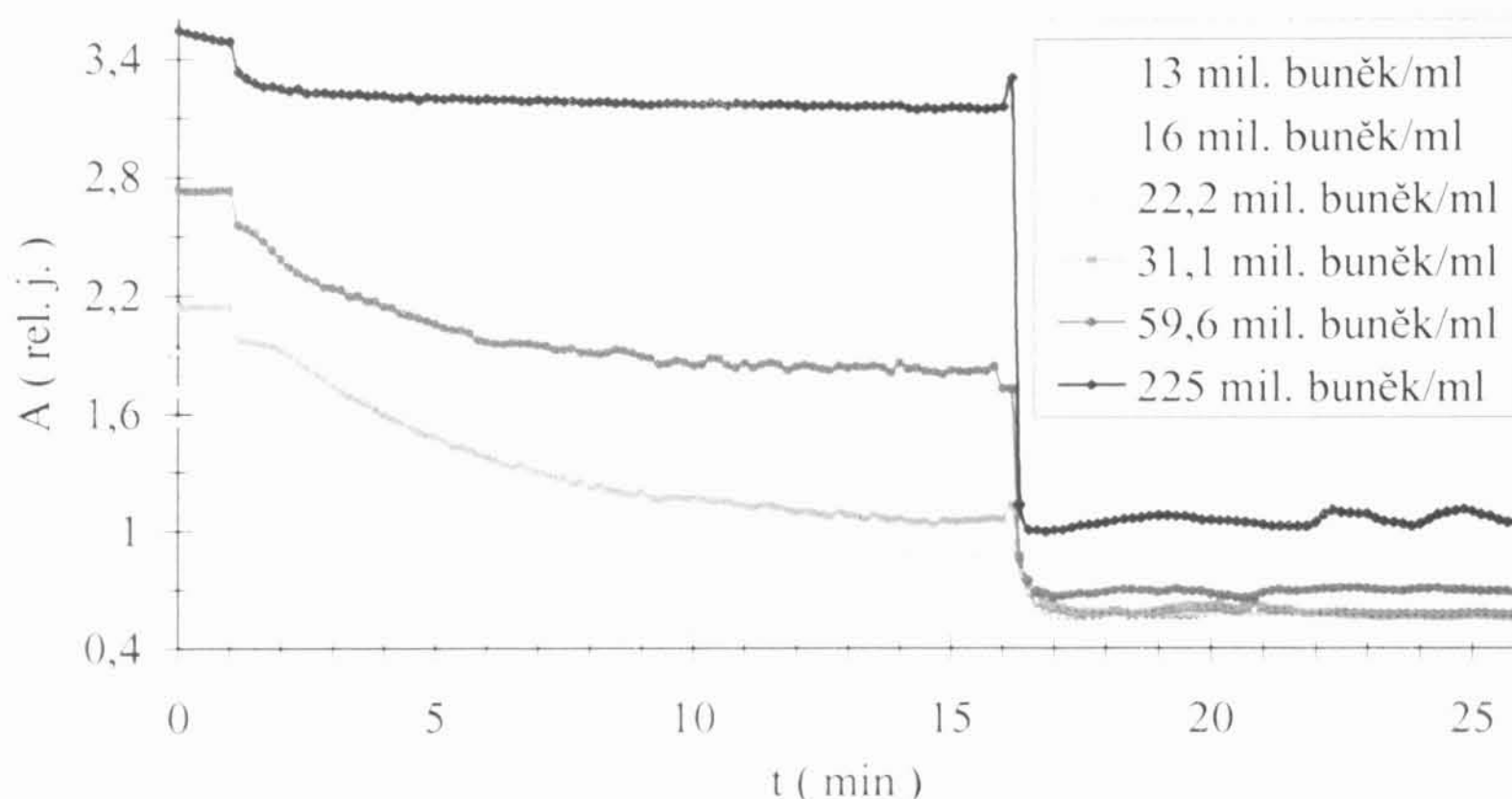


Obr.4-20 Závislost flokulace kvasinek kmene 95 na koncentraci vápenatých iontů

Na obrázku 4-20 je zaznamenán vliv koncentrace vápenatých iontů na flokulaci kvasinek, znatelné rozdíly jsme našli pouze v několika prvních minutách po přidání roztoku chloridu vápenatého. Při menší koncentraci (10 mM) se shluky kvasnic formovaly pomaleji, přesto po vypnutí míchání a usazení shluků kvasnic byla absorbance vzorku při všech třech koncentracích velmi podobná, lišila se o $\pm 0,03$. Přirozená koncentrace vápenatých iontů v mladině bude nepochybně o něco nižší, ale

v knize Kosaře a Procházky (2000), jež se jinak velmi obšírně zmiňuje o množství látek, které mají a naopak nesmějí být obsaženy v mladině, aby bylo možné vyrobit kvalitní pivo, je tento aspekt komentován slovy, že vápníku má být v mladině dostatek. Navíc obsah vápníku bude patrně silně závislý na surovinách, které konkrétní pivovar používá.

Závislost flokulace kvasnic kmene 95 na koncentraci buněk vystihuje obr.4-21. Se vzrůstající koncentrací buněk se postupně zmenšuje počáteční vodorovná fáze, během níž se tvoří mikroskopické shluky buněk. Při nižších koncentracích buněk je i menší pravděpodobnost srážek, při nichž se postupně nabalují další a další buňky. Zvláštním případem je koncentrace $2,25 \cdot 10^8$ buněk/ml, která je již tak vysoká, že se tvorba shluků vzhledem k jejich velkému počtu neprojeví poklesem signálu.

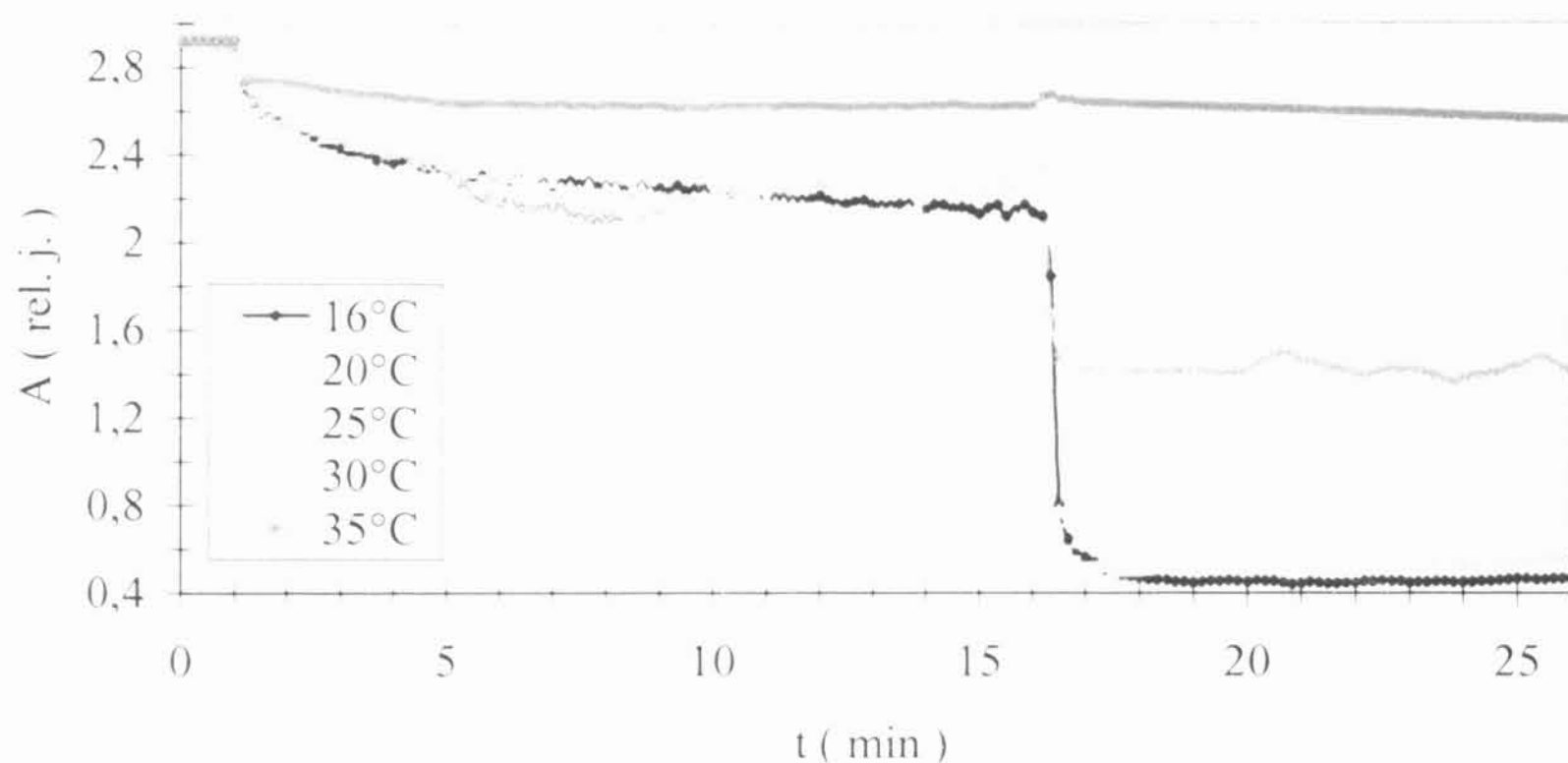


Obr.4-21 Závislost flokulace kvasinek kmene 95 na koncentraci buněk. Po první minutě měření byl přidán 1 ml roztoku $0,5 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v citrát-fosfátovém pufru (výsledná koncentrace 100 mM). Flokulaci jsme iniciovali mícháním suspenze po dobu 15 minut.

