

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**



Martin Srkala

### **Studium vitality kvasnic kombinovanými elektrochemickými a fotometrickými metodami**

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miroslav Dienstbier

Studijní program: Fyzika, biofyzika a chemická fyzika

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval vedoucímu diplomové práce RNDr. Miroslavu Dienstbierovi za otcovské vedení a Mgr. Petru Gabrielovi za četné náměty k práci a ochotu kdykoli poradit.

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

V Praze dne 4. 8. 2008

Martin Srkala

# Obsah

Úvod	6
<b>1 Teorie</b>	<b>8</b>
1.1 Kvasinky	8
1.1.1 Osmóza	10
1.2 Metabolismus kvasinek	11
1.2.1 Transport látek	11
1.2.2 Metabolismus sacharidů	13
1.3 Vitalita a viabilita	16
1.3.1 Měření viability	16
1.3.2 Měření vitality	17
1.3.3 Test acidifikační schopnosti	18
1.3.4 Scénář acidifikace	20
1.3.5 Acidifikace bez substrátu	21
1.3.6 Alternativy AP-testu	22
1.4 Bezkontaktní měření $pH$	23
1.4.1 $pH$ indikátory	24
1.4.2 Absorbance	24
1.5 Rozptyl světla	26
<b>2 Materiál a metody</b>	<b>29</b>
2.1 Standardní AP-test	29
2.2 Bezkontaktní měření AP-testu	32
<b>3 Optimalizace AP-testu</b>	<b>33</b>
3.1 Uchovávání vzorků	33
3.2 Příprava vzorků	33
<b>4 Využití AP-testu</b>	<b>40</b>
4.0.1 Vliv počtu nasazení kvasnic v CKT na AP-test	40
4.0.2 Vliv osmotického stresu na vitalitu kvasnic	41
4.0.3 Inhibice metabolických procesů	48

<b>5</b>	<b>Bezkontaktní měření <math>pH</math></b>	<b>52</b>
5.1	Volba barviva a jeho citlivost na $pH$ . . . . .	54
5.1.1	Bromocresol purple . . . . .	54
5.1.2	Bromocresol green . . . . .	55
5.1.3	Koncentrační citlivost barviva . . . . .	57
5.1.4	Interakce BCG s kvasnicemi . . . . .	59
5.1.5	Výpočet $pH$ ze spektra BCG . . . . .	60
5.2	Kombinovaná spektra . . . . .	62
5.2.1	Separon . . . . .	63
5.2.2	Kvasnice . . . . .	64
	<b>Závěr</b>	<b>69</b>
	<b>Literatura</b>	<b>71</b>

Název práce: Studium vitality kvasnic kombinovanými elektrochemickými a fotometrickými metodami

Autor: Martin Srkala

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miroslav Dienstbier

e-mail vedoucího: miroslav.dienstbier@mff.cuni.cz

Abstrakt: Tato práce shrnuje metody měření vitality a viability. Dále se věnuje optimalizaci testu acidifikační schopnosti (AP-test). Navržený postup zahrnuje skladování a přípravu vzorků při dosažení maximální hodnoty AP a reprodukovatelnosti měření. Optimalizace byla použita k rozlišení: poklesu vitality s počtem nasazení, vlivu osmotického stresu a vlivu inhibitorů na sérii průmyslově nasazených vzorků kvasnic.

V další části je využito barvivo BCG k bezkontaktnímu fotometrickému měření  $pH$ . Je zde navržen postup separace spektrální složky BCG z kombinovaného spektra obsahujícího rozptylující částice - separon nebo kvasnice. Ze spektra BCG je pak vypočteno  $pH$ .

Klíčová slova: Acidifikační schopnost, vitalita, optimalizace AP-testu, bromocresol green, bezkontaktní měření  $pH$

Title: Study of yeast vitality by combined electrochemical and photometric methods

Author: Martin Srkala

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: RNDr. Miroslav Dienstbier

Supervisor's e-mail address: miroslav.dienstbier@mff.cuni.cz

Abstract: This thesis summarises methods of viability and vitality measuring. Further optimized acidification power test (AP-test) is described. Suggested practice includes storage and pre-test steps that leads to maximal AP value of the yeast sample and reproducibility of this test. Optimized AP-test is used for determination of osmotic pressure influence, inhibition of part of metabolism influence and repitching of vitality of brewer yeast samples.

In next chapter bromocresol green (BCG) dye is used for a contact-free fotometric determination of  $pH$ . There is described procedure of spectral part separation of BCG from composed spectra which contents scatter particles - separon or yeast.  $pH$  is calculated from BCG spectra.

Keywords: Acidification power, vitality, optimized AP-test, bromocresol green, contact-free  $pH$  measurement

# Úvod

Cílem této diplomové práce je studium vitality kvasničné suspenze kombinovanými elektrochemickými a fotometrickými metodami u vybraných průmyslově významných kmenů. Za tímto účelem byly shrnuty různé metody studia viability a vitality, jednou z nichž je metoda AP-testu.

Jedná se o jednoduchou a nenákladnou metodu, založenou na měření změn extracelulárního  $pH$ , která přes svou relativní nenáročnost může dobře sloužit k rozlišení metabolické kompetence různých vzorků kvasnic a předpovědi průběhu fermentace. Byla navržena Miroslavou Opekarovou a Karlem Siglerem již na začátku osmdesátých let [10] a [14]. AP-test se během následujících let stal hojně využívaným v potravinářském průmyslu, zejména pivovarnictví. Zde byl doposud nejčastěji používán v provedení podle Kary [7]. Laboratorní praxe však v řadě případů poukazovala na ne příliš dobrou reprodukovatelnost a ne zcela jasné souvislosti výsledků testu s průběhy fermentace. Detailním studiem AP-testu za účelem nalezení příčin nepřesností ve výsledcích a způsobu měření AP hodnot tak, aby odpovídaly potenciální vitalitě, se zabývají např. práce [13] a [2]. Tato diplomová práce na ně navazuje a v první části se zabývá studiem vlivu některých fyzikálně-chemicko-biologických podmínek na výsledky AP-testu a navrhuje optimalizovaný postup při němž je dosažena maximální přesnost testu a jeho reprodukovatelnost.

Optimalizovaný AP-test je pak využit přímo ke studiu změn vitality kvasnic opakovaně nasazených v pivovarském provozu.

Kvasnice jsou při použití v průmyslovém provozu vystavovány řadě stresových faktorů, které mohou ovlivnit jejich vitalitu a tím i výsledek celé výroby. Studium vlivu stresových faktorů je pak potřeba zejména při zavádění nových výrobních technologií. Z těchto důvodů je v této práci pomocí optimalizovaného AP-testu studován vliv osmotického tlaku na vitalitu kvasnic.

Pro lepší pochopení toho, jak se na výsledcích AP-testu odráží změny v metabolismu buněk, byla provedena předběžná studie vlivu některých inhibitorů metabolických procesů.

Běžná metodika měření  $pH$  kvasničných suspenzí využívá klasickou elektrochemickou sondu, která je v přímém kontaktu se vzorkem. Přímý kontakt s sebou nese některé nevýhody (např. možnost kontaminace, objemové omezení, reakční rychlost elektrody, problémy při manipulaci), které by bylo možné zcela či částečně eliminovat při nekontaktním měření  $pH$  s použitím fotometrických metod.

Druhá část diplomové práce je proto věnována řešení problematiky bezkontaktního měření  $pH$  s ohledem na konkrétní podmínky AP-testu (obor  $pH$ , vodné prostředí, kvasničná suspenze, rozptyl světla na buňkách). Je popsán postup nalezení vhodného  $pH$  indikátoru a jeho spektrální charakterizace, modelově je studován vliv rozptylujícího prostředí na fotometrická měření a je navržen postup pro zpracování spektrálních dat k určení  $pH$ .

# Kapitola 1

## Teorie

### 1.1 Kvasinky

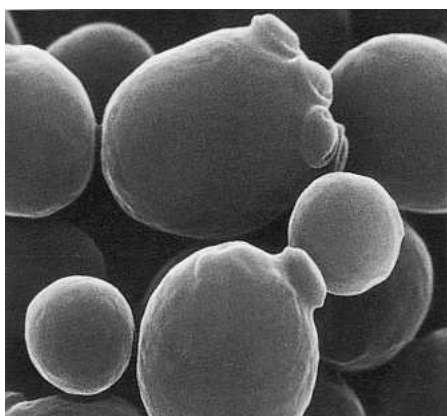
Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy patřící mezi vyšší houby (eumycota). Jakožto nejnižší eukaryotní organismus jsou kvasinky modelovým organismem. Netvoří vlastní taxonomickou skupinu, proto není možné je jednotně definovat. Rozmnožují se převážně vegetativně a to pučením nebo přehrádečným dělením. Jsou schopny se množit také pohlavně pomocí spór. Nevytváří pravé myceliární struktury, ale jsou schopny vytvářet pseudomycelium napodobující kolonie jednobuněčných organismů, ve kterém se rozmnožují přehrádečným dělením. Tvar a velikost kvasničné buňky se liší druh od druhu a jsou ovlivněny stářím a ploeditou, pro *Saccharomyces cerevisiae* je typický tvar rotačního elipsoidu o průměru 5 – 10  $\mu\text{m}$  (obrázek 1.1). Celkově existuje 457 druhů ze 78 rodů kvasinek.

Nejstarší dokumentací fermentace pomocí kvasinek jsou nálezy nádobek na víno pocházející z neolitické kuchyně v Hajji Firuz Tepe (8500 – 4000 let př. n. l.) na území dnešního Íránu. Výrobu alkoholických nápojů z naklíčeného obilí znali již ve starém Babylonu 6000 – 4000 let př. n. l. První pozorování kvasinek pomocí primitivního mikroskopu provedl Anton van Leeuwenhoek (1680), popsal je jako malé kuličky v pivu. Roku 1837 popsal Theodor Schwann v kvasící tekutině rozmnožující se kvasinku a popsal ji jako cukernou houbu (řecky *saccharos*=cukr a *mykes*=houbu). První izolace kvasinek proběhla v letech 1883 – 1890 z piva Emilem Christianem Hansenem a z vína Müllerem - Thurgauem.

Dnes se využívají kvasinky zejména v biotechnologiích, potravinářství k výrobě pekařského droždí, mléčných výrobků a v kvasném průmyslu k výrobě piva, lihu a vína. Kvasinky mohou působit i negativně, např. kontaminací prostředí a některé druhy patogenních kvasinek (*Candida albicans* nebo *Cryptococcus neoformans*) způsobují onemocnění.

Struktura kvasinkové buňky jakožto eukaryotního organismu je typická. V dalších odstavcích tedy budou zmíněny pouze části přímo účastníci se metabolismu buňky. Nejprve se však pozastavme nad vlastnostmi pivovarských kmenů kvasnic, které jsou využívány při všech měřeních v této práci.





Obrázek 1.1: Snímek kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pořízený elektronovým mikroskopem. Převzato z: <http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/wheals-a.html>

### Pivovarské kvasinky

Zvláštní význam mají již po staletí pivovarské kvasinky. Jedná se o speciálně vyselektované kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, které mají specifické vlastnosti:

- kvasí při nízké teplotě: 5 – 10 °C
- mají vysokou toleranci k ethanolu, 12 % letální hranice
- v metabolismu sacharidů převládá kvašení z 85 – 90 %<sup>1</sup>
- autolyzují - jsou schopny řízeného sebezničení
- disponují konstitutivním přenašečem pro maltosu
- aglutinace a sedimentace: kvasnice se po zkvašení média usazují na dně kvasné nádoby; tato vlastnost je typická pro kvasnice spodního kvašení, které se používají pro výrobu piva plzeňského typu

Pro uvedené vlastnosti jsou tyto kmeny kvasnic zvláště výhodné pro výrobu piva. Mezi další vlastnosti, nejen pivovarských kvasnic, ale obecně buněk vybavených plazmatickou membránou patří schopnost odolávat osmotickému tlaku. Tato schopnost je důležitá při změnách vnějšího prostředí, takže např. při výrobě piva kvašením v cylindricko-kónických tancích. Vlivem osmotického tlaku na vitalitu buněk se zabývá i tato práce. O tom, co to osmotické jevy jsou, pojednávají další řádky.

---

<sup>1</sup>Tato převaha anaerobního metabolismu platí pro tzv. spodní pivovarské kvasnice, svrchní pivovarské kvasí z 50 – 60 %.

### 1.1.1 Osmóza

Osmóza je difuze rozpouštědla přes polopropustnou membránu (v případě buněk přes plazmatickou membránu) z prostředí o nízké koncentraci do prostředí o vysoké koncentraci rozpouštěné látky, čili proti koncentračnímu gradientu. Principem je, že rozpouštědlo (např. voda) membránou bez odporu projde, rozpouštěná látka nikoli. Jedná se o fyzikální proces při němž pohybem rozpouštědla není spotřebovávána energie.

Osmotické jevy jsou významnou hybnou silou mnoha biologických procesů, řada biologických membrán je semipermeabilních. Např. napětí udržující tvar buňky je z velké části způsobeno právě osmózou.

Z pohledu buňky umístěné do vodného roztoku můžeme definovat 3 typy prostředí:

- *hypotonické* – velmi zředěný roztok, s koncentrací vody vyšší než v buňkách
- *isotonické* – roztok se stejnou koncentrací vody jako v buňkách
- *hypertonické* – koncentrovaný roztok, koncentrace vody uvnitř buněk vyšší než vně

Na každé z těchto prostředí buňka reaguje jinak, v hypotonickém v důsledku osmózy začne přijímat vodu, začne se zvětšovat a je nucena vyrovnat zvýšené vnitřní tlak způsobené zvětšením objemu, není-li toho schopna, může dojít k porušení její membrány. V hypertonickém prostředí buňka naopak vodu ztrácí a zmenšuje svůj objem, to se může negativně projevit na příjmu živin. V isotonickém prostředí nedochází k přesunu vody přes membránu, tudíž ani ke změně objemu buňky.

V hypertonickém a hypotonickém prostředí je tedy buňka vystavena tzv. *osmotickému tlaku*, ten je definován jako síla působící na jednotku plochy, která zabrání průchodu vody přes membránu. Osmotický tlak je závislý pouze na molární koncentraci rozpouštěné látky.

Dojde-li k náhlé změně koncentrace roztoku s buňkami, vystavíme je tímto tzv. *osmotickému stresu*, či *osmotickému šoku*. Každý organismus má vlastní mechanismus, jak se vyrovnat s touto situací, která se projevuje fyziologickými, biochemickými a dalšími změnami [4].

V souvislosti s osmózou jsou definovány veličiny osmolarita a osmolalita.

- Osmolarita - je definována jako množství molů rozpouštěné látky na litr roztoku.
- Osmolalita - je definována jako množství molů rozpouštěné látky na kilogram rozpouštědla.
- Osmol (Osm) - je jednotka, která je úměrná počtu molů osmoticky aktivní látky v roztoku

Osmotické jevy mají velký vliv na fyziologický stav buňky. Jejich konkrétní projev na vitalitě buněk bude ověřen v kapitole Využití AP-testu (viz stránka 40).

Dále již k metabolismu buňky, který hraje významnou roli při stanovení vitality pomocí AP-testu.

## 1.2 Metabolismus kvasinek

Důsledkem metabolismu kvasinek je biosyntéza látek (složky buňky a obal), jedná se o asimilační proces (*anabolismus*) a k jeho realizaci je potřeba dodat energii - dochází k endergonickým reakcím. Dalším důsledkem metabolismu je rozklad látek, což je disimilační proces (*katabolismus*) a dochází při něm k uvolňování energie - exergonické reakce.

### 1.2.1 Transport látek

Pro realizaci základního metabolismu je důležitý vstup a výstup látek do a z buňky. Ten ovlivňuje buněčná stěna, která je v různých fázích růstu různě propustná, pro mladé buňky je tenká a propustná, ve stacionární fázi propustnost klesá. Při průchodu buněčnou stěnou také závisí na velikosti, symetrii a náboji dané molekuly, stěna samotná má záporný náboj.

Důležitou roli při transportu pak hraje cytoplasmatická membrána. Z hlediska energetické výměny lze transport membránou rozdělit na pasivní a aktivní, z hlediska mechanismu pak na: prostou difuzi, přenašečový přenos, skupinovou translokaci a pinocytosu.

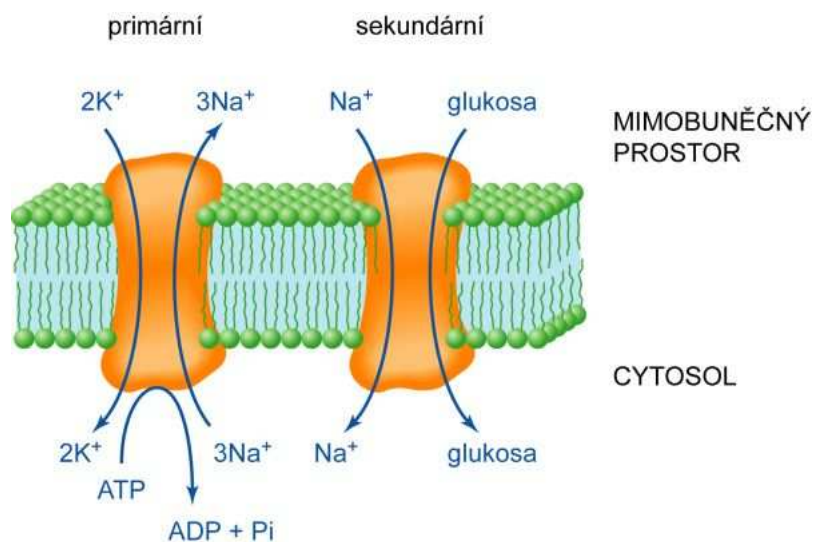
#### Prostá difuze

Prostá difuze je neselektivní, nezávislá na teplotě, metabolitech a mutacích. Dochází k ní prostřednictvím hydrofilních pórů a lipidních oblastí v membráně. Do kvasinkových buněk se prostou difuzí dostávají např.:  $\text{H}_2\text{O}$ , mastné kyseliny, ethanol, organické kyseliny (lipidy), glucerol, laktát a ribóza.