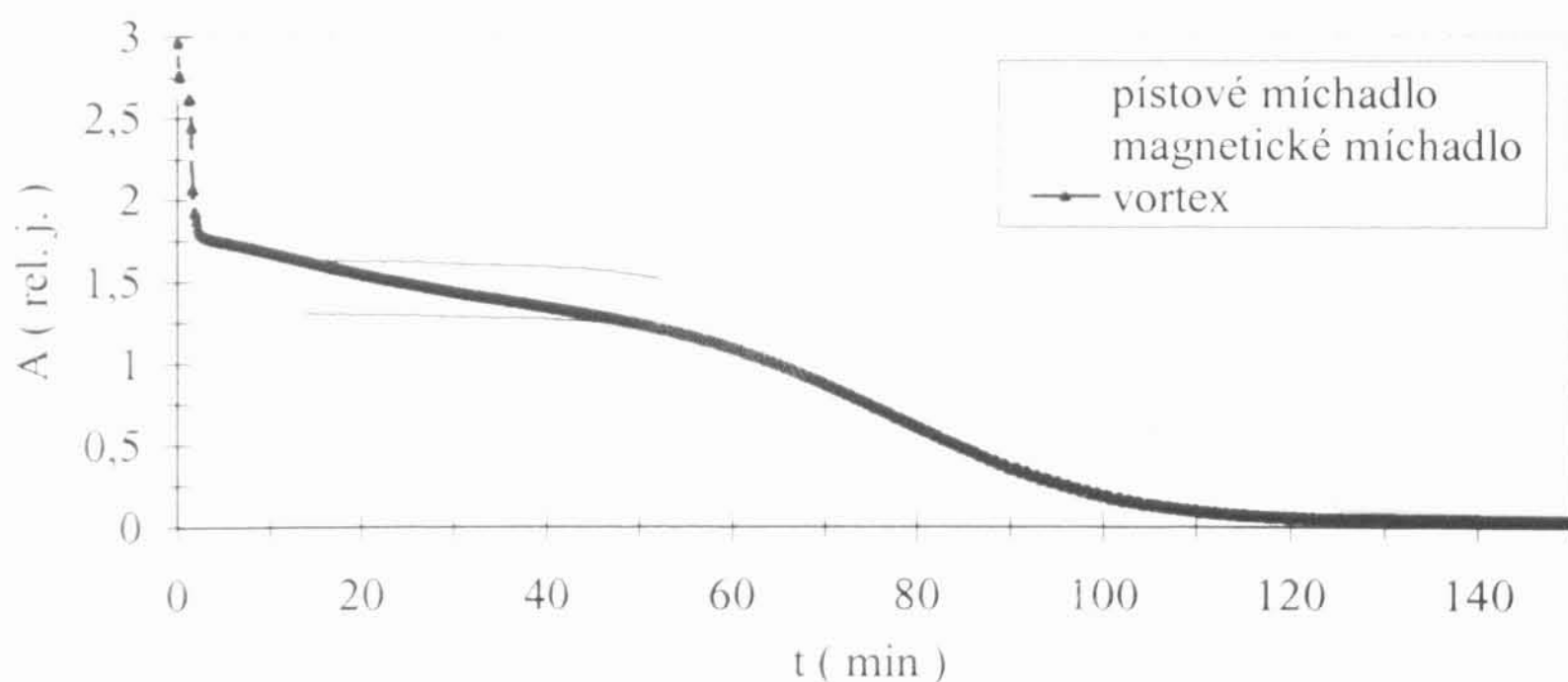
Vliv teploty na flokulaci kvasinek ilustruje obrázek 4-22. Vzorky kvasinek jsme před měřením nechávali vždy několik minut vytemperovat v lázni zákaloměru na požadovanou teplotu. Při teplotě 30°C jsme pozorovali silnou inhibici flokulace, a to jak v době míchání vzorku, tak po jeho vypnutí. Vyčerení suspenze při této teplotě bylo výrazně nižší než při 16°C či 20°C . Teplota 35°C narušila mechanismus flokulace do té míry, že se nevytvořily žádné shluky kvasinek. Z obr.4-22 taktéž vyplývá, že při teplotě 16°C je flokulace nejvydatnější, což je vcelku přirozené, protože tato teplota se nejvíce blíží teplotě, při které probíhá kvašení v CKT. Z technických důvodů již nebylo možné teplotu suspenze dále snižovat (zákaloměr UZLP není vybaven příliš výkonným termostatem), proto doporučujeme pro účely testování flokulace kvasinek teplotu měření 20°C , popřípadě 25°C jako kompromis mezi laboratorní teplotou, technickými možnostmi termostatu a požadavky kvasinek.

Flokulaci kvasnic lze podpořit různými způsoby míchání, tři z nich zobrazuje obr.4-23. Výchozí koncentrace byla ve všech případech totožná ($8,8 \cdot 10^7$ buněk/ml) a na buňky jsme působili jednu minutu, např. suspenzi kvasnic jsme během této doby $30\times$ projeli pístovým míchadlem. Černé křivky naznačují, jak by vypadala sedimentace jednotlivých buněk při zdánlivě stejné koncentraci buněk. Hlavní nevýhodou při použití vortexu je to, že vzorek je nutné vyjmout z měřicí komory zákaloměru a některé rychlé procesy tak mohou proběhnout ještě dříve, než se nám ho tam podaří po promíchání opět vrátit. Naopak magnetické i pístové míchadlo lze použít přímo v zákaloměru. Vortex a zvláště pak pístové míchadlo patrně generují celou řadu různě velkých shluků kvasnic soudě podle pozvolného poklesu absorbance v prvních 50 minutách, během

jedné minuty po vortexování jsme pozorovali podobný propad absorbance jako při použití magnetického míchadla, toto snížení absorbance vypovídá o usazování velkých shluků kvasnic. Křivky na obr.4-23 jsou vůči sobě posunuty, protože jak magnetické, tak pístové míchadlo bylo ponořeno do kapaliny, tudíž celkové objemy vzorků se vzájemně lišily. Bez zajímavosti není ani to, že ač jsme míchali suspenzi magnetickým míchadlem pouze jednu minutu a od promytí kvasnic v době měření uběhl již týden, kvasinky velmi vydatně flokulovaly na rozdíl od kvasinek V (obr.4-19), které byly proměřovány pouhý jeden den po promytí, nutno však přiznat, že koncentrace buněk V byla téměř sedmkrát nižší.



Obr.4-22 Teplotní závislost flokulace kvasinek kmene 95. Ve všech případech jsme flokulaci iniciovali přidáním 1 ml roztoku 0,5 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v citrát-fosfátovém pufru pH 4,5 (výsledná koncentrace 100 mM, $8,45 \cdot 10^7$ buněk/ml) a patnáctiminutovým mícháním suspenze.



Obr.4-23 Závislost flokulace kvasnic na druhu míchání. Ve všech třech experimentech byla počáteční koncentrace buněk totožná ($8,8 \cdot 10^7$ buněk/ml) a vzorky kvasinek jsme míchali 1 min. Černé křivky naznačují, jak by vypadala sedimentace volných buněk při zdánlivě stejné koncentraci kvasinek.

Tabulka 4-2 obsahuje nejen koncentrace buněk při jednotlivých měřeních, ale i návrh vyhodnocení flokulačních testů. Veličiny F_1 až F_4 jsou definovány následujícími vztahy, kde A_t značí absorbanci v daném čase:

$$F_1 = \frac{A_{1:10} - A_{16:00}}{A_{1:10}} \cdot 100\% \quad (9)$$

F_1 vyjadřuje změnu absorbance v důsledku formování shluků kvasinek (roztok chloridu vápenatého jsme přidali v 1:00, čas 1:10 je tedy první s konečnou koncentrací buněk, hodnota absorbance v 16:00 je posledním bodem před vypnutím míchání). Parametr F_1 popisuje, jak se díky vytvoření shluků kvasinek zkoumaný vzorek postupně vyčeřuje.

$$F_1 = \frac{A_{1:00} - A_{1:10}}{A_{1:10}} \cdot 100\% \quad (10)$$

F_2 hodnotí pokles absorbance způsobený flokulací, tento parametr v sobě spojuje změnu absorbance v důsledku tvorby shluků i jejich usazování a je nejvíce podobný veličinám, které jsou používány v literatuře pro popis flokulace, nejčastěji se totiž uvádí procentuální změna absorbance před a po flokulaci kvasinek. $A_{17:10}$ je absorbance po jedné minutě bez míchání, tj. po usazení shluků kvasnic.

$$F_2 = \frac{A_{1:10} - A_{17:10}}{A_{1:10}} \cdot 100\% \quad (11)$$

F_3 shrnuje celkovou změnu absorbance po 25 minutách měření, tento údaj se zpravidla nijak výrazně neliší od hodnoty F_2 , což svědčí o tom, že během první minuty po vypnutí míchadla se usadily všechny shluky kvasinek. Pokud nás zajímá pouze vlastní flokulace, tak není třeba tento faktor již počítat.

$$F_3 = \frac{A_{16:00} - A_{17:10}}{A_{16:00}} \cdot 100\% \quad (12)$$

Poslední z veličin vyjadřuje, jaký podíl má na poklesu absorbance samotné usazení shluků kvasnic.

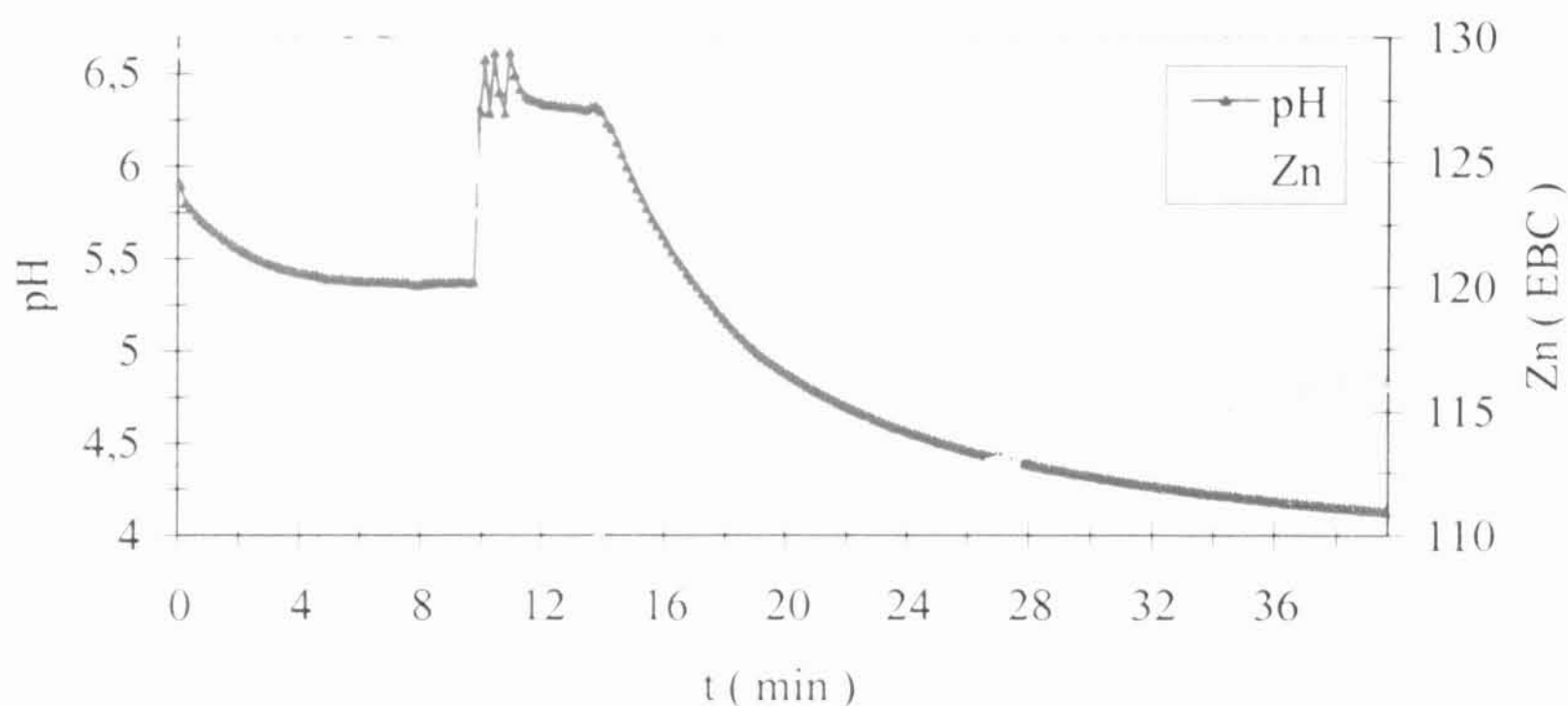
Tabulka 4-2: Vyhodnocení flokulačních testů

Popis testu	c <i>buněk / ml</i>	F_1 %	F_2 %	F_3 %	F_4 %
Obr. 4-20 – 10 mM	$1,27 \cdot 10^8$	9,3	71,8	72,0	68,9
Obr. 4-20 – 50 mM	$1,27 \cdot 10^8$	12,5	71,4	70,0	67,3
Obr. 4-20 – 100 mM	$1,27 \cdot 10^8$	9,0	69,8	68,1	66,8
Obr. 4-21	$2,25 \cdot 10^8$	5,2	69,9	68,9	68,3
Obr. 4-21	$5,96 \cdot 10^7$	32,5	74,0	73,6	61,5
Obr. 4-21	$3,11 \cdot 10^7$	46,5	69,4	72,2	42,8
Obr. 4-21	$2,22 \cdot 10^7$	50,4	67,1	67,2	33,7
Obr. 4-21	$1,6 \cdot 10^7$	51,7	65,9	70,3	29,3
Obr. 4-21	$1,3 \cdot 10^7$	49,6	62,5	65,3	25,6
Obr. 4-22 – 16°C	$8,45 \cdot 10^7$	21,1	80,1	82,8	74,8
Obr. 4-22 – 20°C	$8,45 \cdot 10^7$	29,7	80,8	79,8	72,7
Obr. 4-22 – 25°C	$8,45 \cdot 10^7$	25,0	74,9	75,2	66,5
Obr. 4-22 – 30°C	$8,45 \cdot 10^7$	16,5	47,7	48,0	37,4
Obr. 4-22 – 35°C	$8,45 \cdot 10^7$	4,3	3,8	6,8	-0,5

4.2. Acidifikační testy

Ději, které probíhají v buňce během acidifikačního testu, jsme se podrobně zabývali v kapitole 2.3.2., proto se nyní soustředíme na samotné měření acidifikačních testů a jejich výsledky. Na obr. 4-24 je znázorněn typický průběh acidifikačního testu, naměřený na kvasinkách kmene 9 z VÚPS.

Kvasinky jsme rozmíchali v destilované vodě s pH upraveným na hodnotu 6,3. 15 ml této suspenze odpipetujeme do zkumavky a spustíme měření. Během prvních deseti minut jsme pozorovali, jak kvasinky spontánně snižují pH, zatímco optický signál se neměnil. Po uplynutí deseti minut dorovnáme hydroxidem sodným pH suspenze na 6,3. přidávání hydroxidu vytvoří skoky v křivce Zn, protože ředění suspenze kvasnic vede ke snižování zákalu. Poté, co se pH suspenze ustálí na hodnotě 6,3, přidáme k suspenzi kvasnic 750 μ l 21,8 % glukosu (výsledná koncentrace 60 mM), což se projeví posledním výrazným propadem na křivce zákalu. Od tohoto okamžiku kvasinky zpracovávají vnější zdroj energie (glukosu) a dále snižují pH okolního prostředí. Během tohoto období zpravidla optický signál mírně roste jako v případě kmene 9 nebo zůstává konstantní, tento jev může být způsoben zvětšováním objemu popřípadě dělením jednotlivých buněk, protože suspenze všech kmenů obsahovaly značné množství dělicích se buněk v různém stádiu pučení (viz kapitola 4.1.).