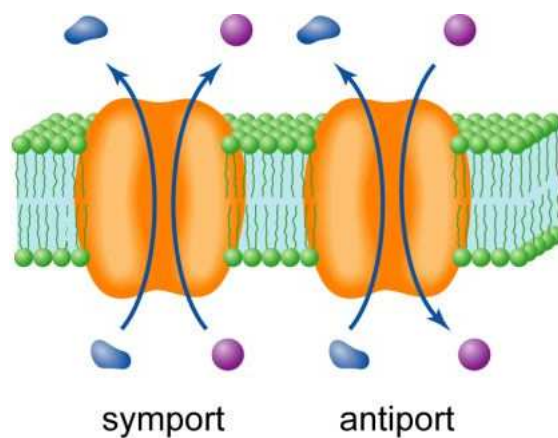
#### Přenašečový přenos

Mechanismem je přechodná reakce substrátu s některou membránovou složkou (nosičem či přenašečem), důsledkem je tzv. *usnadněná difuze* nebo *aktivní transport*.

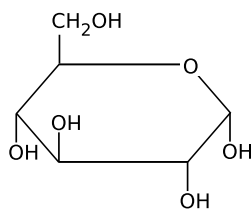
- usnadněná difuze: Při tomto přenosu látek není spotřebována energie, ale je nutná přítomnost nosiče. Při usnadněné difuzi záleží na koncentračním gradientu, může k ní docházet oběma směry. Tímto mechanismem se do buňky kvasinky dostává např. glukosa či galaktóza.
- aktivní transport: Existují dva typy aktivního transportu, primární a sekundární (viz obrázek 1.2). Primární vyžaduje energii, čili bývá spřažen s exergonickou reakcí (např. štěpení ATP, oxidace substrátu, pohlčení fotonu). Při sekundárním transportu částice je využíváno spřažení s disipací energie gradientu elektrochemického potenciálu jiné částice ( $\text{H}^+$  nebo  $\text{Na}^+$ ). Rozlišujeme symport - dochází k transportu obou částic stejným směrem a antiport - částice jsou transportovány v opačných směrech (viz obrázek 1.3).



Obrázek 1.2: Schéma primárního a sekundárního aktivního transportu eukaryotické buňky. Převzato z: [http://gvm.vm.cz/vyuka/bio\\_pojmy/figures/transport\\_aktivni.01.jpg](http://gvm.vm.cz/vyuka/bio_pojmy/figures/transport_aktivni.01.jpg)



Obrázek 1.3: Schéma sekundárního aktivního transportu částic přes membránu. Převzato z: [http://gvm.vm.cz/vyuka/bio\\_pojmy/figures/antiport.01.jpg](http://gvm.vm.cz/vyuka/bio_pojmy/figures/antiport.01.jpg)



Obrázek 1.4: Strukturální vzorec  $\alpha$ -D-glukosy v Haworthově projekci.

### Skupinová translokace

Tímto mechanismem dochází k chemické přeměně substrátů na produkty, které se vyskytují výlučně na druhé straně membrány. Koncentrace substrátu uvnitř buňky je vyšší než koncentrace jeho volné formy ve vnějším prostředí.

### Pinocytosa

Jedná se o endocytický proces, při němž je do buňky vnesen roztok s rozpuštěnými látkami. Přenos je tedy kvantovaný a velikost kvant je dána velikostí přenášených váčků.

## 1.2.2 Metabolismus sacharidů

Metabolismus sacharidů jakožto hlavního zdroje energie a uhlíku probíhá ve dvou fázích. V první fázi je cukr transportován do buňky, ve druhé nastupuje určitou metabolickou dráhu - volba je závislá na přístupu kyslíku, což je typické pro *Saccharomyces cerevisiae*, která je tzv. *fakultativním anaerobem*.

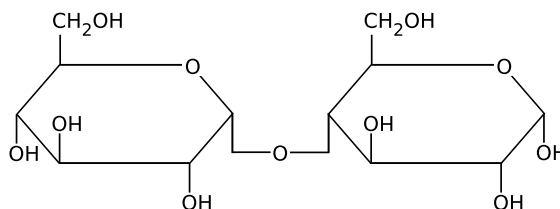
V nepřítomnosti kyslíku dochází ke zkvašení cukrů, v přítomnosti kyslíku se spouští respirační procesy. Platí, že dýchání má vyšší energetický výtěžek (cca 40 %), avšak je zhruba 100× pomalejší než kvašení (účinnost cca 2 %).

O tom, která z metabolických drah bude nastoupena především rozhodují genetické dispozice buněk (množství enzymu pyruvát-dehydrogenasy resp. pyruvát-dekarboxylasy) a životní podmínky (zejména přísun kyslíku).

### Transport sacharidů do buňky

Mechanismus přenosu látek přes cytoplazmatickou membránu byl objasněn výše. Každý ze sacharidů je transportován pomocí charakteristického přenašeče. My se zaměříme pouze na přenos glukosy a maltosy. Existují dva druhy přenašečů:

- konstitutivní: takový přenašeč je přítomen v cytoplasmatické membráně permanentně
- alternativní: přenašeč je syntetizován teprve je-li ho potřeba



Obrázek 1.5: Strukturní vzorec  $\alpha$ -D-maltosy v Haworthově projekci.

Glukosa (viz obrázek 1.4) do buňky proniká usnadněnou difuzí (platí pro *Saccharomyces cerevisiae*) a částečně také prostou difuzí (některé druhy kvasinek, např. *Rhodotorula* nebo *Candida* transportují glukosu aktivně). Glukózový přenašeč je konstitutivní a přenáší také fruktosu a xylosu.

Maltosa (viz obrázek 1.5) je disacharid složený ze dvou glukos. Významná je především v pivovarnictví, jelikož tvoří většinu zkvasitelného obsahu mladiny. Přenášena do buněk je pomocí aktivního symportu se stechiometrií 1 : 1 s  $H^+$ . Přenos umožňuje přenašeč *maltopermeasa*, která je u průmyslových kmenů konstitutivním přenašečem (obecně se jedná o alternativní přenašeč). Maltopermeasa přenáší kromě maltosy také sacharosu a maltotriosu. Hydrolýza maltosy na glukosu probíhá pomocí enzymu *maltasy*. Syntéza tohoto vnitrobuněčného enzymu je indukovaná, závisí na přítomnosti maltosy v médiu, a může být reprimována přítomností glukosy.

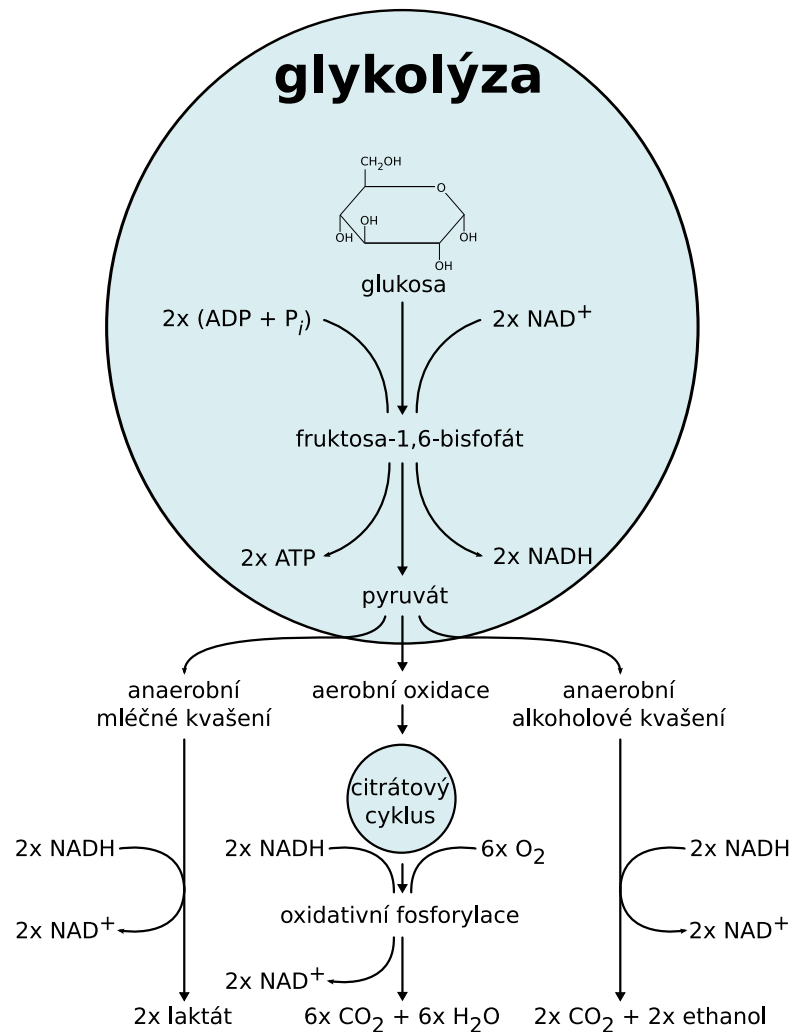
### Metabolická dráha glukosy

Metabolické dráhy pro různé druhy sacharidů se mohou odlišovat, nicméně základní dráha je pro všechny stejná. My se zaměříme na metabolické zpracování konkrétního monosacharidu - glukosy, schéma jejího zpracování je na obrázku 1.6.

Základní dráha cukrů je tzv. *glykolytická dráha*, nebo také *glykolýza*, nebo *Embden-Meyerhof-Parnasovo schéma*. Jedná se o sled deseti reakcí, do první vstupuje jedna molekula glukosy a konečným produktem jsou dvě molekuly pyruvátu.

Glukosa je po vstupu do buňky fosforylována hexokinasou (minoritně glukokinásou) na glukosu-6-fosfát. Tento důležitý meziprodukt (Robinsonův ester) pojí tři větve metabolismu:

- syntetická: vede k syntéze oligosacharidů (glukan, glykogen, manan, atd.)
- pentosa-fosfátový cyklus: výsledkem je produkce NADPH (využije se v anabolických dějích, zejména při syntéze mastných kyselin a steroidních látek) a pentos (např. ribosy)
- pokračování glykolytické: glukosa-6-fosfát je přeměněna na fruktosa-6-fosfát a ta (pomocí fosfofruktokinasy) na fruktosa-1,6-bisfosfát a ten v dalších reakcích postupně přeměněn na konečný produkt této větve: *kyselinu pyrohroznovou* - neboli *pyruvát*



Obrázek 1.6: Schematické zpracování glukosy v eukaryotické buňce včetně následovného anaerobního resp. aerobního zpracování pyruvátu.

Produktem glykolýzy je tedy pyruvát. Tato významná sloučenina je výchozí pro další tři metabolické směry, které spouští tři významné enzymy:

- fosfoenolpyruvát-karboxylasa: dráha spouštěná tímto enzymem se nazývá glukoneogeneze a jedná se v podstatě o obrácenou glykolýzu (konečným produktem je glukosa)
- pyruvát-dekarboxylasa: tento enzym spouští za anaerobních podmínek dráhu, která vede k tvorbě aldehydu, popřípadě ethanolu - jedná se o proces kvašení
- pyruvát-dehydrogenasa: spouští přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA a jeho vstup do tzv. *Krebsova cyklu* (*citrátového cyklu*) v mitochondriích - jedná se o proces dýchání

Tabulka 1.1: Shrnutí energetického zisku z jedné molekuly glukosy. Vychází z předpokladu, že z  $(\text{NADH} + \text{H}^+)$  lze získat  $3 \times \text{ATP}$  a z  $\text{FADH}_2$  lze získat  $2 \times \text{ATP}$ . Z jedné molekuly glukosy tedy lze získat 38 molekul ATP při zpracování glykolýzou a následnou oxidativní fosforylací; oproti celkovému zisku dvou molekul ATP při odbourání glukosy glykolýzou a následným alkoholovým kvašením.

metabolický proces	energetický zisk	
glykolýza	$2 \times \text{ATP} + 2 \times (\text{NADH} + \text{H}^+)$	$\Rightarrow 8 \times \text{ATP}$
oxidace pyruvátu	$2 \times (\text{NADH} + \text{H}^+)$	$\Rightarrow 6 \times \text{ATP}$
citrátový cyklus	$2 \times [3 \times (\text{NADH} + \text{H}^+) + 1 \times \text{FADH}_2 + 1 \times \text{ATP}]$	$\Rightarrow 24 \times \text{ATP}$

### Energetická bilance zpracování glukosy

Při odbourávání glukosy se uvolňuje velké množství energie. Energetický zisk je shrnut v tabulce 1.1. Dalším efektem, je uvolňování množství  $\text{H}^+$  iontů (taktéž tabulka 1.1), což způsobuje vnitřní okyselení buňky. Následkem je aktivace membránových  $\text{H}^+$ -ATPas, které acidifikují vnější prostředí. Podrobněji o funkci těchto pump v dalším textu.

Nyní následuje vymezení pojmů viability a vitality, které jsou používány v této práci, a jejich metod měření.

## 1.3 Vitalita a viabilita

### Vitalita

Pojem vitalita popisuje *kvasnou kapacitu* buněk a někdy se označuje jako *kvasná mohutnost*. Tato vlastnost závisí na fyziologickém stavu a biochemických podmínkách uvnitř i vně buněk. Je tedy ovlivněna stářím či stresovými faktory. Měření vitality je oproti měření viability komplikovanější a může být dlouhodobě náročné.

### Viabilita

Pojem viabilita je definován jako schopnost buněk se množit a vykazovat metabolickou aktivitu, což jedním slovem můžeme vyjádřit jako *životoschopnost*. Tato vlastnost se dobře určuje pomocí fotometrických metod.

#### 1.3.1 Měření viability

##### Metody založené na reprodukční schopnosti

Tyto metody jsou založené na schopnosti buněk tvořit kolonie. Plotnové výsevy na agaru jsou výhodné tím, že zároveň stanovují proliferaci buněk. Nevýhodné jsou naopak v tom, že mohou být zkresleny u silně flokulujících buněk a především jsou časově náročné (2 – 3 dny). Délka testu lze značně zredukovat použitím modifikované metody s mikroskopickými podložními sklíčky.



## Metody založené na barvení

Viabilita určená touto metodou neodpovídá přímo schopnosti buněk se množit, ale permeabilitě membrány a aktivitě intracelulárních enzymů. Tyto techniky jsou založeny na schopnosti membrány zabránit pronikání barviva do cytoplazmy a naopak neschopnosti mrtvých buněk tomuto procesu zabránit. Rozdíly v zabarvení buněk se projeví tím, že barvivo, které projde membránou do buňky je chemicky změněno metabolickými procesy v cytoplazmě a ztratí barvu (methylenová modř), nebo nebarevná látka je uvnitř buňky změněna na barevnou (fluorescein diacetát). Určení viability pak spočívá ve spočítání obarvených či neobarvených buněk. Barevné rozdíly lze pozorovat dvěma způsoby: optickým mikroskopem a fluorescenčním mikroskopem.

*Pozorování optickým mikroskopem:* Během let bylo vyzkoušeno mnoho barviv, např.: erythrosin, rhodamin B, eosin Y a methylenová modř, která je široce nej-používanější (již od 20. let 19. století) a doporučovaná varianta. Methylenová modř je využívána ke stanovení viability v pivovarnickém průmyslu. Takto určená viabilita dobře odpovídá stanovení jinými metodami (výsevový test), při viabilitě nad 90 %. Při nižších hodnotách viability se její určení může lišit až o 30 – 50 %. Další nevýhodou této metody je subjektivní chyba pozorovatele.

*Pozorování fluorescenčním mikroskopem:* Během let bylo objeveno mnoho opticky aktivních látek, ty jsou dnes využívány nejen k měření viability, ale také k určení vitality. Řada z nich vykazuje fluorescenci a to na různých vlnových délkách. Mechanizmy fluorescenčního barvení mohou být rozděleny do dvou kategorií: (a) látka prochází membránou a je metabolicky aktivní látkou chemicky přeměněna na produkt, který vykazuje fluorescenci; (b) fluorescenční barvivo prochází na základě membránového potenciálu do cytoplazmy. Fluorescenčním barvivem doporučovaným American Society of Brewing Chemists je 1-anilin-8-naftalen sulfonát hořečnatý (Mg-ANS). Tato látka se po průchodu buňkou naváže na jeden z cytoplazmatických proteinů a stane se fluorescenční. Výsledky získané touto metodou jsou přesné i pod hranicí viability 90 % oproti barvení methylenovou modří.

## Metody založené na stanovení obsahu důležitých komponent

Stanovením obsahu důležitých látek v těle buňky lze určit nejen viabilitu, ale také vitalitu kvasnic. Mezi nepostradatelné látky v těle živých buněk patří ATP, jakožto základní energetická jednotka a NADH, jakožto redukční činidlo. Obě tyto látky lze ve vzorku spektroskopicky detekovat.

### 1.3.2 Měření vitality

#### Metody založené na stanovení obsahu důležitých komponent

Předpokladem této metody při použití k měření vitality je, že indikované látky podstatně ovlivňují fermentaci kvasnic. Jejich zastoupení v buňce však závisí i na složení živného média. Mezi zmíněné důležité látky patří *glykogen* - zásobní polysacharid, *nenasycené mastné kyseliny a steroly* nebo ATP - základní energetická jednotka.

## Stanovení aktivity důležitých enzymů

Obsah enzymů lze dobře a přesně stanovit spektroskopickými metodami. Takto určené výsledky také velmi dobře odpovídají fyziologickému stavu buněk. Mezi zjišťované enzymy patří: *maltasa* - štěpí maltosu, *pyruvát-dehydrogenasa* - katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA, *pyruvát-dekarboxylasa* - katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-A, *alkohol-dehydrogenasa* - katalyzuje přeměnu acetaldehydu na ethanol.

## Metabolická rychlost buněk

Jedná se o klasické měření produkce CO<sub>2</sub>, či spotřeby O<sub>2</sub>. Tyto faktory jsou v přímé korelaci s fermentativní schopností buněk, nevypovídají však nic o růstu buněk.

## Energetický stav buněk

Tyto metody jsou založeny na vztahu mezi energizací buněčné membrány, procesy na membráně probíhajícími a celkovým fyziologickým stavem a metabolickou kompetencí buněk. Mezi typické zástupce této metody měření vitality patří test acidifikační schopnosti (AP-test nebo APT) a jeho pozdější modifikace: CAP a ICP.

### 1.3.3 Test acidifikační schopnosti

Posledně jmenovaná metoda měření vitality, konkrétně AP-test, je využita v této práci a proto si nyní vysvětleme, na jakém principu funguje.

Kvasinkové buňky je možné vystavit nejrůznějším stimulům: přidání substrátu nebo soli (např. KCl), okysličování média v nepřítomnosti substrátu. Základní odezvou na tyto stimuly je okyselení vnějšího prostředí. Test pro měření acidifikační síly (acidification power - AP) vyvinutý Miroslavou Opekarovou a Karlem Siglerem [10] a [14] je dobře použitelný pro předpověď fermentační potence násadních kvasnic v následující fermentaci na základě znalosti řady membránových pochodů probíhajících v kvasinkách metabolizujících endogenní i exogenní substráty. Tyto membránové přechody, projevující se poklesem *pH* vnějšího prostředí, zahrnují činnost H<sup>+</sup>-ATPasy, výstup řady slabých kyselin vznikajících během metabolických pochodů a transmembránové pohyby iontů. Principem AP-testu je měření změn vnějšího *pH* po přidání vhodného substrátu.