Obr.4-24 Acidifikační test pivovarských kvasinek kmene 9. Po 10 minutách měření vyrovnáme pH kvasničné suspenze hydroxidem sodným na hodnotu 6,3 a přidáme roztok glukosu. Skoky v hodnotách zákalu (Zn) odpovídají ředění suspenze kvasnic hydroxidem nebo roztokem glukosu.

V tabulce 4-3 a na obrázku 4-25 je shrnut průběh acidifikačních testů deseti kmenů pivovarských kvasinek. Hodnoty v tabulce byly vypočteny podle následujících vzorců, kde pH_5 značí hodnotu pH po 5 minutách měření, obdobně pH_{10} . Změnu pH v první části acidifikačního testu bez substrátu vyjadřuje veličina ΔpH_1 . Vývoj poklesu pH suspenze po přidání substrátu charakterizují veličiny ΔpH_2 a ΔpH_3 , kde pH_0 označuje přesnou hodnotu, na kterou jsme upravili pH suspenze těsně před přidáním glukosu, v ideálním případě je tato hodnota rovna 6,3. Acidifikační sílu kmenů jsme určili ze dvou časových období (AP_1 a AP_2).

$$\Delta pH_1 = 6,3 - pH_5 \quad (13)$$

$$\Delta pH_2 = pH_0 - pH_5 \quad (14)$$

$$\Delta pH_3 = pH_0 - pH_{10} \quad (15)$$

$$AP_1 = \Delta pH_1 + \Delta pH_2 \quad (16)$$

$$AP_2 = \Delta pH_1 + \Delta pH_3 \quad (17)$$

V tabulce 4-3 je dále uvedena hodnota pH_D , jež byla změřena po uplynutí času t_D od přidání glukosu. Suspenze byly během této doby uchovávány při teplotě 25°C, při níž probíhala i jednotlivá měření. Posledním údajem v tabulce 4-3 je čas t_0 , který zabrala příprava daného vzorku kvasnic, než bylo spuštěno měření, jehož výsledky jsou na obrázku 4-25 (nahore). Délka času t_0 u kmene 12 (6 min) vysvětluje, proč se neobjevil typický pokles pH v prvních minutách měření. Pro lepší vypovídací schopnost

první části acidifikačního testu by bylo nutné zajistit konstantní čas přípravy vzorků, nebo pomocí stopek stanovit přesný čas t_0 , aby bylo možné naměřené křivky tzv. posunout, tudíž přesněji určit i ΔpH po 5 či 10 minutách.

Tabulka 4-3: Změna pH suspenze kvasnic po 5 minutách měření bez substrátu (ΔpH_1), změna pH suspenze kvasnic po 5 a 10 minutách od přidání substrátu (ΔpH_2 , ΔpH_3). Hodnoty acidifikační síly, kdy $\text{AP}_1 = \Delta\text{pH}_1 + \Delta\text{pH}_2$ a $\text{AP}_2 = \Delta\text{pH}_1 + \Delta\text{pH}_3$. Hodnoty pH_D suspenze po uplynutí času t_D od přidání glukosy. Čas t_0 zabrala příprava vzorků.

kmen	ΔpH_1	ΔpH_2	ΔpH_3	AP_1	AP_2	t_D (h:min)	pH_D	t_0 (min)
3	1,064	1,087	1,530	2,151	2,594	7:58	3,583	2
6	0,818	1,042	1,518	1,860	2,336	7:12	3,464	3
8	0,252	0,783	1,185	1,035	1,437	6:06	3,682	2
9	0,912	1,214	1,707	2,126	2,126	5:20	3,523	3
11	1,094	1,331	1,837	2,425	2,931	4:39	3,579	4
12	1,122	0,965	1,484	2,087	2,606	3:20	3,711	6
26	0,853	1,273	1,797	2,126	2,650	2:30	3,758	4
32	0,882	1,168	1,647	2,050	2,529	8:37	3,477	2
95	0,507	1,110	1,723	1,617	2,230	1:49	3,907	4
98	0,222	1,463	1,960	1,685	2,182	0:59	3,981	4

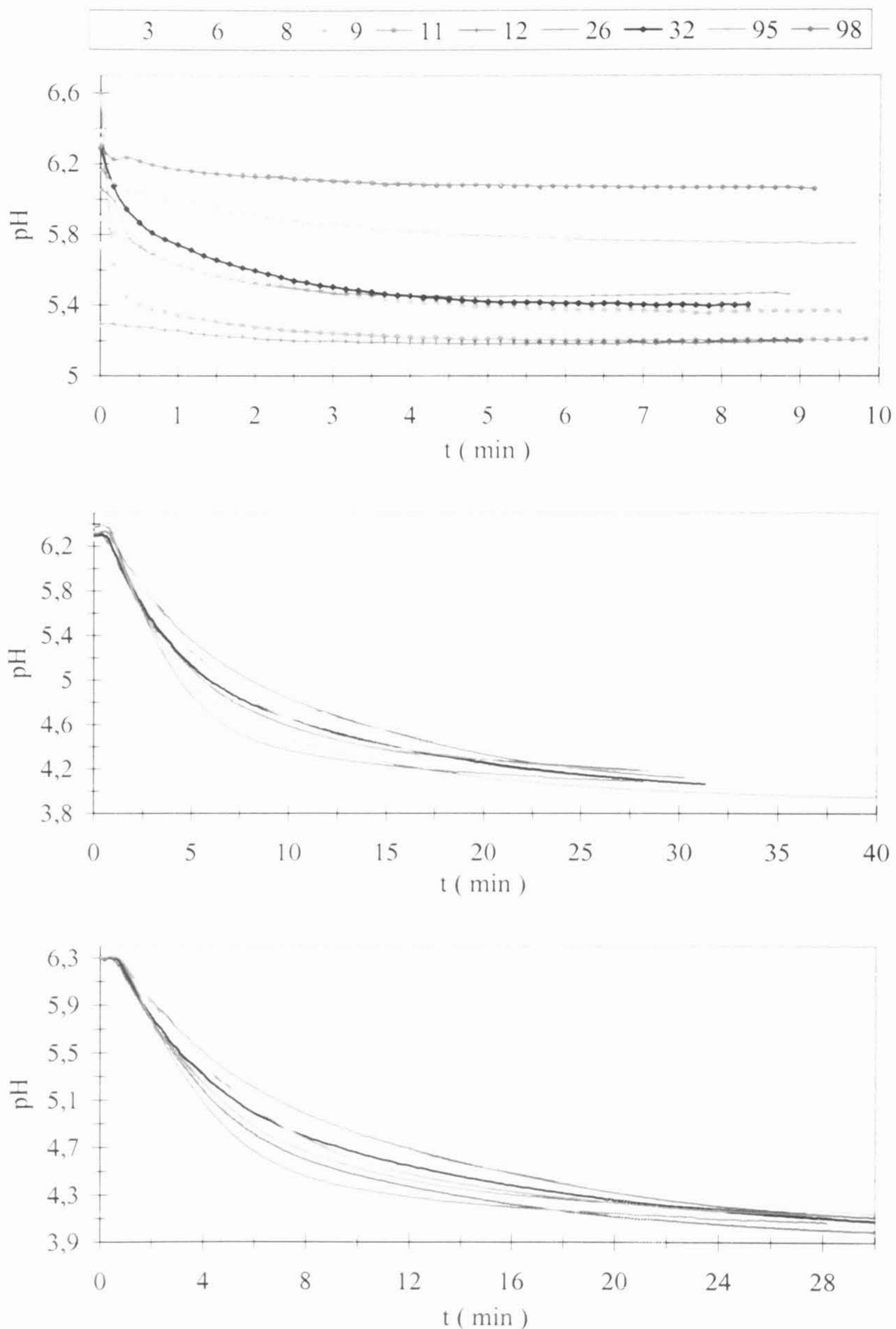
Prostřední graf na obrázku 4-25 znázorňuje průběh acidifikačního testu po přidání glukosy, podobně jako spodní graf na obrázku 4-25, kde jsme hodnoty pH normalizovali na počáteční hodnotu 6,3, protože reálná data se od této hodnoty o několik setin až desetin lišila. Na základě výsledků kmenů v obou částech acidifikačního testu jsme stanovili jejich pořadí:

$$8 < 6 < 3 < 12 = 32 < 95 < 26 < 9 = 98 < 11$$

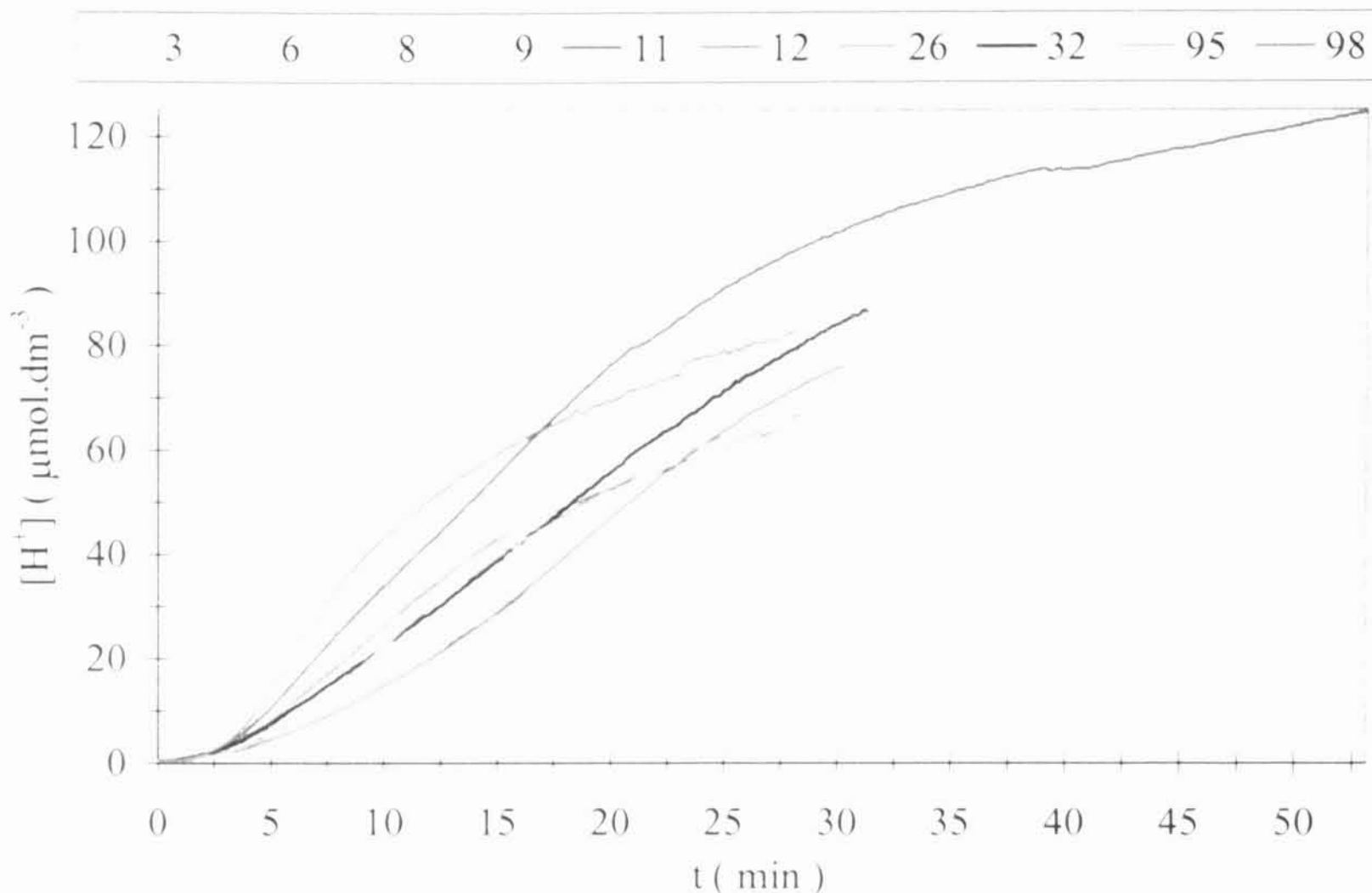
Kmenům jsme přiřadili čísla od jedné do deseti podle jejich úspěšnosti okyselování vnějšího prostředí během prvních 5 minut před přidáním a po přidání substrátu a dále po 25 minutách od přidání substrátu. Z těchto 3 pořadových čísel jsme aritmetickým průměrem sestavili výsledný žebříček. Tento postup jsme zvolili kvůli lepší vypovídající schopnosti, protože např. z dolního grafu na obrázku 4-25 je zřejmé, že účinnost, s jakou kmeny snižují pH, se v průběhu času mění. Zatímco po 5 minutách dosáhl maximální hodnoty snížení pH kmen 98, po 25 minutách držel prvenství kmen 11 apod. Kmeny lze hodnotit i podle velikosti acidifikační síly, ale ta je vypočítávána z poměrně krátkého časového úseku. Avšak kvašení je dlouhodobý proces, proto je třeba vzít v úvahu nejen okamžitou reakci na přidání substrátu.

Bez přidání substrátu snížily pH destilované vody nejméně kmeny 98, 8 a 95, což svědčí o jejich malých vnitřních zásobách energie. Na opačné straně žebříčku se pohybují kmeny 3, 11 a 12. Vnitrobuněčné zdroje ostatních kmenů se jeví jako vyrovnané. Během prvních 15 min po přidání glukosy snížily kvasinky kmene 98 pH na 4,229, naopak nejpomaleji měnily pH roztoku kvasinky z kmene 8 ($\text{pH} = 4,800$). Tento vývoj může vypovídat jak o pomalejším přizpůsobení novým podmínkám, tak o celkově slabším metabolismu kmene 8, jenž zaostával již ve fázi testu, která probíhala v samotné destilované vodě.

Pro zrekonstruování celého průběhu acidifikační křivky by bylo třeba měřit jednotlivé kmeny 50 – 60 minut, teprve pak není patrný zlom mezi počáteční částí závislosti pH a koncovým bodem změřeným po několika hodinách. Na obrázku 4-26 je znázorněn vývoj koncentrace protonů, která odpovídá danému pH suspenze. Acidifikační testy všech kmenů proběhly v jeden den v pořadí: 32, 3, 6, 8, 9, 11, 12, 26, 95 a 98, koncentrace kvasinek se vždy pohybovala v rozmezí $3 - 4 \cdot 10^7$ buněk/ml.



Obr.4-25 Acidifikační testy 10 kmenů pivovarských kvasinek. *Nahoře* je zaznamenán pokles pH kvasničné suspenze před přidáním substrátu. *Uprostřed* je zachycen pokles pH po přidání glukosy. *Dole* je zakreslen opět pokles pH po přidání glukosy, ale tentokrát jsme data znormalizovali na počáteční hodnotu pH = 6,3, aby bylo možné výsledky jednotlivých měření lépe srovnávat. Kmenům jsme přiřadili stejné barvy jako v kapitole 4.1.