### Odezva na přítomnost/nepřítomnost substrátu v mediu

Substráty používané pro acidifikační testy kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jsou: glukosa, fruktosa, manosa, sacharosa, galaktosa, maltosa (k jejímu transportu do buněk dochází H<sup>+</sup>-symportem a může tedy způsobit alkalizaci vnějšího prostředí) a ethanol v případě provzdušněné suspenze. Asi nejčastěji používaný substrát je glukosa, která bude také výhradně používána v této práci. K saturaci dochází při 20 – 30 mM koncentraci glukosy a přibližně 10 mg mokré váhy kvasnic/ml. Saturační kinetika glukosou

indukovaného protonového toku má dvě části. Odpovídají nízkoafinitnímu konstitutivnímu systému přijímání glukosy (usnadněná difuze) a vysokoafinitnímu systému spojenému s expresí glukokinasy ( $H^+$ -symport).

Dochází-li k aerobnímu hladovění kvasnic v destilované vodě po dobu delší než 4 – 5 h, začne se zvyšovat  $pH$  suspenze v důsledku záměny  $H^+$  (ve vnějším prostředí) za  $K^+$  (uvnitř buněk) a v důsledku produkce  $NH_3$  v deaminačních reakcích. Rozsah acidifikace prudce klesá. Hladovění je doprovázeno poklesem hladiny vnitrobuněčného ATP, míry respirace a pufrovací schopnosti suspenze. Podobnou oslabenou acidifikační odezvu na přidání substrátu můžeme pozorovat při použití některých inhibitorů, zvýšené teplotě, kyselosti a dalších nepříznivých faktorech. Acidifikační odezva na přidání substrátu tudíž může být použita jako diagnostický nástroj pro stanovení metabolické kompetence buněk například u průmyslových kultur.

Acidifikace vnějšího prostředí po přidání glukosy je způsobena vylučováním  $CO_2$  a organických kyselin z buňky, činností  $H^+$ -ATPasy v plasmatické membráně provázející výměnu  $K^+$  a dalších iontů.

Po přidání glukosy v průběhu AP-testu dochází k přechodnému masivnímu odbourávání endogenních zdrojů za využití respirace a tedy tvorby  $CO_2$ . Během této fáze činí objem produkce 500 – 600  $\mu l/mg$  mokré váhy za minutu. Tato produkce  $CO_2$  z mobilizovaných vnitřních zdrojů rychle klesá v souvislosti s vyčerpáním kyslíku v suspenzi a prudkým nárůstem poměru  $NADH/NAD^+$  uvnitř buněk a je nahrazena produkcí  $CO_2$  z přidaného substrátu. Alkoholové kvašení 100 mmol glukosy vynesou 140 – 190 mmol  $CO_2$ . Přitom obvyklá koncentrace  $CO_2$  ve vodě v rovnováze se vzduchem činí  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Společně s  $CO_2$  vzniklým z glukosy koncentrace  $CO_2$  v suspenzi může vyšplhat na 1 – 2 mmol/l (pro 10 mg mokré váhy kvasnic/ml). Není přesně známo, prochází-li oxid uhličitý plasmatickou membránou ve formě  $CO_2$  či  $HCO_3^-$ , nicméně propustnost kvasinkové membrány činí  $10^{-8}$  –  $10^{-7}$  cm/s pro  $HCO_3^-$  a 0.3 – 0.6 cm/s pro  $CO_2$ . Navíc kvasinkové buňky obsahují anhydrasu, která může katalyzovat rovnováhu  $CO_2/HCO_3^-$ .

Dalším krokem po přidání glukosy do suspenze je alkoholové kvašení, které vede k produkci: acetátu, butylenglykolu, acetoinu, acetaldehydu, glycerolu a sukcinátu.

### $H^+$ -ATPasa

Nejvýznamněji k acidifikaci vnějšího prostředí přispívá činnost kvasinkové  $H^+$ -ATPasy. Ta je ze dvou třetin zanořena do plasmatické membrány buněk a patří k ATPase typu  $E_1E_2$  či P-typu, které přemisťují kationty přes plasmatické membrány zvířecích, rostlinných i bakteriálních buněk. Obsahuje rezidua pro navázání ATP a enzymovou fosforylaci, která je závislá na navázání transportovaného kationtu, jenž je typický pro daný druh ATPasy:  $H^+$ ,  $Na^+$  nebo  $Ca^{2+}$ , zatímco zpět do cytoplasmy je většinou přemisťován  $K^+$ . V ATPasách, které pumpují  $K^+$  do cytoplasmy, je  $K^+$  nezbytný pro hydrolýzu fosfoenzymu.

Enzym alternuje mezi dvěma hlavními stavy  $E_1$  a  $E_2$  a tvoří přechodný fosforylovaný intermediát, v kyselém prostředí stabilní a v zásaditém labilní  $\beta$ -aspartylfosfát. Jeho přeměna je podstatná pro rychlost hydrolýzy ATP (20 – 60 mmol  $P_i/mg$  proteinu za minutu). V nepřítomnosti nukleotidu je enzym převážně ve stavu  $E_1$ , hladina  $E_2$  pak narůstá během hydrolýzy ATP. Transport zahrnuje hydrolýzu jedné molekuly ATP

za současného vyloučení jednoho  $H^+$ . Protony jsou vázány na  $E_1$  formu na vnitřním membránovém povrchu a jsou uvolňovány z  $E_2$  formy na vnějším povrchu. Při absenci substrátu jsou vazebná místa obou povrchů většinou neprotonovaná a pumpa je v rovnováze. V okamžiku acidifikace cytoplasmy však pumpa výrazně zrychlí svou činnost. Analogicky je pumpa spouštěna při intracelulární acidifikaci indukované štěpením glukosy. Pumpa tedy způsobí snížení extracelulárního  $pH$ , avšak v důsledku nadbytku  $H^+$  vně buňky dochází k obsazování vazebných míst na povrchu pumpy a k jejímu zpomalení.

Zásoba energie pro  $H^+$ -symport živin je jednou z fyziologických rolí ATPasy, jinou je její účast na regulaci buněčného  $pH$ . Ke konci exponenciální fáze růstu *Saccharomyces 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 [12].

### 1.3.4 Scénář acidifikace

Pravděpodobný scénář acidifikace po přidání substrátu do media (konkrétně glukosy) bude vypadat takto:

1. Glukosa je rychle přijímána buňkami a je fosforylována na membráně příslušnými kinásami (hexokinasa). Při fosforylaci se uvolňují protony, což způsobí okamžitou vnitřní acidifikaci. Pokles intracelulárního  $pH$  je navíc podpořen akumulací bikarbonátu pocházejícího z  $CO_2$  produkovaného z vnitřních energetických zdrojů. Výsledná vnitřní acidifikace může způsobit otevření iontových kanálů v membráně, což způsobí depolarizaci membrány. Rozsah této depolarizace závisí na hodnotě extracelulárního  $pH$ .
2. Následkem nízkého  $pH_i$ , či následkem změn v hladině cAMP uvnitř buněk, může dojít k uzavření  $K^+$ -kanálů v souladu se snižujícím se membránovým potenciálem.
3. V důsledku glukosou indukovaných reakcí je  $H^+$ -ATPasa fosforylována a její aktivita roste. Přechodně dochází k poklesu hladiny ATP uvnitř buněk (a nadbytku cAMP - fosforylace během glykolýzy), což silně stimuluje energetický metabolismus (buněčné dýchání).
4. Následná produkce  $CO_2$  snižuje hyperpolarizační efekt enzymu a spolu s únikem iontů vede k nárůstu  $\Delta pH$ .
5. Nárůst  $\Delta pH$  je doprovázen přijímáním  $K^+$ ; glukosa tedy aktivuje nejen  $H^+$ -ATPasu, ale i kvasinkový systém příjmu  $K^+$ . Příliv  $K^+$  iontů do buňky způsobuje, i přesto, že je částečně kompenzován činností  $H^+$ -ATPasy, pomalou avšak stabilní depolarizaci membrány a alkalizaci vnitřku buňky (zejména v případech vysoké hladiny  $K^+$  vně buňky).

6. V důsledku vyššího vnitřního  $pH$  buňky přestanou být  $K^+$  kanály blokovány a dojde k výstupu  $K^+$  iontů ven z buněk. Tento  $K^+$  proud může být kompenzován odtokem organických aniontů, které se nahromadily v buňkách.
7. Vyčerpání glukosy postupně způsobuje růst  $pH$  vně buňky (protože méně energie je dostupné pro  $H^+$ -ATPasu). Množství extracelulárních organických kyselin zůstává při anaerobních podmínkách značné, při aerobních jsou buňkami přijímány zpátky.

Hlavním rysem acidifikačního scénáře je, že otevření iontových kanálů nezáleží pouze na membránovém potenciálu, ale i na  $pH_i$  (nebo množství cAMP). Změny v  $pH_i$  pak závisí na:

- koncentraci glukosy
- extracelulární koncentraci  $K^+$  a puřovací kapacitě
- hustotě suspenze.

### 1.3.5 Acidifikace bez substrátu

V tomto případě hraje velkou roli množství kyslíku v médiu. Okysličení kvasinkové suspenze bez substrátu značně ovlivní tok  $K^+$  iontů do buňky a množství buněčného ATP, jeho důsledkem je přechodná acidifikace média. Okysličení média lze provést probubláváním či přidáním  $H_2O_2$ .

Přidání buněk *Saccharomyces cerevisiae* do vody způsobí rychlé vyčerpání kyslíku, který je spotřebováván na využití energie z vnitřních zdrojů. Schopnost buněk takto spontánně acidifikovat v čerstvém médiu bez substrátu je ovlivněna růstovou fází a klesá pokud byly buňky vystaveny hladovění (zásoby vnitřních zdrojů jsou nízké). Spontánní acidifikace nastává pouze pokud jsou buňky schopny respirace. Reakce kvasinek stimuluje endogenní respiraci a produkci  $CO_2$  při spontánní acidifikaci je analogická jako reakce po přidání substrátu do média.

Stejně jako substrátem indukovaná acidifikace, tak i spontánní acidifikace je ovlivněna aerobním hladověním, které vede k tvorbě  $NH_3$  v deaminačních reakcích. Hladovění má také za následek snížení buněčné hladiny ATP a pokles počáteční rychlosti endogenní respirace. 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.

Provzdušnění média může aktivovat membránovou  $H^+$ -ATPasu. Přidání  $H_2O_2$  do suspenze způsobí patrné změny ve vývoji hladiny kyslíku následované intenzivní respirací. Může dojít k poklesu extracelulárního  $pH$  až na 3.5. Tento proces tedy pravděpodobně zahrnuje aktivaci  $H^+$ -ATPasy, jelikož hodnoty  $pH$  pod 4.5 není možné dosáhnout produkcí  $CO_2$ . Zároveň při tomto procesu nedochází k vylučování organických kyselin z buňky a dochází k příjmu  $K^+$  buňkou.

Rozdíl v porovnání s glukosou indukovanou acidifikací je v tom, že vypuzování  $H^+$  se zdá být kompenzováno výhradně příjmem  $K^+$ . Proto, klesne-li množství  $K^+$  vně buňky pod jistou mez, peroxidem indukovaná acidifikace způsobí hyperpolarizaci membrány, což zastaví další vylučování  $H^+$  a endogenní respiraci, ačkoliv by zbylé množství  $O_2$  v suspenzi stačilo k pokračování [12].

K acidifikaci bez substrátu neboli spontánní acidifikaci tedy dochází po vložení vzorku kvasnic do destilované vody, což se děje v průběhu AP-testu (viz níže). Jak již bylo zmíněno, výsledek této acidifikace je ovlivněn především obsahem kyslíku v médiu a objemem endogenních energetických zdrojů kvasinek. K vyčerpání kyslíku v médiu a ustálení  $pH$  dochází během prvních minut po vložení kvasnic do destilované vody. Na výsledek AP-testu nemá spontánní acidifikace vliv.

### 1.3.6 Alternativy AP-testu

Metoda AP-testu prošla během let řadou modifikací. Měřeným parametrem nemusí být extracelulární  $pH$ , ale přímo titrimetricky zjištěné množství protonů vypuzených z buněk (cumulative acidification power - CAP či titrated acidification power - TAP). Při použití této metody se postupuje stejně jako při AP-testu, nicméně zpracování hodnot se liší.

Další modifikací AP-testu je tzv. vitální titrace. Měří se při ní čas nutný k dosažení hodnoty vnějšího  $pH = 6.3$  po alkalizaci suspenze na  $pH = 10$ . Kvasinky s lepší metabolickou aktivitou snižují  $pH$  rychleji. Při testu není kvasinkám dodán žádný vnější zdroj energie a proto dochází ke změně  $pH$  pouze za využití vnitřních zdrojů energie. Výsledky tohoto testu se však neshodují s AP-testem na spodně kvasících kmenech [9].

Další modifikací AP-testu je tzv. ICP-test, kde je měřeno přímo vnitrobuněčné  $pH$  pomocí fluorescenčních barviv [6].

## 1.4 Bezkontaktní měření $pH$

Měření  $pH$  pomocí elektrochemických elektrod je v laboratorních i provozních podmínkách zvládnuto velice dobře a dosahuje vysoké přesnosti a reprodukovatelnosti. Přesto však s sebou nese problémy, které jsou spojené s většinou měření kontaktní povahy.

Měření  $pH$  pomocí klasické elektrody má některé nevýhody:

- elektrodu je nutné kalibrovat na měřený rozsah  $pH$  a teplotu
- měření je limitováno množstvím vzorku resp. velikostí elektrody, množství vzorku musí být dostatečné pro ponoření aktivní části elektrody
- elektroda samotná může se vzorkem interagovat (kontaminace) a ovlivnit tak měření
- údržba elektrody (zanesená elektroda může měřit zkresleně)
- omezená reakční doba elektrod
- hodnota  $pH$  je ovlivněna mícháním vzorku

Z těchto důvodů je účelné nalezení postupů, které by dovolily měření  $pH$  sledovaných vzorků bezkontaktním způsobem. K tomu se přirozeně nabízí využití některé z optických metod - tj. interakce světelného záření se vzorkem.

Jedním z cílů této práce bylo ověřit možnosti bezkontaktního fotometrického měření  $pH$  vodných roztoků zejména s ohledem na měření zakalených vzorků a simultánní sledování více vzorků. Těchto možností by pak mělo být využito k bezkontaktnímu měření  $pH$  při AP-testu, což by přineslo vyšší efektivitu měření. Za tímto účelem bylo nutné vybrat vhodný  $pH$  indikátor s ohledem na rozsah  $pH$  pro jaký ho lze použít (viz experimentální část diplomové práce, stránka 54).

Použití barviva jakožto  $pH$  indikátoru a měřením jeho spektrálních změn má následující výhody a nevýhody:

- + bezkontaktní měření:
  - + množství vzorku není omezeno rozměry elektrody
  - + nedochází k ovlivnění vzorku elektrodou
- + lze paralelně snímat více spekter
- + k měření  $pH$  dochází v celém objemu vzorku
- může dojít k reakci mezi vzorkem a  $pH$  indikátorem

### 1.4.1 $pH$ indikátory

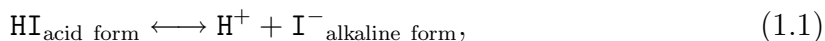
Indikátor  $pH$  je chemická látka, která se v malém množství přidává do roztoku (kyselého či zásaditého) a na základě jeho  $pH$  změny své fyzikální vlastnosti, např. absorpční spektrum, což je možné detekovat.

Dnes je známa a průmyslově využívána celá řada indikátorů  $pH$ , patří mezi ně např.: fenolftalein, thymolftalein, methylenová oranž, thymolinová modř, bromocresol blue (bromokresolová modř), *bromocresol green* (bromokresolová zeleň) a *bromocresol purple* (bromokresolová červeně). O jejich využití rozhoduje především rozsah  $pH$ , při kterém je lze použít.

$pH$  indikátory často samotné bývají slabými kyselinami či zásadami. Po přidání do roztoku mohou navázat volné  $H^+$  nebo  $OH^-$  ionty. Při vytvoření vazby dojde zároveň ke změně elektronové konfigurace a tedy i změně absorpčního spektra, což se projeví změnou barvy indikátoru.

Určení barvy indikátoru a tedy  $pH$  roztoku může být zatíženo značnou subjektivní chybou. Za tímto účelem se v laboratorní praxi určuje hodnota  $pH$  vzorku pomocí elektrochemické  $pH$  elektrody, lze ji však určit změřením a analýzou spektra daného roztoku s barevným indikátorem. Druhý postup má řadu výhod.

Užité  $pH$  citlivé barvivo, obecně  $HI$ , po rozpuštění v roztoku nabývá následující rovnováhy:



kde  $HI_{\text{acid form}}$  je tedy kyselá forma a  $I^-_{\text{alkaline form}}$  zásaditá forma barviva.

Je-li  $C$  celková koncentrace a  $[HI]$ ,  $[I^-]$  jsou koncentrace jednotlivých forem rozpuštěného barviva, pak

$$C = [HI] + [I^-]. \quad (1.2)$$

Absorbance roztoku, která je funkcí vlnové délky je pak následující:

$$A(\lambda) = \alpha_I(\lambda) \cdot [I^-] \cdot l + \alpha_{HI}(\lambda) \cdot [HI] \cdot l, \quad (1.3)$$

kde  $\alpha_I(\lambda)$  je molární absorpční koeficient alkalické složky a  $\alpha_{HI}(\lambda)$  kyselé složky a  $l$  je optická dráha. V naměřeném absorpčním spektru rozpuštěného barviva pak uvidíme píky odpovídající absorpci těchto dvou složek [15].