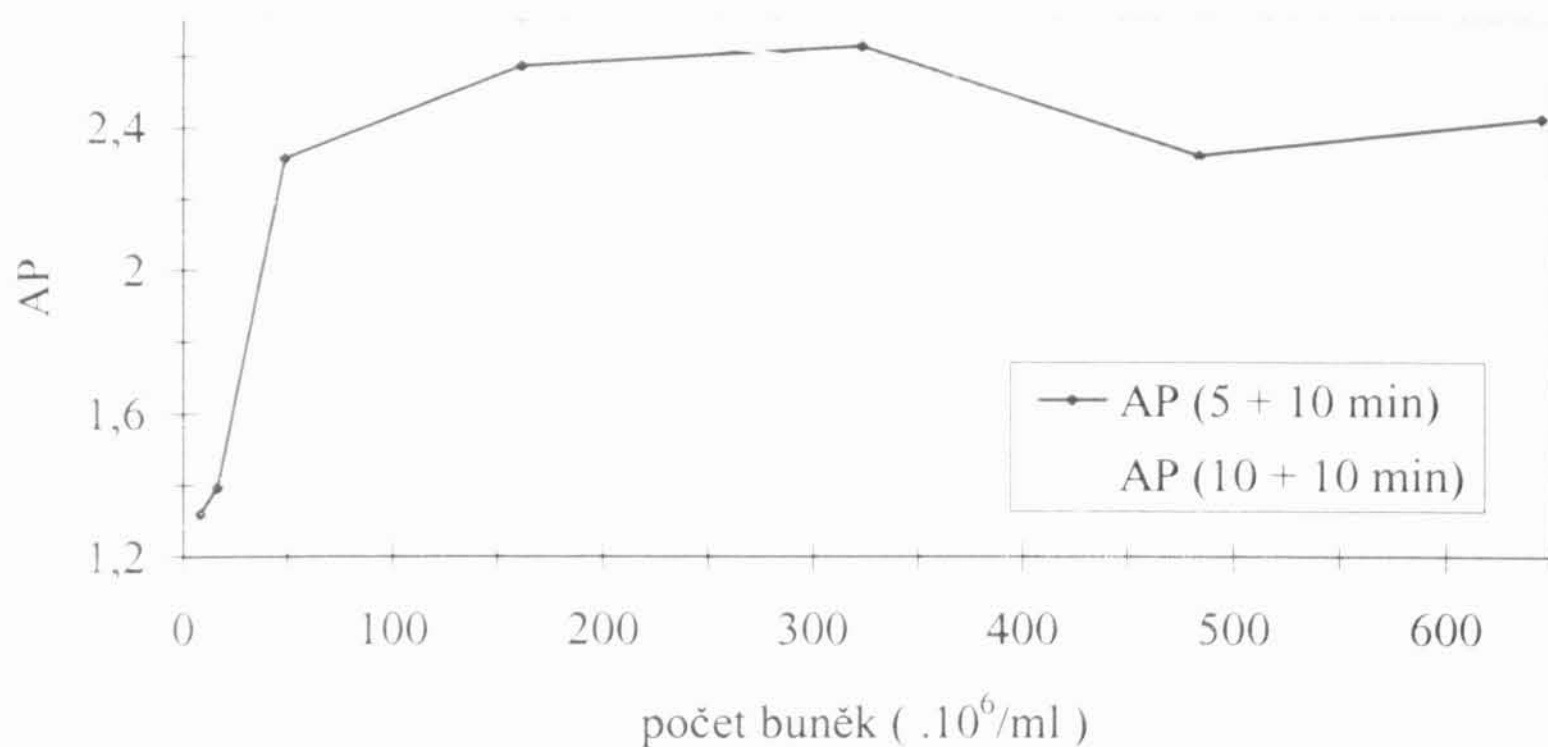
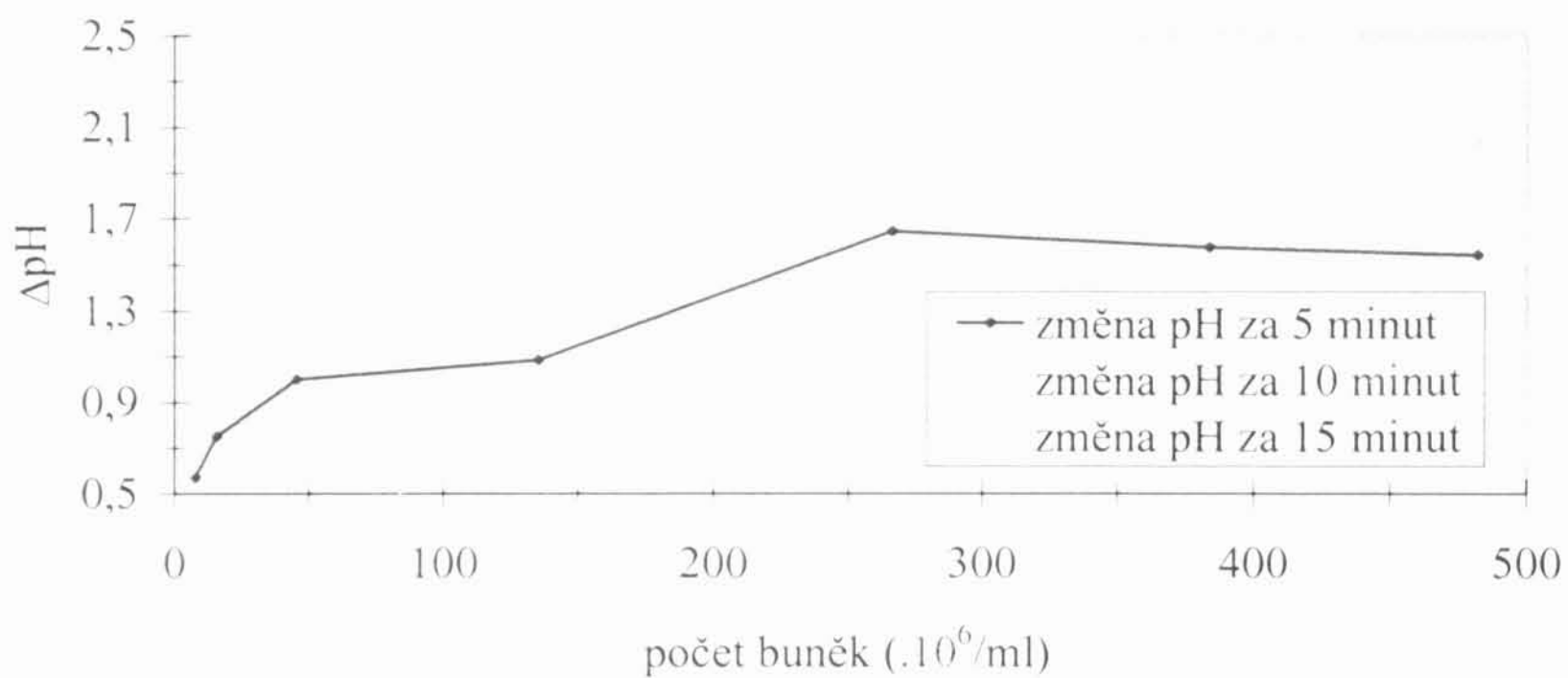
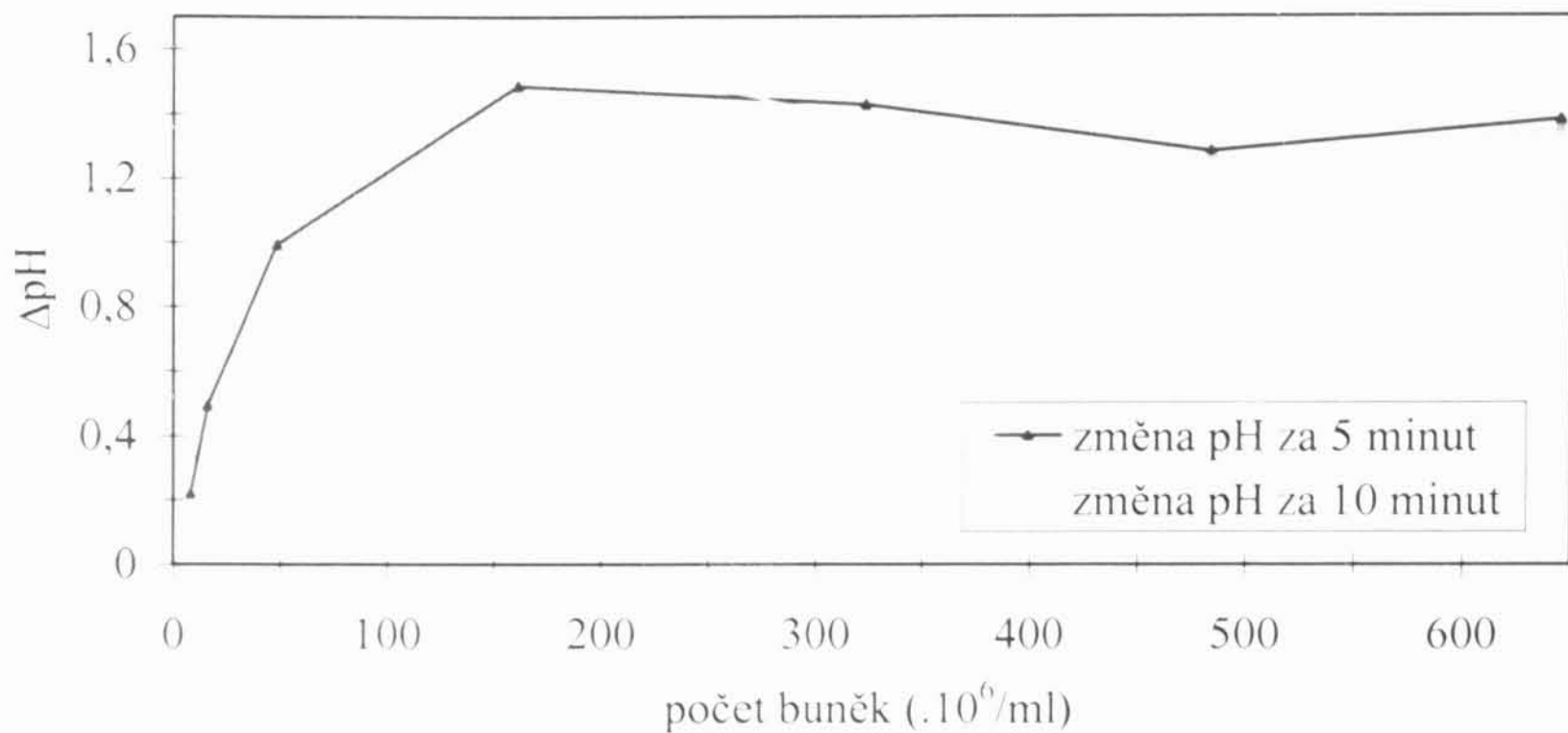


Obr.4-26 Vývoj koncentrace protonů po přidání roztoku glukosy k suspenzím deseti kmenů pivovarských kvasinek. Barevné označení kmenů jsme zachovali tak, jak bylo zavedeno v kapitole 4.1.