### 1.4.2 Absorbance

Fyzikální veličina absorbance je ve spektroskopii definována jako:

$$A(\lambda) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right), \quad (1.4)$$

kde  $I$  je intenzita záření o vlnové délce  $\lambda$  prošlého vzorkem a  $I_0$  intenzita původního paprsku. Jedná se tedy o logaritmický útlum světla při průchodu světla vzorkem. Tento útlum závisí na vlastnostech vzorku a do souvislosti s absorbancí je dává empirický *Lambertův-Beerův* zákon, který lze vyjádřit mnoha způsoby:



$$I = I_0 \cdot e^{\epsilon(\lambda)lc} = I_0 \cdot e^{\alpha(\lambda)l}, \quad (1.5)$$

kde  $l$  je dráha po jakou světlo prochází vzorkem,  $\epsilon(\lambda)$  je extinkční koeficient (jedná se o imaginární složku komplexního indexu lomu),  $c$  je koncentrace a  $\alpha(\lambda)$  je molární absorpční koeficient (někdy také *turbidita* nebo optická hustota). Poslední dva parametry charakterizují vlastnosti vzorku. Lambertův-Beerův zákon lze vyjádřit pomocí absorbance takto:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon_{10}cl} = I_0 \cdot 10^{-A}, \quad (1.6)$$

kde  $\epsilon_{10}$  je dekadický extinkční koeficient ( $\epsilon_{10} = \epsilon / \ln 10 \doteq \epsilon / 2.303$ ). Poměr

$$T = I/I_0 \quad (1.7)$$

se pak nazývá *transmittance* (propustnost).

Z uvedených vztahů vyplývá, že měřením absorbance vzorku (resp. intenzity prošlého světla) můžeme určit jeho vlastnosti (koncentraci nebo turbiditu), což je využíváno např. v analytické chemii.

Měřením úhlové závislosti intenzity (charakteristiky rozptylu) pak také můžeme určit tvar a velikost rozptylujících částic, viz dále. V reálných případech dochází k útlumu záření při průchodu vzorkem z důvodů rozptylu světla a navíc absorpce vzorku. Formálně pro výslednou absorbanci platí:

$$A = A_a + A_s, \quad (1.8)$$

kde  $A_a$  je absorbance absorbující složky a  $A_s$  je absorbance rozptylující složky vzorku.

Tato aditivita absorbancí však platí pouze za předpokladu nezávislosti efektů rozptylu světla a selektivní absorpce, což obecně není splněno. Platnost této podmínky je splněna pro zředěné roztoky.

## Selektivní absorpce

Většina látek absorbuje světlo selektivně, čili po průchodu záření látkou je původní spektrum ochuzeno o některé vlnové délky (resp. pásy). To je způsobeno elektronovými přechody v dané látce. Elektrony excitované procházejícím zářením, mohou energii zpět vyžářit nebo ji pozbyť tepelným pohybem. Důsledkem toho se například některé látky jeví jako barevné.

Naměřením charakteristického absorpčního spektra můžeme určit druh a vlastnosti látek, které se ve vzorku vyskytují. V této práci je spektra selektivní absorpce *pH* citlivé látky využíváno ke stanovení hodnoty *pH* vzorku.

## 1.5 Rozptyl světla

Intenzita (resp. absorpance) rozptýleného záření tedy ovlivňuje celkové absorpční spektrum vzorku. Jak k rozptylu světla dochází a jak jej lze charakterizovat se dozvíme v následujících řádcích.

Při šíření elektromagnetického záření hmotným prostředím, oscilující elektrické pole vyvolává v molekulách nucené oscilace nábojové hustoty, které jsou v prvním přiblížení synchronní s budícím polem. Kmity nábojové hustoty v molekule, které je možné aproximovat kmity elementárního dipólu, jsou zdrojem sekundárního elektromagnetického záření o stejné frekvenci. V dokonale homogenním prostředí, jakým je například ideální krystal, má záření emitované blízkými molekulami definovaný fázový rozdíl, a proto navzájem interferuje. Tato interference je, v případě buzení rovinnou vlnou destruktivní ve všech směrech kromě směru šíření budícího záření [11]. Složením rozptýlené a budící vlny vzniká rovinná vlna, jejíž fázová rychlost je

$$v = \frac{c}{n}, \quad (1.9)$$

kde  $c$  je rychlost světla ve vakuu a  $n$  je index lomu daného prostředí. V anizotropním prostředí je fázová rychlost světla závislá na směru jeho šíření a k popisu nestačí skalár  $n$ , ale je nutné použít tenzorové veličiny. Této interakci světla s prostředím se říká *elastický rozptyl* a je při ní zachován zákon zachování energie a hybnosti, nedochází ke změnám vnitřní energie molekul. Naopak v případě kdy dochází ke změnám vnitřní energie molekul se jedná o rozptyl *neelastický*, což je například *Ramanův rozptyl*.

Složitější popis elastického rozptylu nastává v případě, kdy prostředí, kterým záření prochází, obsahuje nehomogenity. Tyto nehomogenity mohou být tvořeny např. buňkami rozptýlenými v roztoku, makromolekulami v nízkomolekulárním rozpouštědle nebo oblastmi v kapalině o rozdílné hustotě vzniklé tepelným pohybem molekul. Nehomogenity tvoří rozptylová centra, která naruší destruktivní interferenci sekundárních vln, jejichž následné šíření ve vzorku se různí od zákona odrazu a lomu. Polarizační vlastnosti a úhlové rozložení intenzity rozptýleného záření jsou závislé na velikosti a tvaru rozptylových center. Díky teorii elastického rozptylu jsme schopni z naměřených charakteristik rozptýleného záření určit vlastnosti rozptylových center.

Při popisu elastického rozptylu na nehomogenitách lze použít aproximace, ty jsou závislé na poměru velikosti rozptylových center vůči vlnové délce elektromagnetického záření, tento poměr je definován jako bezrozměrná veličina  $x$ :

$$x = \frac{2\pi r}{\lambda}, \quad (1.10)$$

kde  $r$  je poloměr rozptylového centra a  $\lambda$  je vlnová délka dopadajícího záření.

Na základě velikosti veličiny  $x$  rozlišujeme tři typy rozptylu: *Rayleighův rozptyl*, *Rayleighův-Debyeův rozptyl* a *Mieův rozptyl*.

## Rayleighův rozptyl

Předpokladem pro popis Rayleighova rozptylu je, že velikost rozptylových center  $a$  je mnohem menší než vlnová délka procházejícího záření, konkrétně se uvádí:

$$a < \frac{\lambda}{20}. \quad (1.11)$$

Tomu odpovídá hodnota  $x < 0.3$ . V tomto případě lze považovat rozptylová centra za elementární dipóly. Důsledek této aproximace je nepřímá závislost intenzity rozptylu na čtvrté mocnině vlnové délky záření ( $I \sim 1/\lambda^4$ ).

Rayleighův rozptyl je nejčastěji pozorován při průchodu záření plyny a je zodpovědný mimo jiné za modrou barvu oblohy.

## Rayleighův-Debyeův rozptyl

Toto přiblížení vychází z představy, že rozptylové centrum libovolného tvaru je složeno z objemových elementů, jež lze popsat Rayleighovou teorií. Základním předpokladem je, že fáze dílčí vlny emitované libovolným objemovým elementem je závislá pouze na poloze daného elementu vůči bodu pozorování, nikoliv na vzdálenosti po které se šíří v objemu rozptylového centra. Tedy všechny objemové elementy daného rozptylového centra považujeme za excitované původní dopadající vlnou. Ke splnění tohoto požadavku je nutné, aby platily následující dvě podmínky:

$$a \approx \lambda, \quad (1.12)$$

čili velikost rozptylových center je srovnatelná s vlnovou délkou dopadajícího záření a zároveň:

$$x \cdot \frac{n - n_0}{n_0} < 1, \quad (1.13)$$

neboli index lomu rozptylového centra  $n$  musí být blízký indexu lomu média  $n_0$ .

## Mieův rozptyl

Popis Mieova rozptylu je nejobecnější, ale také nejsložitější, z toho důvodu je pro řešení často třeba použít numerické výpočty. Díky své obecnosti popisu rozptylu na sféricky symetrických centrech o libovolné velikosti se dobře shoduje s Rayleighovou teorií pro malá rozptylová centra a naopak s výsledky určenými zákony odrazu, lomu a difrakcí záření pro velká rozptylová centra. Závislost absorpance na vlnové délce při Mieově rozptylu má obecně následující tvar:

$$A_s \approx \lambda^{-n}, \quad (1.14)$$

kde  $n$  je empirický parametr nabývající hodnoty menší než čtyři. Tato závislost zne-  
snadňuje korekci absorpčních spekter na rozptyl světla.

## Vícenásobný rozptyl

Vliv částic na rozptyl a absorpci dopadajícího záření závisí nejen na jejich vlastnostech, ale i na vzájemné vzdálenosti a poloze. Jsou-li částice blízko sebe, může být záření rozptýleno na více částicích, dojde k tzv. mnohonásobnému rozptylu.

Vzájemná pozice částic určuje, zda půjde o rozptyl koherentní či nekoherentní. První případ nastává, jsou-li částice umístěny v přesně určených místech, např. atomy v krystalové mřížce, pak jsou fáze rozptýlených vln dobře definovány a elektrické intenzity se sčítají (Braggova difrakce). O nekoherentní rozptyl se jedná v případě, jsou-li částice rozmístěny náhodně, např. pevné částice v kapalinách.

Při popisu vícenásobného rozptylu máme následující možnosti:

- zanedbání vícenásobného rozptylu: tento postup je použitelný u velmi zředěných vzorků, kde intenzita jednou rozptýleného světla je řádově vyšší než intenzita mnohonásobně rozptýleného světla
- první přiblížení mnohonásobného rozptylu: vychází z popisu jednonásobného rozptylu se započítáním útlumu intenzity dopadající vlny způsobeného předchozím rozptylem
- difuzní přiblížení: vychází z popisu difuzního rozptylu, čili dopadající vlna se prakticky rovnoměrně ve všech směrech rozptyluje na mnoha částicích, úhlové rozdělení je téměř izotropní

Které z uvedených přiblížení použít je předurčeno koncentrací vzorku. Přibližně platí, že je-li objemová koncentrace menší než 0.1 %, pak lze použít první přiblížení vícenásobného rozptylu.

# Kapitola 2

## Materiál a metody

### 2.1 Standardní AP-test

#### Kvasnice, voda a chemikálie

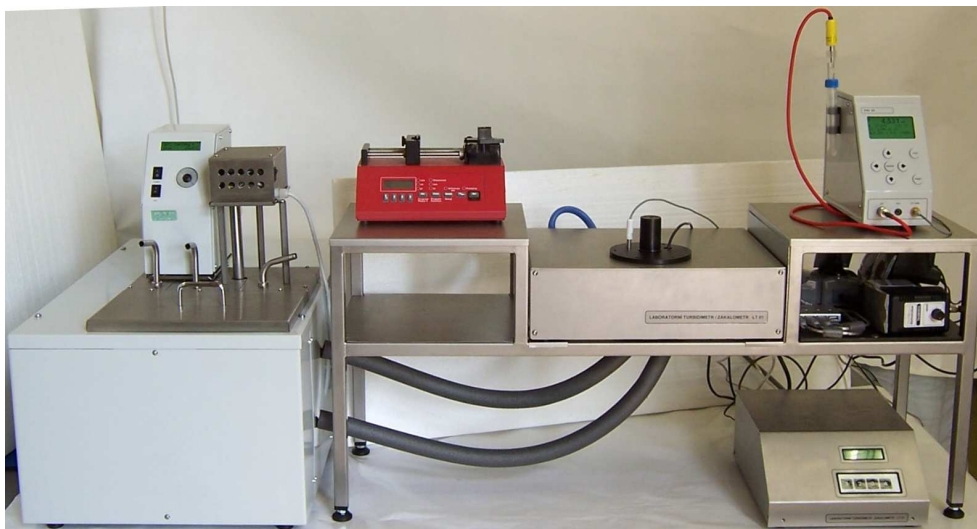
Pro měření byly používány pivovarské kvasinky (spodně kvasící) *Saccharomyces cerevisiae* kmen 95 (z pivovaru Velké Popovice), které byly odebírány v různých fázích výroby (kvasinky z propagační fáze, kvasinky po prvním, druhém a třetím nasazení v CKT).

K měření byla používána deionizovaná voda připravená přístrojem Aqual 35, její vodivost byla menší než  $0.2 \mu\text{S}$ .

Pro vystavení kvasnic osmotickému stresu byl používán sorbitol o různých koncentracích (0.4 M až 1.7 M). Sorbitol je alkoholický cukr, jehož sumární vzorec je  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$  a hmotnost jednoho molu činí 182.17 g. Průmyslově je tato látka využívána k výrobě umělých sladidel pro diabetiky, v lidském těle se totiž odbourává minimálně nebo vůbec. Tento polyol neprochází plazmatickou membránou kvasinkových buněk a je proto vhodný pro modelování osmotického tlaku.

Za účelem studia vlivu vybraných xenobiotik na vitalitu kvasnic, byly použity tyto látky:

- Iodoacetamide (iodoacetamid, IAA) - jedná se o inhibitor blokuující fermentaci kvasnic. Jeho sumární vzorec je  $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$  a váha jednoho molu činí 184.96 g. Ve vyšších koncentracích je karcinogenní. (dodáván firmou Sigma-Aldrich, Inc.)
- Glucosamine (glukosamin) - je inhibitorem fosforylace glukosy na samém začátku glykolýzy. Jeho sumární vzorec je  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$  a váha jednoho molu činí 179.17 g. Lidskému tělu je tato látka vlastní jako součást polysacharidů obsažených v kloubní chrupavce. (dodáván firmou Sigma-Aldrich, Inc.)
- Malonate (malonát) - inhibuje oxidaci sukcinátu na fumarát v citrátovém cyklu, čili potlačuje respiraci kvasinek. (dodáván firmou Sigma-Aldrich, Inc.)



Obrázek 2.1: Aparatura YATA - Yeast Acidification and Turbidity Analyzer vyvinutá na Katedře chemické fyziky a optiky při MFF UK.

- YC-TETRA - je chmelový extrakt podporující tvorbu a stabilitu pивní pěny. Jedná se o roztok sodných solí z chmele odvozených tetrahydroiso-alfa kyselín. Tato látka je hojně využívána některými pivovary. (dodáván firmou Yakima Chief, Inc.)

### Centrifuga

Vzorky byly odstředovány v centrifuze Janetzki T30. Při 1000 ot/min na vzorek působilo  $145 \times g$ , při 3000 ot/min pak  $1300 \times g$ .

### Měřicí aparatura

Měření bylo prováděno na kombinované *pH*-turbidimetrické titrační aparatuře (YATA) (viz obrázek 2.1), jejíž hlavní částí je měřicí komora naplněná imerzní kapalinou. Teplota uvnitř komory je stabilizována externím termostatem. Měřicí komora obsahuje magnetické míchadlo s nastavitelnou rychlostí míchání a fotometr pro měření turbidity vzorku. Součástí aparatury je také *pH*-metr s externím výstupem (PHI-04 s *pH*-elektrodou Theta 90 HC133, Labio a.s., ČR) a dávkovací pumpa s nastavitelným dávkovacím režimem (NE1000, New Era Pump Systems, Inc., USA). Aparatura je řízena z PC pomocí speciálního software vyvinutého Petrem Gabrielem. Měřicí komora je přizpůsobena pro 15 ml vzorky měřitelné ve zkumavkách o průměru 2 cm. Turbidimetr jež je součástí aparatury je vybaven LED zdrojem světla o vlnové délce  $\lambda = 660 \text{ nm}$ , lze jím měřit útlum světla při průchodu světelného paprsku vzorkem.

## Příprava vzorků a postup měření při standardním AP-testu

Běžný postup přípravy vzorků a průběhu měření používaný Karou (viz [7]) je modifikací původního postupu navrženého Opekarovou a Siglerem. Na následujících řádcích je v bodech shrnut standardní Karou navržený postup AP-testu (podrobnosti v [7]):

- Odvážíme 9 g kvasnic.
- Kvasnice přidáme do 50 ml destilované vody o teplotě 4 °C a promyjeme.
- Poté vzorek odstředíme v centrifuze po cca 10 min při 3000 × *g*.
- Promývání a odstředění provedeme celkem třikrát.
- Po posledním odstředění samotné kvasnice přidáme do 50 ml destilované vody o teplotě 25 °C a protřepeme. Zároveň spouštíme čas.
- Následně celou suspenzi přidáme do 50 ml destilované vody o teplotě 25 °C.
- Vzorek (objem suspenze 100 ml) nyní stále mícháme (200 ot/min) ve 250 ml zkumavce.
- V desáté minutě přidáme 5 ml glukosy (20.2 % roztok).
- Odečteme hodnoty *pH* v desáté a dvacáté minutě.

Tento postup byl upravován a optimalizován, viz kapitola Optimalizace AP-testu.

## Výpočet hodnoty AP

Hodnota AP je určována za předpokladu, že hodnota *pH* ve zkumavce na začátku měření je 6.3, což je *pK* hodnota systému  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$  [13].

Veličina  $AP_{10}$  odpovídá výsledku spontánní acidifikace před přidáním glukosy. Vypočítá se z hodnoty *pH* v desáté minutě měření ( $pH_{10}$ ) takto:

$$AP_{10} = 6.3 - pH_{10}. \quad (2.1)$$

Veličina  $AP_{20}$  odpovídá výsledku glukosou indukované acidifikace. Vypočítá se z hodnoty *pH* ve dvacáté minutě měření ( $pH_{20}$ ) takto:

$$AP_{20} = 6.3 - pH_{20}. \quad (2.2)$$

Za výslednou hodnotu AP-testu je považována veličina  $AP_{20}$ . V této práci jsou používány jako ekvivalentní pojmy: výsledek AP-testu, hodnota AP a  $AP_{20}$ .

Výsledná hodnota  $AP_{20}$  pak odráží fyziologický stav buněk:

$AP_{20}$	stav buněk
2.5 – 2.0	dobrý fyziologický stav
2.0 – 1.5	částečně poškozené
< 1.5	značně poničené

## 2.2 Bezkontaktní měření AP-testu

Měření absorpčních spekter bylo prováděno na spektrometru **Specord 40** od firmy **Analytik Jena** a to v rozsahu vlnových délek 350 nm až 850 nm. Použité kyvety byly plastové, optická dráha 1 cm.

$pH$  indikátory **BCP** a **BCG** byly od firmy **Sigma-Aldrich, Inc.** Destilovaná voda byla vyráběna na laboratorním přístroji **Aqual 35**, její vodivost byla pod  $0.2 \mu\text{S}$ . Byl připraven pufr, citrát-fosfátový, o  $pH = 4.5$ . Hodnota  $pH$  roztoků byla upravována pomocí 0.1 M roztoku **NaOH** a **HCl**.

Kvasinky používané při spektroskopických měřeních byly spodně kvasící pivovarské kmen 95. Kontrolní měření metodou AP-testu byla prováděna na přístroji **YATA** - specifikace výše.