Vliv koncentrace buněk na výsledky acidifikačních testů ilustruje obr.4-27. Tato měření jsme provedli na kvasinkách kmene 95, poslední dvě nejvyšší koncentrace buněk byly měřeny o den později, což by vysvětlovalo drobný propad této části koncentrační závislosti, jak v samotném rozdílu pH před (první graf na obr.4-27) a po přidání glukosy (druhý graf na obr.4-27), tak acidifikační síly (třetí graf na obr.4-27).

Měření koncentrační závislosti AP kmene 95 nám přineslo i jeden poznatek o flokulaci. Vzhledem k tomu, že pro acidifikační testy se používaly kvasinky promyté pouze vodou, tudíž na jejich povrchu zůstalo jisté množství vápenatých iontů, pozorovali jsme při extrémně vysokých koncentracích buněk flokulaci, avšak v okamžiku přidání glukosy se shluky buněk rozpadly. Z tohoto experimentu plynou dva závěry, jednak kmen 95 můžeme podle sacharidového inhibičního modelu popsaného v teoretické části zařadit mezi NewFlo kmene a dále potvrdit, že k flokulaci dochází teprve v okamžiku, kdy nejsou v médiu přítomny zkvasitelné cukry.

Acidifikační testy nám umožňují hodnotit metabolickou aktivitu, činnost ATPasy i viabilitu kvasnic. Jejich výsledky jsou v tomto ohledu mnohem spolehlivější než např. použití fluorescenčních barviv, jež jsme popsali v kapitole 2.3.1. Výsledky těchto fluorescenčních metod mohou být zatíženy artefakty způsobenými např. částečným porušením integrity plazmatické membrány, které ještě není pro buňku letální, avšak už umožňuje průchod barviva přes membránu buňky.



Obr.4-27 Vliv koncentrace buněk na výsledky acidifikačních testů kmene 95. První graf zachycuje pokles pH kvasinkové suspenze z počáteční hodnoty 6,3 v nepřítomnosti substrátu. Hodnotu ΔpH jsme stanovovali po 5 a 10 min měření. V druhém grafu je zaznamenána koncentrační závislost změny pH kvasinkové suspenze po 5, 10 a 15 minutách od přidání glukosy. Závislost acidifikační síly na počáteční koncentraci buněk je zobrazena v posledním grafu na obr.4-27. AP (5 + 10 min) značí acidifikační sílu suspenze vypočtenou ze součtu změny pH po 5 minutách bez substrátu a změny pH za 10 minut od přidání glukosy, obdobný je význam veličiny AP (10 + 10 min).

5. Závěr

Původní úkoly diplomové práce – sestavení jednoduchého sedimentačního a flokulačního testu – jsme splnili a v některých případech i překonali, během zkoumání jsme totiž zjistili ještě celou řadu nových poznatků.

Ověřili jsme, že námi navržená promývací procedura spolu s uchováváním buněk v citrát-fosfátovém pufru pH 4,5 nijak nepoškozuje kvasinkové buňky, ty jsou poté schopny normálně sedimentovat i flokulovat. Obsahy průřezů kvasinek se takto zvětší pouze o 4 – 5 μm^2 v důsledku změny osmotických poměrů.

Z koncentrační závislosti sedimentace jsme určili ideální rozmezí koncentrací buněk takové, aby Zn (zákal měřený v úhlu 90°) nepřevyšoval 40 EBC.

Studiem sedimentace deseti pivovarských kmenů kvasnic jsme prokázali přímou souvislost mezi velikostí buněk a rychlostí poklesu zákalu během jejich sedimentace. Taktéž jsme vytvořili křivku (obr. 4-16), kterou lze využít jako kalibrační křivku pro určení velikosti buněk, aniž bychom museli buňky proměřovat pod mikroskopem. Z tvaru derivace sedimentační křivky jsme schopni rozhodnout, zda suspenze obsahuje pučící buňky či nikoliv. Navíc lze zkonstruovat podobnou závislost jako na obr. 4-16 pro jediný kmen v různém stádiu vývoje kultury a dále ji pak používat pro posouzení, kolik procent pučících buněk daná suspenze momentálně obsahuje.

Metabolickou aktivitu, činnost ATPasy a viabilitu kvasnic všech deseti zmiňovaných kmenů jsme zhodnotili pomocí acidifikačních testů.

Množství pučících buněk v suspenzích deseti pivovarských kmenů a známý čas odebrání kvasinek z mladiny nás přiměly vyslovit hypotézu, že z těchto údajů lze usoudit, zda se jedná o hluboko či středně prokvašující kmen. Tato vlastnost se doposud určovala podle toho, jak dokázaly kvasinky během několikadenní kvasné zkoušky zredukovat zdánlivý extrakt mladiny (Bendová a Kahler, 1981). Uvážíme-li, že na pučení musí buňka vynaložit jistě nemalou energii a tudíž zpracovávat živiny z okolního prostředí, tak velké množství pučících buněk poukazuje na relativní dostatek živin, které jsou dané buňky ještě schopny využít, a tak dále snižovat extrakt. Proto suspenze hluboko prokvašujících kmenů obsahovaly ve stejnou dobu výrazně vyšší procento buněk ve stádiu pučení. Na základě této myšlenky bychom mohli zaplnit prázdné místo v tabulce 3-1 a prohlásit kmen 8 za hluboce prokvašující. Druhá provozní charakteristika uvedená v této tabulce – sedimentace – není bohužel přímo porovnatelná s našimi údaji, protože tou se hodnotí množství usazených kvasnic na konci kvasné zkoušky a tudíž se vztahuje nejen k velikosti buněk, ale nepochybně je ovlivněna i flokulací daného kmene.

Podářilo se nám vyvinout zcela ojedinělý flokulační test. V žádném z výše zmíněných literárních pramenů ani dalších prostudovaných článků (Calleja a Johnson (1977), Jansen a Mendlik (1951), Taylor a Orton (1978)), které se taktéž zabývají flokulací kvasnic, jsme nenalezli podobný test. V čem je náš test tak výjimečný? Předně umožňuje sledovat průběh flokulace od samého počátku, tedy od okamžiku, kdy jsou splněny všechny podmínky flokulace – přítomnost vápenatých iontů v médiu i dostatek sražek mezi buňkami, až po sedimentaci zbylých volných buněk. Navíc zvolený druh míchání dovoluje jasně rozdělit flokulační test na část, v které se postupně formují shluky kvasinek, dále na krátký časový úsek, během něhož se shluky kvasnic usadí, a závěrečnou část, kdy sedimentují jednotlivé buňky. Přínosné je tedy nejen kontinuální měření celého procesu flokulace, ale i široký rozsah koncentrací, v kterém jej můžeme principiálně provádět. Většina světových publikací se totiž omezuje na měření absorbance několikanásobně zředěných vzorků zflokulovaných kvasnic.

Kmen 95 můžeme podle sacharidového inhibičního modelu flokulace popsaného v teoretické části zařadit mezi NewFlo kmene.

Nalezli jsme optimální podmínky pro provádění flokulačního testu:

- koncentrace buněk $\sim 1 \cdot 10^8$ buněk/ml
- délka míchání kvasinkové suspenze magnetickým míchadlem: 5 min
- teplota: 20°C
- koncentrace vápenatých iontů: 10 – 100 mM

Doufáme, že výsledky této práce budou dále rozvíjeny a přinesou užitek široké veřejnosti i nové uplatnění pro zákaloměry, které byly původně vyvinuty pro měření koloidních zákalů v pivu. Jak je vidět jsou velmi dobře použitelné i v oblasti Mieova rozptylu (Prosser a kol. (1989), Wilson a Foster (2005)), kam kvasinky svou velikostí patří.