Pro současné bezkontaktní měření  $pH$  spektrometrem a kontaktní měření  $pH$  pomocí klasické elektrochemické sondy byla použita průtoková cela, která byla umístěna ve fotometru, a  $pH$  elektroda do zkumavky (25 ml, stejná, která byla používána pro měření na **YATA**). Tyto dva prvky pak byly spojeny do uzavřeného obvodu i s peristaltickou pumpou pomocí hadiček.

### Příprava vzorků a postup měření

Skladování a promývání kvasnic bylo prováděno shodně s přípravou vzorků pro optimalizovaný AP-test (viz strana 39). Rozdíl nastává v použité koncentraci měřeného vzorku.

Pro účely bezkontaktního měření  $pH$  při AP-testu bylo odvažováno definované množství kvasnic (mokrý váhy), které byly přidávány do definovaného množství destilované vody resp. pufru.



# Kapitola 3

## Optimalizace AP-testu

Průběh a výsledek AP-testu je ovlivněn mnoha vnějšími a vnitřními faktory. Pro zajištění reprodukovatelnosti měření je nutné tyto vlivy minimalizovat nebo úplně odstranit. Mezi zásadní patří například skladování vzorku (při dlouhodobém skladování je nutné utlumit metabolickou aktivitu kvasnic snížením teploty nebo inhibujícími látkami), příprava (promývání, hladovění) a parametry měření (teplota a koncentrace kvasnic a glukosy). V této kapitole jsou faktory ovlivňující výsledek testu popsány a navržen postup pro minimalizaci jejich vlivu.

### 3.1 Uchovávání vzorků

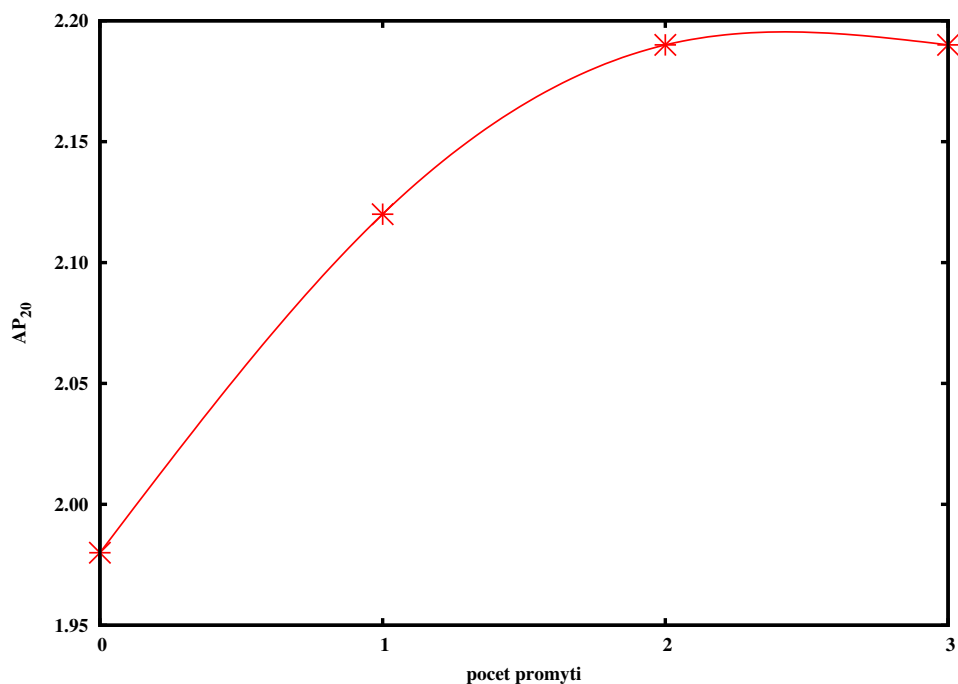
Kontrola vitality kvasnic není mnohdy možná ihned po odběru a vzorky tak bývají před vlastním měřením po nějakou dobu skladovány, což může ovlivnit jejich fyziologický stav a následně vitalitu. Snahou je kvasnice skladovat tak, aby se maximálně prodloužila doba, po kterou si zachovají svůj fyziologický stav.

Na několika vzorcích bylo ověřeno, že při skladování kvasničných suspenzí pod vrstvou piva v lednici při teplotě  $0 - 2^{\circ}\text{C}$ , výsledná hodnota AP, během prvních třech dní skladování roste, po další tři dny se drží konstantní a po šestém dni klesá. Pokles výsledku AP-testu je i po deseti dnech skladování vzorků pod úrovní 3%, jak je ukázáno i v [2]. Data z těchto měření nejsou publikována.

Vitalitu kvasnic také ovlivňuje složení média, ve kterém jsou skladovány. Bylo prokázáno, že skladování kvasnic ve vodě nasycené  $\text{CO}_2$ , fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) a fosfát-citrátovém pufru ( $\text{pH} = 4.5$ ) má negativní vliv na vitalitu [2]. Viabilitu si kvasnice nejdéle udrží právě při uchovávání pod pivem.

### 3.2 Příprava vzorků

Příprava vzorku před samotným měřením zásadně ovlivňuje výsledek AP-testu. Je nutné ji provádět tak, aby hodnota  $AP_{20}$  byla co nejvyšší a zároveň reprodukovatelná. Bylo ověřeno, že právě maximální hodnota výsledku AP-testu je správným výsledkem odpovídajícím vitalitě kvasnic [10]. Tato hodnota odpovídá nejen vitalitě kvasnic,



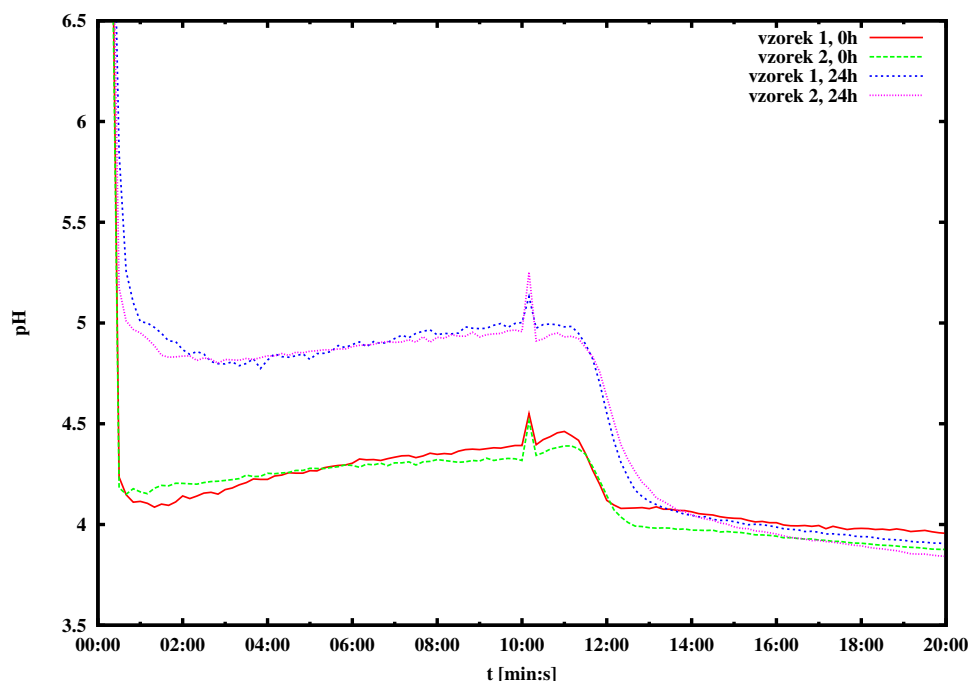
Obrázek 3.1: Závislost hodnoty  $AP_{20}$  na počtu promytí vzorku před měřením.

ale také množství endogenních energetických zásob. Kvasinky s velkými vnitřními zásobami (např. kvasinky z propagace) mohou vykazovat slabou acidifikaci i po přidání exogenní glukosy a zkreslit tak výsledek AP-testu (výsledná hodnota bude nižší). Tzv. hladověním lze kvasnice donutit k vyčerpání endogenních energetických zásob, což vede k nárůstu výsledné hodnoty AP, nicméně delší hladovění může naopak vést k poklesu acidifikační schopnosti.

### Promývání

Mladina, ve které jsou vzorky skladovány, obsahuje zdroje energie, nečistoty a také působí jako pufr. Promýváním vzorku dojde k nahrazení mladiny deionizovanou vodou, čili ke snížení pufrovací kapacity média a odstranění adsorbovaných látek na povrchu buněk, a také k temperaci na teplotu, při které probíhá měření. Promývání bylo prováděno destilovanou vodou o teplotě 25 °C.

Počet promytí ovlivňuje výslednou hodnotu AP-testu, jak je vidět na obrázku 3.1. Z grafu je zřejmé, že trojnásobné promytí je postačující, hodnota  $AP_{20}$  dosahuje maxima již po druhém promytí. Po posledním promytí následuje „prudké“ odstředění (cca 3000 ot/min po 10 min). Po něm, jsou všechny kvasnice ve vzorku sedimentované, lze dekantovat supernatant a odvážit čistou váhu kvasnic.



Obrázek 3.2: Průběh AP-testu dvou různých vzorků po třech promytích provedený okamžitě a následující den.

### Doba skladování před samotným měřením

Byla ověřena také doba, po kterou může být vzorek po trojnásobném promytí a prudkém odstředění skladován před vlastním měřením, tuto prodlevu definujeme jako *doba ležení*. Z praktického hlediska je výhodné ověřit, jak dlouho mohou být vzorky uloženy před měřením, kdy dochází k prodlevám např. při přípravě více vzorků.

Pro ověření vlivu doby ležení na AP-test, byly připraveny dva různé vzorky kvasnic, trojnásobně promyté a prudce odstředěné. Poté byl na vzorcích změřen test, zbytek kvasnic byl uložen do lednice pro srovnávací měření po 24 hodinách (již bez jakéhokoli odstředování či promývání). Průběh testů je na obrázku 3.2 a výsledky v tabulce 3.1.

Z výsledných hodnot je zřejmé, že hodnota  $AP_{20}$  se během 24 h pro jednotlivé vzorky změnila jen minimálně, konkrétně o 0.06 resp. 0.04, což činí změnu o 3% resp. 2%. Lze tedy předpokládat, že po třech promytích a prudkém odstředění kvasnic lze takto sedimentovaný vzorek skladovat v lednici v řádu hodin bez vlivu na vitalitu.

Jelikož je na obrázku 3.2 zachycen vůbec první průběh měření AP-testu v této práci, okomentujme si jej podrobně. Jak již bylo řečeno, spuštění času měření počíná přidáním vzorku kvasnic do destilované vody. Kvasničně buňky přirozeně reagují adaptací na nové prostředí. Na začátku probíhá tzv. acidifikace bez substrátu (spontánní acidifikace), při níž je spotřebováván kyslík obsažený v mediu a využívány endogenní zdroje energie. Vyčerpání těchto zdrojů se projeví poklesem  $pH$  suspenze a jeho stabilizací. Hodnota  $pH$  dosažená spontánní acidifikací ( $pH_{10}$ ) tedy ukazuje na množství endogenních zdrojů energie buněk. Po přidání glukosy v desáté minutě měření dochází

Tabulka 3.1: Výsledky vlivu doby ležení vzorku před vlastním měřením na výsledky AP-testu.

čas [h]	popis	$pH_{10}$	$pH_{20}$	$AP_{10}$	$AP_{20}$
0	vzorek 1	4.39	3.96	1.91	2.34
	vzorek 2	4.32	3.88	1.98	2.42
24	vzorek 1	5.00	3.90	1.30	2.40
	vzorek 2	4.96	3.84	1.30	2.46

k jejímu zpracování, což se projeví vypuzováním  $H^+$  vně buněk a dalším poklesem hodnoty extracelulárního  $pH$ .

Na výsledcích předchozích testů je tedy vidět zřetelný nárůst (o cca 14 %) hodnoty  $pH_{10}$  (pokles  $AP_{10}$  o cca 33 %) dosažené měřením jednotlivých vzorků po 24 hodinách oproti původní hodnotě. Změny výsledných hodnot testu ( $AP_{20}$ ) byly komentovány výše. Platí, že průběh spontánní acidifikace nemá vliv na výsledky testu. Ukazuje pouze na množství energetických zásob buněk.

## Hladovění

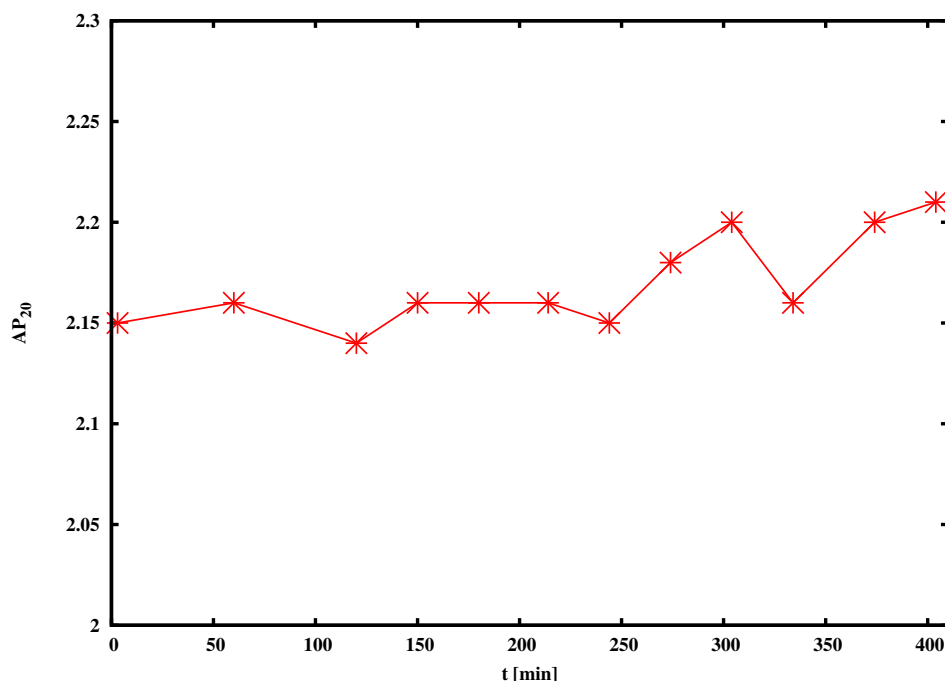
Hladovění je proces, při němž jsou buňky v mediu bez utilizovatelných substrátů a jsou tak odkázány pouze na vlastní zdroje energie. Při měření AP-testu se může stát, že kvasnice s bohatými endogenními zdroji energie po přidání glukosy (nebo jiného zdroje energie) do media nereagují tak aktivně jako buňky, které mají nízké zásoby vnitřních zdrojů. To se samozřejmě projeví nižší výslednou hodnotou  $AP_{20}$ , která pak neodpovídá potenciální vitalitě. Hladovění, tedy snížení množství vnitřních zásob, pak uvede buňky do správného fyziologického stavu, ve kterém projeví maximální potenciál kvasné mohutnosti. Projev vitality na výsledek AP-testu byl ověřen v následujícím experimentu.

Za pokojové teploty (cca 25 °C) hladověl vzorek kvasnic v destilované vodě (poměr husté suspenze kvasnic a vody 1 : 1). Po celou dobu bylo médium mícháno magnetickým míchadlem (cca 150 ot/min), tak aby nedošlo k sedimentaci. Před celou procedurou byl vzorek třikrát promyt.

Během hladovění byla část kvasnic odebírána a byl na nich změřen AP-test (první vzorek bez hladovění). Na obrázku 3.3 je pak vynesena závislost výsledné hodnoty  $AP_{20}$  na době hladovění.

Po 404 minutách se výsledek AP-testu změnil o 3 % od výsledku testu bez hladovění. Lze tedy předpokládat, že trojnásobné promytí zajistí dostatečnou utilizaci endogenních zdrojů energie a další hladovění již nemá vliv na hodnotu AP a nemusí být proto uplatňováno.

Tento výsledek dobře souhlasí s výsledky uvedenými v [2], kde byly porovnány měření AP hodnoty vzorků vystavených hladovění bez předchozího promytí a s trojnásobným promytím.



Obrázek 3.3: Závislost výsledku AP-testu na době hladovění vzorku před měřením.

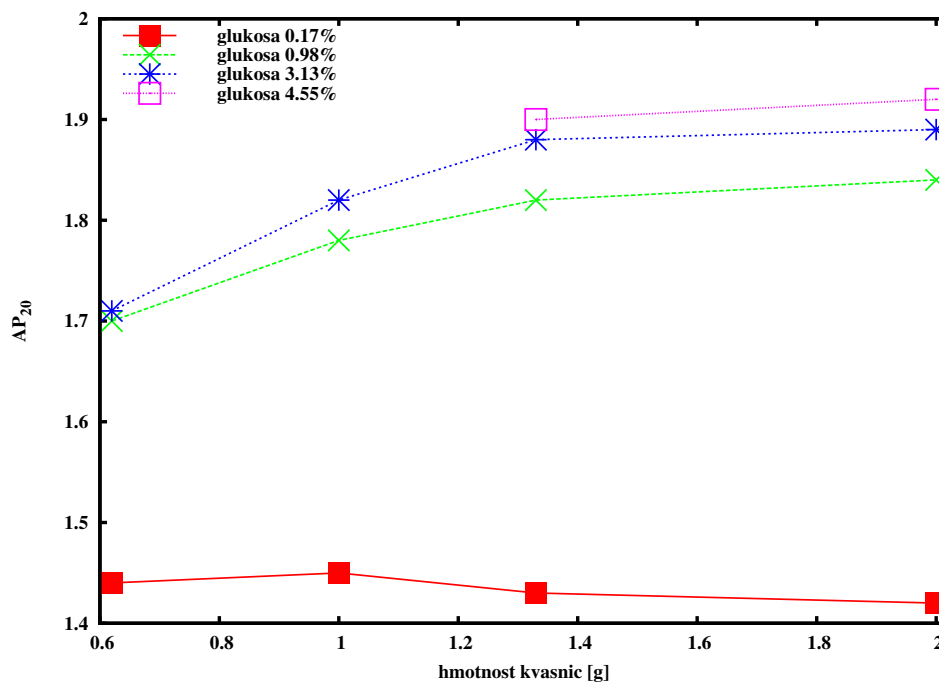
### Koncentrace glukosy a kvasnic

Zvyšováním koncentrace glukosy přidané do vzorku kvasnic se zvýší i úroveň acidifikace, potažmo výsledek AP-testu, stejně tak změnami koncentrace kvasnic (viz [7]). Snahou následujícího experimentu bylo tuto závislost  $AP_{20}$  ověřit a následně nalézt vhodné koncentrace kvasnic a glukosy tak, aby byl jejich vliv (např. při nepřesném odvážení) na výsledek testu minimalizován. Během testu nesmí dojít k vyčerpání glukosy v mediu (resp. k významným změnám její koncentrace) a změnit se tak podmínky testu.

Za účelem nalezení optimální koncentrace glukosy resp. kvasnic při AP-testu byly naměřeny závislosti vynesené na obrázku 3.4. Z grafů je zřejmé, že teprve při použití koncentrace glukosy ve vzorku nad 3.13 % se již hodnota  $AP_{20}$  mění minimálně (konkrétně o cca 1 %). Při použití koncentrace kvasnic nad 1.33 g na 15 ml dochází k saturaci průběhu závislosti výsledků  $AP_{20}$  na koncentraci. Čili v rozsahu hodnot hmotnosti mokré váhy kvasnic 1.33 – 2 g se výsledná hodnota AP mění o necelé procento a minimalizuje se tak chyba výsledku testu při nepřesném navážení.

Naměřené vzorky měly relativně nízkou hodnotu  $AP_{20}$  a to pod 2.0. Z důvodu možného vyčerpání glukosy v mediu u mnohem aktivnějších kvasnic (hodnota  $AP_{20}$  na úrovni 2.5 až 2.7) lze doporučit používání koncentrace glukosy 4.55 % a koncentrace kvasnic 1.5 g na 15 ml destilované vody.

Je samozřejmě možné pro potřeby metody AP-testu používat i nižší gramáž kvasnic ve vzorku (jak je nakonec učiněno v kapitole Bezkontaktním měření  $pH$ ), ale je nutné dbát na přesnost navážky a srovnání výsledků testů pouze o stejných koncentracích vzorků. Je také nutné počítat se zpomalením acidifikace vzorku.



Obrázek 3.4: Závislost výsledku AP-testu na použité koncentraci glukosy a kvasnic v 15 ml  $H_2O$ .

### Další vlivy

Podstatný vliv na průběh AP-testu má teplota. Jak bylo prokázáno v předchozích pracích [13], změna teploty o  $1^\circ C$  způsobí změnu hodnoty  $AP_{20}$  o 0.1. Z tohoto důvodu byly vzorky během našich experimentů před samotným měřením temperovány na teplotu měření ( $25^\circ C$ ), která byla udržována konstantní pomocí termostatu.

Další jev, který ovlivňuje měření vitality pomocí AP-testu je flokulace kvasnic. Flokulace je typickým projevem pivovarských kvasnic, kterým po prokvašení mladiny usnadňuje sedimentaci (způsob výroby piva spodním kvašením). Aglutinaci buněk lze zabránit několika způsoby, například přidáním EDTA do vzorku, mícháním vzorku nebo také přidáním glukosy.

Po vytvoření shluků kvasinek a jejich sedimentaci se efektivně snižuje plocha, kterou buňky mohou přijímat živiny. Jevem flokulace, který je způsoben interakcí buněčných stěn kvasnic se zabývá například práce [8].

Pro účely měření AP-testu je nutné flokulaci zabránit např. vhodným mícháním vzorku během měření (v našem případě magnetickým míchadlem). Rychlost míchání je závislá na geometrickém uspořádání experimentu, na aparatuře YATA s použitím zkumavky o objemu 25 ml a objemu vzorku 15 ml (resp. 16.5 ml po přidání glukosy) je postačující 200 ot/min (viz [2]).

## Závěry kapitoly

Minimalizací faktorů ovlivňujících průběh a výsledky AP-testu, které zahrnují uchovávání vzorků, přípravu vzorků (včetně promývání, doby ležení vzorku před samotným měřením a hladověním), koncentrace kvasnic a glukosy, teplota a flokulace, bylo dosaženo optimálního postupu, při kterém lze docílit: maximální výsledné hodnoty AP a reprodukovatelnosti měření.

Při optimálním postupu je nutné použít vzorky kvasnic uchovávané v mladině při teplotě  $0 - 2^{\circ}\text{C}$  po dobu až deseti dnů. Při přípravě vzorků je nezbytné trojnásobné promytí kvasnic za účelem odstranění zdrojů energie a nečistot obsažených v mladině a adsorbovaných na povrchu buněk, odstranění pufrovacího účinku mladiny a teploty vzorku na teplotu měření ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Bylo ukázáno, že po trojnásobném promytí a prudkém odstředění si takto sedimentované kvasnice udrží svou vitalitu v řádu hodin. Ovlivnění AP-testu hladověním vzorku v destilované vodě po jeho trojnásobném promytí nebylo prokázáno. Dále je nutností použít koncentraci kvasnic a glukosy při testu za saturační hranicí závislosti  $AP_{20}$ , která činí cca 1.5 g kvasnic na 15 ml destilované vody a 4.55 % koncentrace glukosy, kdy nepřesné navážení kvasnic neovlivní výsledek testu a nedojde k vyčerpání glukosy v mediu. V průběhu AP-testu je nutné udržovat konstantní teplotu ( $25 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) a zabránit flokulaci kvasnic vhodným mícháním vzorku (200 ot/min).

Optimalizovaný postup AP-testu lze shrnout do následujících kroků:

- Zásobní roztok s kvasnicemi roztřepeme (kvůli homogenizaci) a odebereme z něj „dostatečné“ množství (cca 5 ml) koncentrované suspenze.
- Vzorek krátce odstředíme, cca 1000 ot/min po dobu 60 s (cca  $145 \times g$ ), a dekantujeme pivo.
- Promyjeme destilovanou vodou (cca 15 ml) o teplotě cca  $25^{\circ}\text{C}$ .
- Promývání (včetně krátkého odstředění) opakujeme, provedeme celkem třikrát.
- Po třetím promytí následuje prudké odstředění, cca 3000 ot/min po 10 min ( $1300 \times g$ ), slítí supernatantu.
- Odvážíme ( $1.5 \pm 0.1$ ) g čisté váhy kvasnic.
- Přidáme 15 ml destilované vody do vzorku, spustíme měření času a vzorek roztřepeme.
- Měření probíhá za stálého míchání (200 ot/min, musí zabránit flokulaci) a při stabilní teplotě  $25.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .
- V desáté minutě přidáme 1.5 ml glukosy (50 % roztok); konečná koncentrace glukosy v mediu 4.55 % (hmotnost glukosy na objem vzorku).
- Odečteme hodnoty  $pH$  v desáté a dvacáté minutě.

# Kapitola 4

## Využití AP-testu

Předchozí kapitola byla věnována studiu vlivu vnějších faktorů na průběh a výsledky AP-testu. Navržený optimalizovaný postup měření (viz Materiál a metody) tyto vlivy minimalizuje a je při něm dosaženo maximální hodnoty AP a reprodukovatelnosti měření.

Hlavním cílem pro použití AP-testu v praxi je nalezení souvislosti mezi jeho výsledky a průběhem fermentace. Tímto se zabývala a korelaci potvrdila např. práce [7]. V této diplomové práci je ověřena souvislost mezi výsledky testu a počtem nasazení kvasnic v pivovarském provozu.

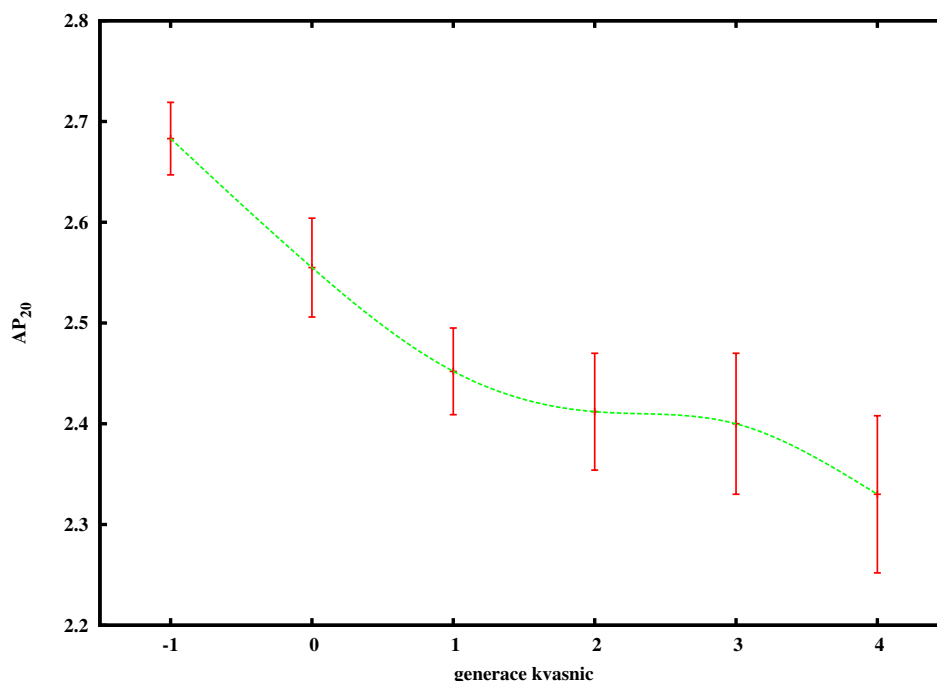
Dále se nabízí otázka, jestli lze test uplatnit pro studium působení stresových faktorů na buňky. Za tímto účelem bylo konkrétně sledováno působení osmotického stresu na vitalitu buněk.

Neméně zajímavá může být informace jak konkrétně odráží test acidifikační schopnosti průběh metabolismu. Za tímto účelem bylo vybráno a použito v průběhu testu několik druhů xenobiotik. Tyto látky byly také použity s cílem nalézt inhibitor acidifikace, čehož by mohlo být využito v další kapitole pro studium spekter rozptylujícího vzorku (kvasničná suspenze) na absorpční spektra  $pH$  citlivé látky.

### 4.0.1 Vliv počtu nasazení kvasnic v CKT na AP-test

Hlavní proces kvašení při výrobě piva dnes v mnoha pivovarech probíhá v CKT (cylindricko-kónických tancích), což jsou nádrže o objemu 2000 hl a více. Kvasnice jsou při tomto procesu vystaveny různým stresovým faktorům, což se může projevit na kvalitě prokvašení a v konečném důsledku i na chuti piva. Po prokvašení a flokulaci jsou kvasnice odebrány z tanku a opět nasazeny k další fermentaci. Kvalita odebraných kvasnic samozřejmě závisí na vrstvě, ze které jsou odebrány. Např. na samém dně tanku se vyskytují buňky ve špatném fyziologickém stavu (velké a staré), které často autolyzují. Naopak ve vyšších vrstvách tanku je pak vyšší zastoupení mladých buněk (50 % až 65 % panenských). Kvalita kvasnic je také ovlivněna počtem opětovného nasazení. S vyšším počtem nasazení klesá viabilita a roste počet buněk, jež jsou v různé růstové fázi, což v důsledku vede k projevu snížení vitality.





Obrázek 4.1: Závislost výsledku AP-testu na počtu nasazení kvasnic k fermentaci, kde  $-1$ : jsou kvasnice z propagace,  $0$ : kvasnice před prvním nasazením v CKT.

Za účelem zachycení poklesu vitality při opětovném nasazování kvasnic pomocí AP-testu byly proměřeny vzorky ( $n = 20$ ) odebrané při prvním až čtvrtém nasazení v CKT. Pro srovnání byly naměřeny také AP-testy kvasnic z propagace ( $-1$ . nasazení) a testy kvasnic před prvním nasazením ( $0$ . nasazení).

Výsledky testů jsou vyneseny v grafu na obrázku 4.1. Měření byla prováděna dle optimalizovaného postupu, vyneseny jsou průměrné hodnoty se standardní odchylkou.

Z grafu je vidět, že s rostoucí generací nasazených kvasnic klesá jejich  $AP_{20}$ , což odpovídá předpokladům. Tento pokles činí 13 % mezi kvasnicemi z propagace a počtvrté nasazenými. S počtem nasazení také roste směrodatná odchylka měření, což je způsobeno zvýšeným počtem výskytu jednotlivých buněk v různých růstových fázích. Největší relativní chyby měření je dosaženo pro počtvrté nasazené kvasnice a činí 3 %, tato nízká hodnota relativní chyby ukazuje na dobrou optimalizaci testu.

#### 4.0.2 Vliv osmotického stresu na vitalitu kvasnic

Kvasnice používané k výrobě piva jsou vystaveny mnoha stresovým faktorům, např. změny  $pH$  (kyselé promývání zabraňující bakteriální kontaminaci), osmolarity (promývání, lisování a fermentace v mladině vysoké stupňovitosti), koncentrace ethanolu, přísunu živin nebo teploty. Následný průběh fermentace je pak ovlivněn schopností adaptovat se na tyto změny.

V přirozeném prostředí pak kvasinky neustále podléhají různým změnám vnějších podmínek, např. změnám osmotického tlaku, a z důvodů evolučních jsou schopny se jim přizpůsobit.

Při vložení buněk do destilované (tedy deionizované) vody, jež je pro ně hypotonickým prostředím, je vystavíme osmotickému stresu. Buňky jsou nuceny se vyrovnat s přísunem vody v důsledku osmózy, což způsobí nárůst objemu buňky. Je-li buňka v dobrém fyziologickém stavu a osmotický tlak není příliš velký, je schopna se s touto stresovou situací vyrovnat. V opačném případě může dojít k nevratnému poškození buňky. Bylo prokázáno, že je-li buňka vystavena pomalým změnám osmotického tlaku, je schopna se mu přizpůsobovat (např. posílením cytoskeletu) a odolat vyšším rozdílům osmotických sil. Při prudkém změně koncentrace roztoku s buňkami je vyšší pravděpodobnost jejich poškození.

V souvislosti s výrobou piva jsou kvasinky při hlavním kvašení mladiny vystaveny osmotickému tlaku. Mladina je vysoce koncentrované médium bohaté na zkvasitelné cukry a je pro kvasnice hypertonickým prostředím. V tomto prostředí kvasinky zmenšují svůj objem v důsledku úbytku vody osmózou.

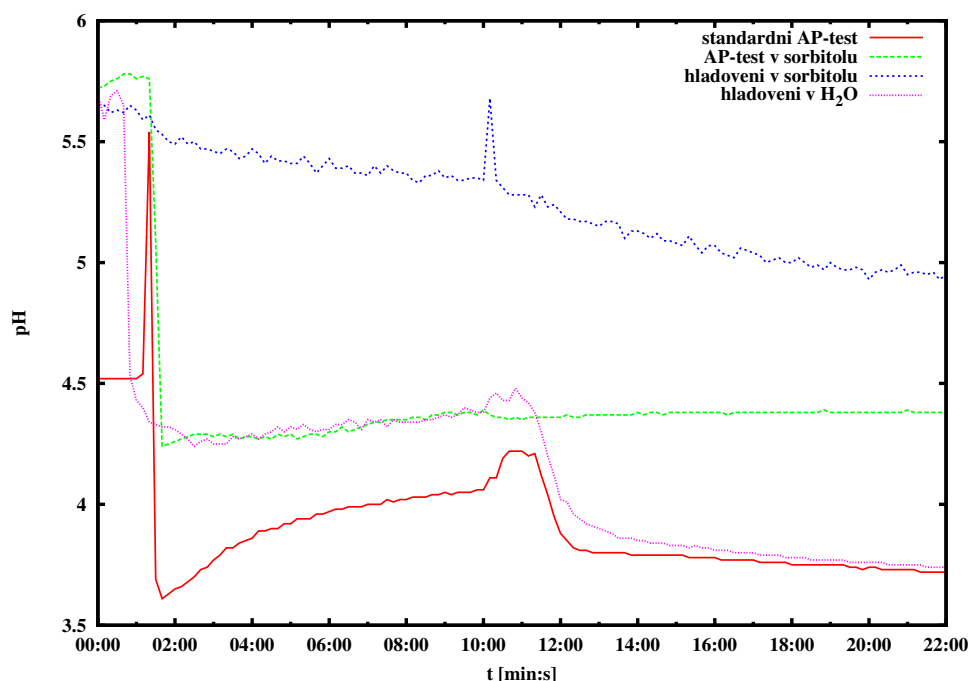
Za účelem studia vlivu osmotického stresu na vitalitu buněk byly proměřeny série AP-testů s použitím různých koncentrací sorbitolu. Nejprve byl ověřen vliv použití sorbitolu v různých částech AP-testu na jeho výsledek.

### **Použití sorbitolu v různých částech AP-testu**

Pro představu o tom, jak buňky na osmotický stres reagují byl navržen následující experiment. Dle optimalizovaného postupu (viz stránka 39) byly skladovány a připraveny vzorky kvasnic pro měření testu do momentu, kdy mají být odváženy. Dále byly naměřeny čtyři stejné vzorky různým způsobem:

1. Referenční měření, čili další postup měření testu beze změny, tedy odvážení 1.5 g kvasnic mokré váhy, přidání 15 ml  $H_2O$  a spuštění času, v 10. minutě přidání 1.5 ml glukosy (její konečná koncentrace 4.55 %) - standardní AP-test.
2. Stejný postup jako v bodě 1., ale místo 15 ml  $H_2O$  použito 15 ml sorbitolu (1.7 M roztok) a 1.5 g mokré váhy kvasnic - AP-test v sorbitolu.
3. Před měřením AP-testu hladovění kvasnic v sorbitolu (1.7 M roztok) po dobu 1 h, poté ještě jedno promytí v destilované vodě, odstředění (3000 ot/min po 10 min), odvážení 1.5 g mokré váhy a spuštění testu v 15 ml  $H_2O$ , v 10. minutě přidání 1.5 ml glukosy (její konečná koncentrace 4.55 %) - hladovění v sorbitolu.
4. Před měřením AP-testu hladovění kvasnic v  $H_2O$  po dobu 1 h, poté odstředění (3000 ot/min po 10 min), odvážení 1.5 g mokré váhy a spuštění testu v 15 ml  $H_2O$ , v 10. minutě přidání 1.5 ml glukosy (její konečná koncentrace 4.55 %) - hladovění v  $H_2O$ .

Průběhy AP-testů naměřených předchozími postupy jsou zobrazeny na obrázku 4.2 a výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.1.



Obrázek 4.2: Průběhy AP-testů v závislosti na použití 1.7M roztoku sorbitolu v různých částech jejich průběhu.

Výsledky v tabulce 4.1 ukazují, že byl-li AP-test proveden optimalizovaným způsobem je výsledná hodnota  $AP_{20} = 2.56$ , což ukazuje na velmi dobrý fyziologický stav kvasnic.