6. Seznam literatury

- Akiyama-Jibiki, M., Ishibiki, T., Yamasbita, H., and Eto, M. (1997): A Rapid and Simple Assay to Measure Flocculation in Brewer's Yeast. *MBAA Technical Quarterly* **34**, 278-281
- Azeredo, J., Ramos, I., Rodrigues, L., Oliveira, R., and Teixeira, J. (1997): Yeast flocculation: a new method for characterising cell surface interactions. *The Journal of the Institute of Brewing* **103**, 359-361
- Bendová, O. a Kahler, M. (1981): Pivovarské kvasinky. SNTL, Praha
- Bourdaudhui, G., Dillemans, M., Van Nederveelde, L., Van Zandycke, S., Smart, K. A., and Debourg, A. (2004): Potential use of natural antioxidants extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Cerevisia* **29**, 30-35
- Box, W., Goodger, A., and Quain, D. (2001): A real time flocculation test for direct analysis of yeast ex brewery
- Brož, J., Roskovec, V., Valouch, M. (1980): Fyzikální a matematické tabulky. SNTL, Praha
- Cahill, G., Walsh, P. K., and Donnelly, D. (1999): Improved Control of Brewery Yeast Pitching Using Image Analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **57**, 72-78
- Calleja, G. B. and Johnson, B. F. (1977): A comparison of quantitative methods for measuring yeast flocculation. *Canadian Journal of Microbiology* **23**, 68-74
- D Hautcourt, O. and Smart, K. A. (1999): Measurement of Brewing Yeast Flocculation. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **57**, 123-128
- Dienstbier, M., Gabriel, P., Cisařová, H., Sladký, P. (2005): Modulární aparatura pro kombinovaně turbidimetrické/pH titrace. *Nepublikovaný dokument*.
- Fernández, S., González, G., and Sierra, A. (1991): The Acidification Power Test and the Behavior of Yeast in Brewery Fermentations. *MBAA Technical Quarterly* **28**, 89-95
- Gabriel, P., Dienstbier, M., Sladký, P. (1994): Využití dvouúhlového zákaloměru k rozlišení typu některých zákalotvorných částic. *Kvasný průmysl* **40**, 203-207
- Hodgson, J., Pinder, A., Catley, B. J., Deans, K. (1999): Effect of Cone Cropping and Serial Re-Pitch on the Distribution of Cell Ages in Brewery Yeast. *MBAA Technical Quarterly* **36**, 175-177
- Hutter, K.-J. (2001): Fermentation – Process transparency and control using flow cytometry. *Brauwelt international technical feature* **2**, 124-127
- Janderová, B., Bendová, O. (1999): Úvod do biologie kvasinek, Karolinum, Praha
- Jansen, H. E. and Mendlik, F. (1951): A study on yeast flocculation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brighton* **9**, 59-83
- Jin, Y.-L. and Speers, R. A. (2000): Effect of Environmental Conditions on the Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **58**, 108-116
- Kaneda, H., Kano, Y., Sekine, T., Ishii, S., Takahashi, K., and Koshino, S. (1992): Effect of Pitching Yeast and Wort Preparation on Flavor Stability of Beer. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **73**, 456-460
- Kempers, J., van der Aar, P. C., and Krotjé, J. (1991): Flocculation of brewers' yeast during fermentation. *Proceedings of European Brewery Convention Congress, Lisboa 1991*, 249-256
- Kihn, J. C., Masy, C. L., and Mestdagh, M. M. (1988a): Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 773-778

- Kihn, J. C., Masy, C. L., Mestdagh, M. M., and Rouxhet, P. G. (1988b): Yeast flocculation: factors affecting the measurement of flocculence. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 779-781
- Kosař, K. a Procházka, S., (Ed.) a kol. autorů (2000): Technologie výroby sladu a piva. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
- Kuriyama, H., Umeda, I., Kobayashi, H. (1991): Role of cations in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and discrimination of the corresponding proteins. *Canadian Journal of Microbiology* **37**, 397-403
- Lipke, P. N. and Ovalle, R. (1998): Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology* **180**, 3735-3740
- Miki, B. L. A., Poon, N. H., James, A. P., and Seligy, V. L. (1982): Possible Mechanism for Flocculation Interactions Governed by Gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **150**, 878-889
- Mill, P. J. (1964a): The Effect of Nitrogenous Substances on the Time of Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **35**, 53-60
- Mill, P. J. (1964b): The Nature of the Interactions between Flocculent Cells in the Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **35**, 61-68
- Monje-Casas, F., Michán, C., and Pueyo, C. (2004): Absolute transcript levels of thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation with growth. *Biochem. J.* **383**, 139-147
- Nakamura, T., Chiba, K., Asahara, Y., and Tada, S. (1997): Prediction of barley which causes premature yeast flocculation. *Proceedings of the European Brewing Convention Congress*, 53-60
- Opekarová, M. and Sigler, K. (1982): Acidification Power: Indicator of Metabolic Activity and Autolytic Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **27**, 395-403
- Patel, G. B. and Ingledew, W. M. (1975): A flocculation test for moderately flocculent brewing yeast. *The Journal of the Institute of Brewing* **81**, 123-126
- Patino, H., Edelen, C., and Miller, J. (1993): Practical New Measures of Yeast Vitality Using pH and Conductance Probes. *MBAA Technical Quarterly* **30**, 98-103
- Powell, C. D., Quain D. E., and Smart, K. A. (2004): The Impact of Sedimentation on Cone Yeast Heterogeneity. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **62**, 8-17
- Prosser, V., (Ed.) a kol. autorů (1989): Experimentální metody biofyziky. Academia, Praha
- Rodrigues, P. G., Barros, A. A., Rodrigues, J. A., Ferreira, A. A., Gonçalves, C., Hammond, J. R. M. (2004): Vialtitration: A New Method for Assessment of Yeast Vitality. *MBAA Technical Quarterly* **41**, 277-281
- Sato, M., Watari, J., and Shinotsuka, K. (2001): Genetic Instability in Flocculation of Bottom-Fermenting Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **59**, 130-134
- Sigler, K. and Höfer, M. (1991): Mechanisms of acid extrusion in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1071**, 375-391
- Sigler, K., Knotková A., and Kotyk A. (1981): Factors governing substrate-induced generation and extrusion of protons in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **643**, 572-582
- Sinclair, D., Mills, K., and Guarente, L. (1998): Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of Microbiology* **52**, 533-560

- Sladký, P., Cisařová, H. (1999): Nový způsob objektivního provádění testů piva siranem amonným v běžných chemických zkumavkách. *Kvasný průmysl* **45**, 156-159
- Sladký, P., Cisařová, H., Dienstbier, M., Gabriel, P. (2001): Vývoj koloidních zákalů světlého ležáku během stárnutí. *Kvasný průmysl* **47**, 322-327
- Sladký, P., Cisařová, H., Hollerová, I., Kohoutová, P. (1998): Využití měření zákalu při jednorázové kultivaci mikroorganismů k rychlé mikrobiologické kontrole v pivovarství. *Kvasný průmysl* **44**, 208-213
- Sladký, P., Dienstbier, M. (2003): Turbidimetrická titrační analýza klasické křemelinové filtrace. *Kvasný průmysl* **49**, 188-191
- Sladký, P., Dienstbier, M. (2001): Zlepšené postupy měření zákalů pro komplexní sledování koloidní stability piva pomocí dvouúhlového turbidimetrického a titračního systému DATTS. *Kvasný průmysl* **47**, 122-126 a 195-200
- Soares, E. V. and Mota, M. (1997): Quantification of yeast flocculation. *The Journal of the Institute of Brewing* **103**, 93-98
- Speers, R. A. and Ritcey, L. L. (1995): Towards an Ideal Flocculation Assay. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **53**, 174-177
- Stratford, M. and Keenan, M. H. J. (1987): Yeast Flocculation: Kinetics and Collision Theory. *Yeast* **3**, 201-206
- Stratford, M. and Keenan, M. H. J. (1988): Yeast Flocculation: Quantification. *Yeast* **4**, 107-115
- Strauss, C. J., Kock, J. L. F., Viljoen, B. C., Botes, P. J., Hulse, G., and Lodolo, E. (2004): Lipid Turnover During Inverse Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* UOFS Y-2330. *The Journal of the Institute of Brewing* **110**, 207-212
- Taylor, N. W. and Orton, W. L. (1975): Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of the Institute of Brewing* **81**, 53-57
- Taylor, N. W. and Orton, W. L. (1978): Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of the Institute of Brewing* **84**, 113-114
- van der Aar, P. C. (1996): Consequences of Yeast Population Dynamics with Regard to Flocculence. *Ferment* **9**, 39-42
- van der Aar, P. C., Straver, M. H., and Teunissen, A. W. R. H. (1993): Flocculation of Brewer's Lager Yeast. *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Oslo 1993*, 259-266
- Van Zandycke, S. M., Simal, O., Gualdoni, S., and Smart, K. A. (2003): Determination of Yeast Viability Using Fluorophores. *Journal of the American Society of Brewing Chemist* **61**, 15-22
- Wilson, J. D. and Foster, T. H. (2005): Mie theory interpretations of light scattering from intact cells. *Optics letters* **30**, 2442-2444