Předcházelo-li měření hodinové hladovění vzorku v destilované vodě, mělo to na výsledek testu minimální vliv (změna  $AP_{20}$  o cca 1%), což odpovídá výsledkům předchozích experimentů s hladověním provedeným v předchozí kapitole (viz stránka 36). V této souvislosti stojí za povšimnutí (viz tabulka 4.1) rozdílné hodnoty  $pH$  dosažené v desáté minutě měření ( $pH_{10}$ ) pro vzorky naměřené postupem 1. a 4., ve kterých se projevilo hodinové hladovění před testem poklesem výsledku spontánní acidifikace  $AP_{10}$  o 14%.

Tabulka 4.1: Výsledky AP-testů při použití 1.7M roztoku sorbitolu v různých částech jejich průběhu.

postup	popis	$pH_{10}$	$pH_{20}$	$AP_{10}$	$AP_{20}$
1.	standardní AP-test	4.06	3.74	2.24	2.56
2.	AP-test v sorbitolu	4.39	4.38	1.91	1.92
3.	hladovění v sorbitolu	5.34	4.93	0.96	1.37
4.	hladovění v H <sub>2</sub> O	4.38	3.76	1.92	2.54

Pro srovnání s měřením testu dle optimálního postupu byl použit postup č. 2., tedy místo 15 ml destilované vody (do které se následně přidává 1.5 g kvasnic) bylo použito 15 ml sorbitolu (1.7 M roztok). Z grafu na obrázku 4.2 je zřejmé, že při takovémto postupu kvasinky vykazují nulovou acidifikaci po přidání vnějšího substrátu (1.5 ml glukosy) v desáté minutě měření. Hodnota  $pH$  dosažená spontánní acidifikací je pravděpodobně ovlivněna  $pH$  samotného sorbitolu a nevratným poškozením buněk. Hodnota  $pH$  samotného sorbitolu nebyla naměřena.

Poslední vzorek byl připraven dle postupu 4. a byl tedy vystaven hodinovému hladovění v sorbitolu (1.7 M roztok). Výsledná hodnota  $AP_{20}$  činí pouze 1.37 a z průběhu křivky (obrázek 4.2) je vidět velmi slabá odezva na přidání glukosy v desáté minutě měření, což je pravděpodobně způsobeno poškozením buněk. Můžeme tedy usoudit, že vzorku vystavenému hladovění po dobu jedné hodiny ve výrazně hypertonickém prostředí v podobě roztoku sorbitolu klesla hodnota viability a zbylé buňky byly schopny jen velmi slabě acidifikovat vnější prostředí po přidání glukosy. Tento jev souvisí s faktem, že koncentrace sorbitolu 1.7 M odpovídá asi trojnásobku přirozené vnitřní osmolarity buněk kvasnic (viz [1]) a dochází při ní k plazmolýze buněk.

Jelikož vzorek naměřený modifikací AP-testu dle postupu č. 2 (AP-test v sorbitolu) na přidání vnějšího substrátu vůbec nereagoval, v dalších experimentech bylo postupováno dle alternativy 3. a byla proměřena závislost výsledku testu na koncentraci sorbitolu (ve kterém vzorek hladoví).

### **Vliv hladovění v sorbitolu různé koncentrace na výsledek AP-testu**

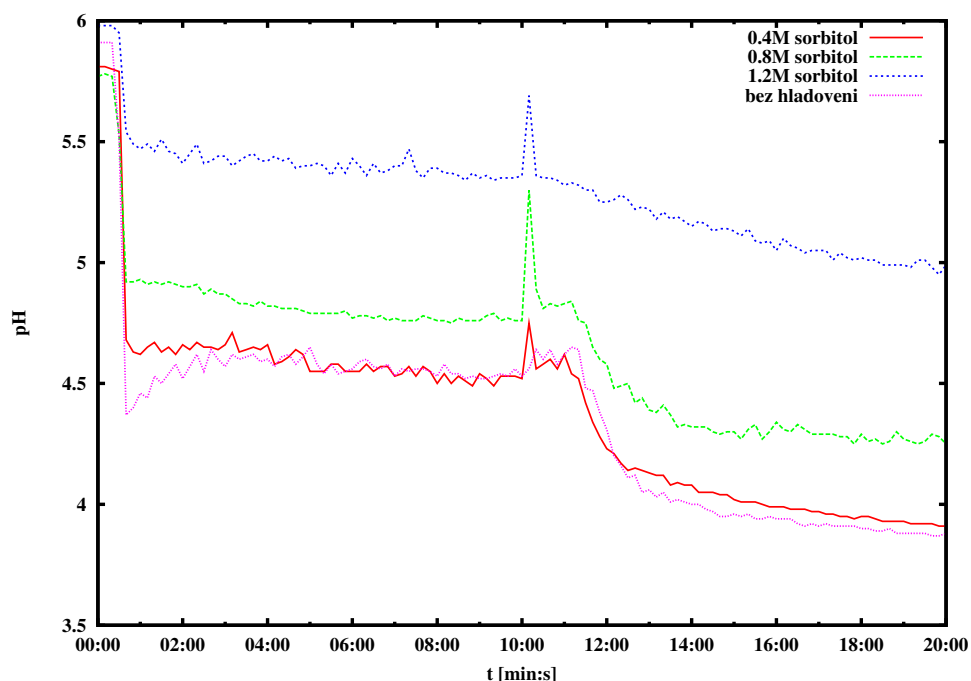
V předchozích odstavcích jsme získali představu o tom, jak osmotický stres simulovaný působením molekul sorbitolu ovlivňuje průběh a výsledky AP-testu. Nyní se zaměříme na jednu z alternativ použitých v předchozím experimentu.

Pro účely měření vlivu hladovění kvasnic v sorbitolu o různé koncentraci, jež je pro kvasnice osmotickým stresovým prostředím byl pozměněn optimalizovaný AP-test následovně. Všechny kroky zahrnující skladování a přípravu vzorku zůstaly nezměněny, po trojnásobném promytí vzorku byly kvasnice umístěny do roztoku sorbitolu (o koncentraci: 1.2 M, 0.8 M a 0.4 M), kde byly míchány po dobu 30 min. Jako reference byl změřen čtvrtý vzorek standardním způsobem, čili bez hladovění. Buňky nebylo nutné vystavovat hladovění v destilované vodě (tak jako v předchozím experimentu), jelikož po trojnásobném promytí vzorku nemá na výsledek AP-testu vliv.

Průběhy takto provedených AP-testů jsou na obrázku 4.3 a výsledné hodnoty shrnuty v tabulce 4.2. Při standardním provedení AP-testu kvasinky vykazovaly výslednou hodnotu  $AP_{20} = 2.42$ , což ukazuje na dobrou vitalitu buněk.

Při hladovění buněk po 30 min v sorbitolu se hodnota  $AP_{20}$  s rostoucí koncentrací sorbitolu snižovala. Maximální pokles byl zaznamenán při nejvyšší použité koncentraci sorbitolu (1.2 M roztok) na  $AP_{20} = 1.31$ , což je pokles o 46 % z původní hodnoty naměřené bez sorbitolu. Výsledná hodnota testu  $AP_{20} = 1.31$  již odpovídá značně poškozeným buňkám. Průběh poklesu hodnot  $AP_{20}$  je zachycen na obrázku 4.4.

Výsledky naznačují, že čím vyšší je osmotický tlak (v podobě přítomnosti sorbitolu v roztoku) působící na buňky během hladovění, tím menší je projev vitality v následném



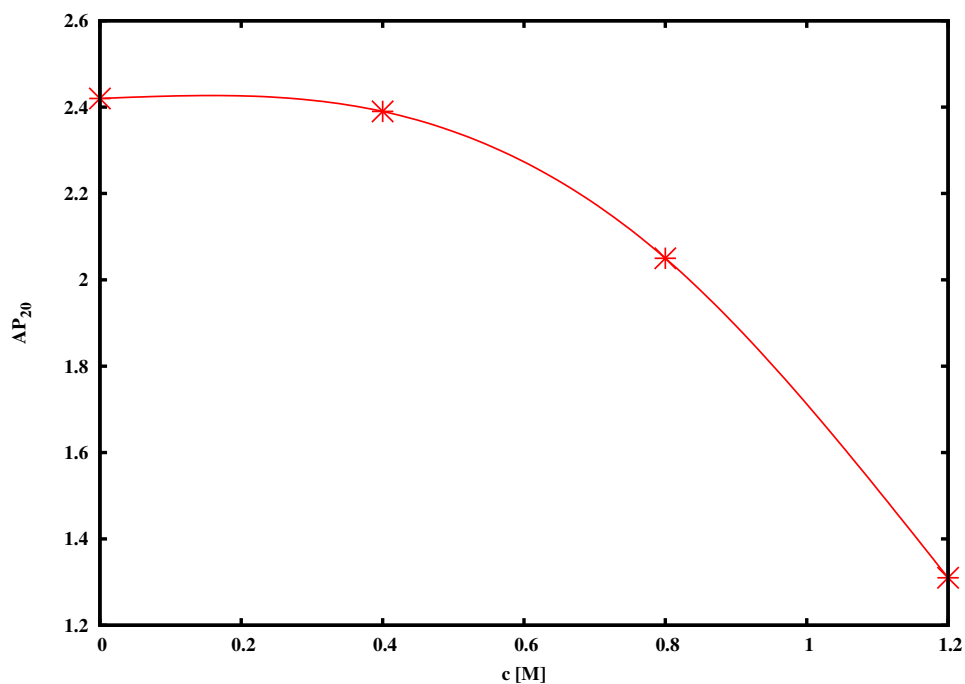
Obrázek 4.3: Průběh AP-testu po hladovění vzorků v různých koncentracích sorbitolu.

AP-testu. Tento jev může být způsoben zvýrazňováním vlivu osmotického stresu na buňky a také poklesem viability vzorku.

Uvedená měření ukazují jednoznačný vliv působení osmotického stresu na vitalitu buněk. V pivovarském provozu jsou kvasnice vystaveny osmotickému tlaku zejména při procesu hlavního kvašení, které probíhá v CKT. Mladina bohatá na zkvasitelné cukry (zejména maltosu) je pro pivovarské kvasnice vynikající živné médium. Obsahuje však i jiné látky, které pro buňky zkvasitelné nejsou a neprochází ani přes plazmatickou membránu. Mladina je tedy pro kvasinky prostředí hypertonické a úroveň osmotického tlaku na buňky roste se stupňovitostí mladiny. Vliv osmotického tlaku na vitalitu buněk fermentujících v mladině (prostředí bohaté na živiny) o různé stupňovitosti byl studován v následujícím experimentu. Ten byl prováděn ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a.s (VÚPS).

Tabulka 4.2: Shrnutí výsledků AP-testu s vlivem osmotického stresu při hladovění v různých koncentracích sorbitolu.

$c$ [M]	$pH_{10}$	$pH_{20}$	$AP_{10}$	$AP_{20}$
0	4.53	3.88	1.77	2.42
0.4	4.52	3.91	1.78	2.39
0.8	4.76	4.25	1.54	2.05
1.2	5.36	4.99	0.94	1.31



Obrázek 4.4: Závislost výsledku AP-testu na koncentraci sorbitolu, ve kterém kvasnice hladověly.

### Vliv osmotického tlaku na vitalitu kvasnic fermentujících v mladině různé stupňovitosti

V předchozím experimentu bylo ukázáno, že osmotický tlak v podobě hladovění buněk v sorbitolu má jednoznačný vliv na vitalitu. Nyní bude studováno, jakou roli při působení osmotického stresu na buňky hraje mladina, ve které buňky fermentují.

Měření všech AP-testů proběhlo dle optimalizovaného postupu (viz stránka 39), vzorky se lišily v tom, za jakých podmínek buňky fermentovaly. Každý vzorek byl celkem třikrát nasazen do kvasného válce a to cca s týdenním odstupem:

1. Byla připravena mladina o třech různých stupňovitostech: 12°, 16° a 20°. Mladiny 16° a 20° byly připraveny z mladiny 12° přidáním sorbitolu pro vyvolání osmotického tlaku odpovídajícího požadované stupňovitosti (takže obsah zkvasitelných cukrů zůstal zachován). Do jednotlivých mladin pak byly nasazeny kvasnice a bylo provedeno modelové kvašení v kvasném válci (cca 5 dní). Poté byla z každého válce odebrána část kvasnic (z každého po dvou vzorcích) a na nich pak změřen AP-test.
2. Byla opět připravena mladina stejně jako v předchozím případě. Do jednotlivých kvasných válců pak byly opětovně nasazeny kvasnice z 1. nasazení dle mladiny odpovídající stupňovitosti. Po skončení modelového kvašení byla opět odebrána část kvasnic (po dvou vzorcích) a na nich změřen AP-test.

Tabulka 4.3: Shrnutí výsledků měření vlivu nasazení kvasnic v mladině různé stupňovitosti na vitalitu. Označení vzorku odpovídá stupňovitosti mladiny, v níž fermentoval,  $12_{16}^{\circ}$  pak značí kvasnice nasazené poprvé a podruhé v  $16^{\circ}$  mladině, analogicky pro  $12_{20}^{\circ}$ .

nasazení	čas [dnů]	vzorek	$pH_{10}$	$pH_{20}$	$AP_{10}$	$AP_{20}$
1.	0	$12^{\circ}$	3.91	3.76	2.40	2.55
		$16^{\circ}$	4.03	3.79	2.27	2.52
		$20^{\circ}$	4.02	3.83	2.29	2.47
2.	7	$12^{\circ}$	3.96	3.77	2.34	2.54
		$16^{\circ}$	3.99	3.81	2.32	2.49
		$20^{\circ}$	4.22	3.89	2.08	2.41
3.	13	$12^{\circ}$	3.98	3.76	2.32	2.55
		$12_{16}^{\circ}$	4.03	3.75	2.28	2.55
		$12_{20}^{\circ}$	3.97	3.74	2.34	2.56

- Potřetí byla připravena třikrát tatáž  $12^{\circ}$  mladina. Následovalo opětovné nasazení kvasnic (již třetí) do kvasných válců. Po ukončení modelového kvašení byla opět odebrána část vzorků (z každého válce dvakrát) a na nich změřen AP-test.

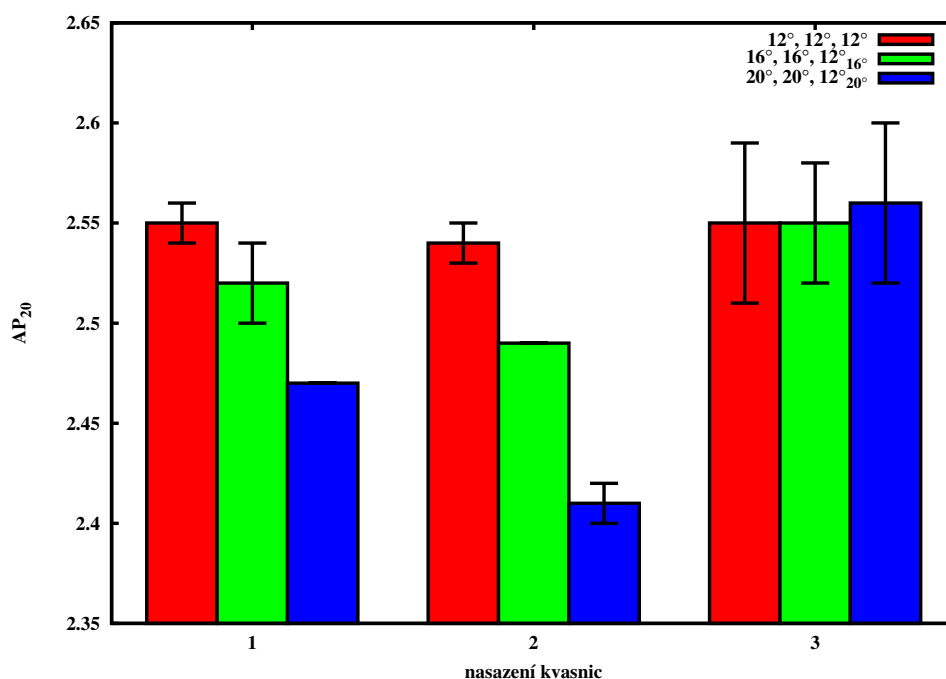
Výsledky všech naměřených testů jsou shrnuty v tabulce 4.3, hodnoty jsou průměrné z každé dvojice naměřených vzorků. Maximální dosažená standardní odchylka měření je pod úrovní 4 %, v tabulce nejsou chyby měření uvedeny (viz obrázek 4.5 i s chybami měření). Z hodnot uvedených v tabulce vidíme, že po prvním nasazení je výsledek AP-testu kvasnic fermentujících v  $12^{\circ}$  mladině  $AP_{20} = 2.55$ , což odpovídá velmi dobrému fyziologickému stavu buněk.

Ostatní výsledky AP-testů vzorků fermentujících v prostředí o vyšším osmotickém tlaku se mírně liší od této hodnoty, lze zaznamenat pokles  $AP_{20}$  s rostoucí stupňovitostí mladiny.

Ve výsledcích AP-testu po druhém nasazení je vidět pokles hodnot  $AP_{20}$  o 0 %, 1 % a 2.5 % oproti prvnímu nasazení. Tyto změny ve vitalitě se pohybují pod a nad hranicí přesnosti AP-testu. Nakonec po třetím nasazení výsledné hodnoty  $AP_{20}$  vzrostly na úroveň hodnot po prvním nasazení nebo byly dokonce ještě výše. Zároveň po posledním nasazení vzrostly standardní odchylky měření na již zmiňovaných cca 4 %.

Grafický průběh hodnot výsledků testu i se standardními odchylkami měření je znázorněn na obrázku 4.5. Z tohoto obrázku je vidět, že počáteční vitalita jednotlivých vzorků byla nižší s vyšší stupňovitostí mladiny. Po druhém nasazení je zřetelný pokles vitalit vzorků a po třetím nasazení opětovný nárůst. S rostoucím počtem dnů od prvního nasazení kvasnic rostla i standardní odchylka měření, to je způsobeno větším počtem buněk ve vzorku, jež jsou v různých růstových fázích.

Lze tedy usuzovat, že dlouhodobý vliv osmotického stresu při kultivování kvasnic se neprojevuje na jejich vitalitě. Živné médium v podobě na zkvasitelné cukry bohaté mladiny působí jako ochranný faktor pro buňky, jež jsou schopny se osmotickému tlaku



Obrázek 4.5: Grafické znázornění výsledků AP-testu měřeného po jednotlivých nasazeních kvasnic, jež studuje vliv osmotického tlaku při fermentaci buněk v mladině různé stupňovitosti.

přizpůsobit. V porovnání s předchozím experimentem, kdy se vliv osmotického stresu na vitalitu jednoznačně projevil poklesem vitality, můžeme říci, že osmotický stres má pouze akutní účinek a z dlouhodobého hlediska se neprojeví na vitalitě kvasnic.

### 4.0.3 Inhibice metabolických procesů

Inhibice je označení procesu, který brzdí, omezuje, zadržuje, zamezuje, utlumuje nebo zpomaluje jiný subjekt nebo jev, v našem případě chemickou reakci. Látkám, jež chemické reakce inhibují se říká inhibitory a většinou se jedná o xenobiotika, neboli cizorodé látky jež nevznikají v lidském těle.

Z pohledu této práce jsou inhibitory zajímavé pro studium vlivu inhibice některé z reakcí metabolické dráhy zpracování cukrů v buňkách kvasinek na zpomalení nebo zastavení acidifikace vnějšího prostředí, což se odrazí na průběhu a výsledcích AP-testu.

Další motivací, pro studium vlivu inhibitorů na test vitality je nalezení takové látky, která by zastavila acidifikaci a zároveň jinak neovlivnila průběh testu a charakter buněk. Toho by bylo možné využít v další kapitole (Bezkontaktní měření  $pH$ ), při studiu vlivu mnohonásobného rozptylu (na buňkách) na spektra absorbující látky (podrobnosti v další kapitole).



V následujícím experimentu byl zkoumán vliv třech inhibitorů blokujících různé části metabolismu a jako čtvrtý inhibitor byla použita látka YC-TETRA, což je chmelový extrakt. Vliv této látky na metabolismus není zcela objasněn.

Inhibující látky byly zvoleny dle osobního doporučení Karla Siglera, konkrétně se jednalo o tyto látky: iodoacetamid (IAA), glukosamin a malonát, charakteristika těchto látek viz Materiál a metody.

Pro účely následujících měření byla zachována příprava vzorků dle optimalizovaného AP-testu (viz strana 39), byl však upraven postup měření. Důležité kroky experimentu lze shrnout do následujících bodů:

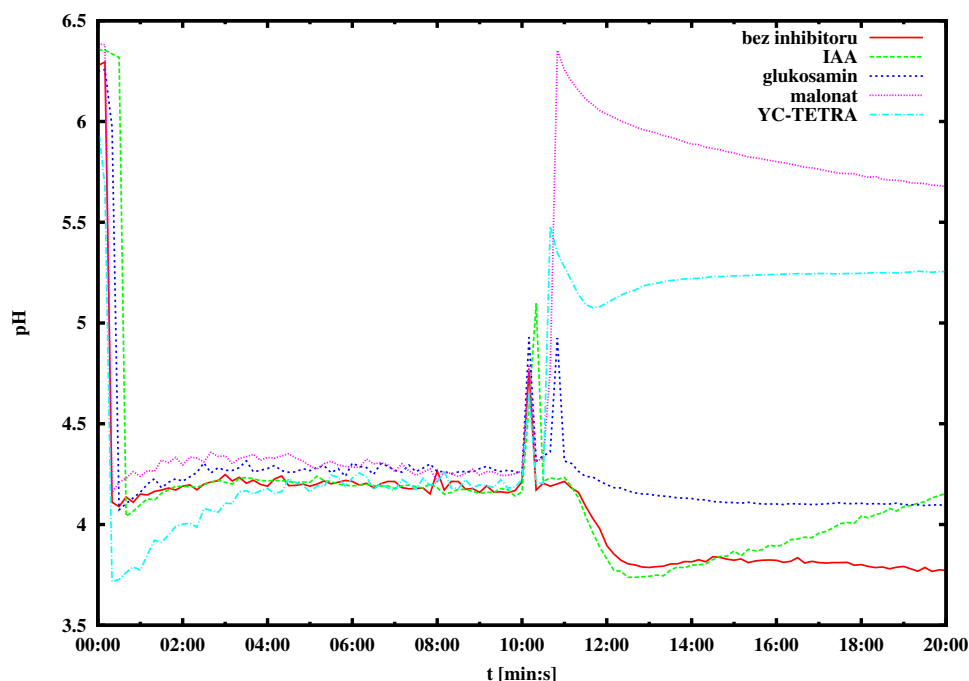
- Byly připraveny roztoky inhibitorů a dále vzorky kvasnic dle optimalizovaného postupu, čili třikrát promyté, odstředěné (3000 ot/min po 10 min) a z nich odváženo 1.5 g mokré váhy.
- Kvasnice byly zalaty destilovanou vodou a bylo spuštěno měření času. Objem H<sub>2</sub>O ve vzorku:
  - 16.5 ml pro referenčního měření AP-testu bez vlivu xenobiotika
  - 15 ml pro měření AP-testu s xenobiotikem.
- V desáté minutě přidáno 1.5 ml (50 % roztoku glukosy), konečná koncentrace glukosy ve vzorku 4.2 % (se započtením dávky inhibitoru).
- Bezprostředně po přidání glukosy bylo do vzorku nadávkováno 1.5 ml inhibitoru (36.4 mM roztok v konečné koncentraci).

Průběhy AP-testů naměřených dle uvedeného postupu jsou na obrázku 4.6 a souhrn výsledných hodnot pak v tabulce 4.4. Výsledek testu pro referenční vzorek, jež nebyl ovlivněn přidáním inhibitoru (jehož průběh měření byl modifikován oproti optimalizovanému postupu pouze přidáním 16.5 ml H<sub>2</sub>O místo 15 ml kvůli srovnání koncentrací glukosy a kvasnic s ostatními vzorky), činí  $AP_{20} = 2.53$ , což odpovídá buňkám v dobrém fyziologickém stavu.

Z průběhů testů na obrázku 4.6 je zřejmé, že látky malonát a YC-TETRA mají značný alkalizující účinek na vzorek. Po přidání těchto látek do vzorku vzrostlo  $pH$  o více než 40 % (malonát) a více než 20 % (YC-TETRA), což znehodnocuje výsledky

Tabulka 4.4: Souhrn výsledků AP-testu s použitím různých typů inhibitorů.

vzorek	$pH_{10}$	$pH_{20}$	$AP_{10}$	$AP_{20}$
bez inhibitoru	4.21	3.77	2.09	2.53
IAA	4.16	4.16	2.14	2.14
glukosamin	4.25	4.09	2.05	2.21
malonát	4.27	5.68	2.03	0.62
YC-TETRA	4.22	5.26	2.08	1.04



Obrázek 4.6: Průběhy AP-testů s použitím různých typů inhibitorů.

AP-testu těchto vzorků. Zásaditá povaha malonátu, která se projevila zvýšením  $pH$  vzorku po jeho přidání, odpovídá inhibujícím vlastnostem této látky. Malonát totiž blokuje přeměnu sukcinátu na fumarát, která v rámci citrátového cyklu probíhá v mitochondriální matrix, kde je cca  $pH = 8$ .

Z průběhu křivek AP-testu po přidání glukosaminu a IAA v desáté minutě měření je vidět, že tyto látky nezměnily bezprostředně  $pH$  vzorku jako předchozí látky. Další změny  $pH$  v průběhu testu jsou skutečným projevem metabolismu v podobě acidifikace vnějšího prostředí na přidání xenobiotika.

Po přidání glukosaminu vzorek vykazuje téměř nulovou acidifikaci, jinými slovy buňky nereagují na přidání vnějšího substrátu v podobě glukosy. Tomuto výsledku neodpovídá stále relativně vysoká hodnota  $AP_{20} = 2.21$  tohoto vzorku, která je zkrácena spontánní acidifikací v prvních deseti minutách měření. Průběh AP-testu s glukosaminem dobře odpovídá charakteru působení tohoto inhibitoru na buňku.

Glukosamin je látka velmi podobná glukose, liší se pouze změnou hydroxylové skupiny (OH) na uhlíku 2 za skupinu  $NH_2$ . Tato chemická podobnost činí glukosamin tzv. kompetitivním inhibitorem glukosy při její fosforylaci (první reakce glykolýzy). Metabolická dráha glukosy je tím pádem zablokována hned na začátku, což se v konečném důsledku projeví nulovou acidifikací vnějšího prostředí. Jak již bylo řečeno a z grafu je vidět, byla zaznamenána malá změna  $pH$  po přidání glukosaminu a to o cca 4%. To lze vysvětlit způsobem přidání této látky do vzorku. Nejprve byla buňkám nadávkována glukosa a teprve po cca 20 – 25 sekundách glukosamin. Během této doby zřejmě došlo k difuzi části glukosy do buněk a spuštění glykolýzy ještě před přidáním inhibitoru.

Výsledky AP-testu s IAA uvedené v tabulce 4.4 ukazují, že buňky po prvních deseti minutách dosáhly spontánní acidifikací  $pH_{10} = 4.16$  a tato hodnota  $pH$  byla stejná i na konci měření po dvaceti minutách. To je ostatně vidět i na uvedeném obrázku 4.6, graf křivky se však vyznačuje razantními změnami  $pH$  ve svém průběhu. Po přidání glukosy následuje pokles  $pH$  až na minimum  $pH = 3.7$ , tato hodnota je srovnatelná s konečnou hodnotou  $pH_{20}$  na konci referenčního měření. Poté následuje netypický nárůst  $pH$  až na konečnou zmiňovanou hodnotu  $pH_{20} = 4.16$ . Tento průběh je pravděpodobně způsoben pomalým pronikáním IAA do buněk, který se projeví opožděným zastavením acidifikace.

Měření AP-testů s použitím různých inhibitorů v jejich průběhu ukázala, že xenobiotické látky mohou zásadním způsobem ovlivnit metabolismus buněk, což se projeví na průběhu či výsledcích testu. Výsledky naznačují, že glukosamin a IAA jsou vhodnými látkami pro zastavení acidifikace, za tímto účelem by měly být aplikovány před přidáním glukosy do media a IAA navíc s větším časovým předstihem. Tato vlastnost glukosaminu se dobře hodí pro analýzu vlivu rozptylu na kvasničných buňkách na absorpční spektrum látky citlivé na  $pH$ , čehož však nebylo z časových důvodů v další kapitole využito.

Malonát a YC-TETRA ovlivňují průběh AP-testu svou zásaditou povahou, čili vliv na vitalitu kvasnic není zřejmý. Pro další studium vlivu těchto látek se nabízí několik úprav navrženého experimentu, např. úprava  $pH$  chemické látky před přidáním do vzorku.

## Závěry kapitoly

V této kapitole byly provedeny experimenty, jež měly ověřit využitelnost optimalizovaného AP-testu na vzorcích kvasnic použitých v průmyslovém provozu. Za tímto účelem byl pomocí AP-testu sledován vliv opětovného nasazení kvasnic na jejich vitalitu. Z experimentálních výsledků je zřejmý pokles vitality se zvyšujícím se počtem nasazení až o 13 % mezi kvasnicemi z propagace a počtvrté nasazenými kvasnicemi (viz obrázek 4.1).

Měření simulující působení osmotického stresu na buňky v podobě různých osmotických tlaků vyvolaných použitím alkoholického cukru sorbitolu naznačují, že osmotický tlak působící dlouhodobě při fermentaci buněk v mladině nemá na vitalitu buněk vliv, projevuje se pouze takzvaný akutní účinek. Akutní účinek se na vitalitě projevil při hladovění buněk v hypertonickém prostředí. Potvrzuje se tak, že mladina má ochranný vliv na kvasničné buňky při působení zvýšeného osmotického tlaku, jemuž jsou vystaveny např. při výrobě piva vyšší stupňovitosti.

Byl ověřen vliv vybraných xenobiotik na průběh a výsledky AP-testu. Ukázalo se, že látky IAA a malonát jsou vhodné pro zablokování acidifikace.

# Kapitola 5

## Bezkontaktní měření $pH$

V předchozích dvou kapitolách byla popsána optimalizace metody AP-testu a byla ukázána jeho využitelnost při studiu vitality průmyslově nasazených vzorků či při reakci kvasnic na různé stresové faktory. Měření  $pH$  bylo bez výhrad prováděno klasickou elektrochemickou sondou. To přináší některé nevýhody, jak již bylo zmíněno dříve. Z těchto důvodů se nabízí použití bezkontaktního měření  $pH$  použitím  $pH$ -senzitivních látek a fotometrickým snímáním vzorků. Jedním z úkolů této práce bylo ověřit použitelnost těchto měření, která nejsou limitována množstvím vzorku, navíc je při nich  $pH$  měřeno z celého objemu vzorku a umožňují principiálně měřit více vzorků současně.

Spektrometrická měření kvasničných suspenzí (používaných při AP-testu) však přináší jiné nevýhody a to především problémy s vysokou absorbcí a vlivem mnohonásobného rozptylu na měřené spektrum. V těchto vzorcích jsou rozptylovými centry celé buňky a jednotlivé organely a vzhledem k jejich charakteristickým velikostem se používá popis Mieova rozptylu. Ten je však přesný pro koule s homogenním rozložením indexu lomu. Buňky (konkrétně kvasinky) jsou však objekty různých tvarů a mají složitou vnitřní strukturu, čímž se stává obecný popis úhlové charakteristiky rozptylu na těchto vzorcích velmi složitý. Rozptylu světla na buněčných suspenzích se běžně využívá např. k měření růstových křivek kvasinek sledováním změn intenzity pod daným úhlem.

V této práci konkrétně jsou naměřená kombinovaná spektra (viz obrázek 5.9 nebo 5.11) tvořena rozptylující složkou v podobě separonu nebo suspenze kvasnic a absorbující složkou v podobě  $pH$  citlivé látky. Cílem je z takového spektra extrahovat část patřící  $pH$ -indikátoru a z něj určit  $pH$  suspenze. Za tímto účelem bylo nutné nejdříve nalézt vhodný  $pH$ -indikátor, naměřit jeho spektrální charakteristiku a určit vhodnou koncentraci pro měření s rozptylujícími částicemi. Stejně tak bylo nutné naměřit spektroskopické vlastnosti rozptylující části vzorku (buněk kvasnic) především s ohledem na koncentraci, která ovlivňuje mnohonásobný rozptyl. Koncentrace obou látek navíc musela být taková, aby absorpce vzorku byla pod třemi absorpčními jednotkami - maximální citlivostí spektrometru.

Jak bylo napsáno dříve, absorpční spektrum barviva je složeno za dvou částí (alkalické a acidické dle vztahu 1.3), označme ho jako  $A_{BCC}(\lambda)$ . Je ovlivněno přidáním rozptylujících center do vzorku (např. kvasnice nebo separon), jejich absorpcí

označme jako  $A_{\text{rozptyl}}(\lambda)$ . Dohromady tato dvě spektra dají spektrum výsledné, které měříme, označme ho jako  $A(\lambda)$ . Při nízkých koncentracích rozptylujících center platí, že  $A_{\text{rozptyl}}(\lambda)$  je úměrná koncentraci rozptylových center a celková absorpce vzorku  $A(\lambda)$  je dána součtem absorpce rozptylující částí vzorku a absorbující částí vzorku:

$$A(\lambda) = A_{\text{rozptyl}}(\lambda) + A_{\text{BCG}}(\lambda). \quad (5.1)$$

Tento vztah však neplatí pro vyšší koncentrace rozptylujících částic a vliv rozptylu na spektra je komplexní. Nedochozí tak pouze ke zvýšení hodnot absorpce v důsledku rozptylu, ale také k celkovému zploštění absorpčního spektra.

Další postup pro získání  $pH$  z naměřeného spektra tedy spočívá v odečtení rozptylové složky spektra ( $A_{\text{rozptyl}}(\lambda)$ ) od celkového spektra  $A(\lambda)$  a nalezení funkce, která jednoznačně přiřadí spektru  $A_{\text{BCG}}(\lambda)$  hodnotu  $pH$ . Za tímto účelem zavedme parametr  $R$ , který vypočteme z naměřeného spektra, a ten bude proměnnou funkce  $pH(R)$ .

Výpočet parametru  $R$  ze spektra  $A_{\text{BCG}}(\lambda)$  lze provést mnoha způsoby, např. rozložením kombinovaného spektra do jednotlivých složek (rozptylující část, alkalická část BCG a acidická část BCG) a z nich pak určit  $R$  (kombinací rovnic 5.1 a 1.3, více v [3]) nebo vypočtením plochy pod křivkou spektra, která se mění s  $pH$ . Druhý způsob je použit v této práci.

### Výpočet parametru $R$

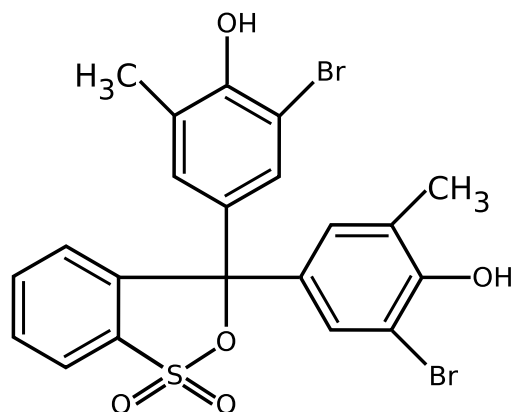
V této práci je tedy parametr  $R$  vypočten z plochy pod křivkou daného absorpčního spektra barviva. Pro tento parametr jsou důležité následující předpoklady: nezávislost na koncentraci barviva ve vzorku a jednoznačné přiřazení  $R$  (resp.  $pH$ ) danému spektru.

První předpoklad je splněn při použití normovaných spekter a nízkých koncentracích BCG ve vzorku (do  $1 \mu\text{M}$  koncentrace roztoku BCG, jak je určeno na straně 58). Druhý předpoklad pro takto zavedený parametr je také splněn, podrobnosti na straně 60.

Spektra barviva je tedy nutné normovat a to na absorpenci na vlnové délce isobestického bodu (viz dále) kvůli nezávislosti jejich průběhu na koncentraci (v případě BCG se jedná o  $\lambda = 512 \text{ nm}$ ). Integrací normovaného spektra pak získáme parametr  $R$ . Integrační meze byly zvoleny v rozsahu vlnových délek  $\lambda = 400 \text{ nm}$  až  $\lambda = 750 \text{ nm}$ . Na vlnové délce  $\lambda = 400 \text{ nm}$  je totiž vedlejší maximum alkalické složky BCG a na vlnové délce  $\lambda = 750 \text{ nm}$  již barvivo neabsorbuje, což je významné při zpracování kombinovaných spekter. Výpočet  $R$  tedy:

$$R = \int_{400}^{750} \bar{A}_{\text{BCG}}(\lambda), \quad (5.2)$$

kde  $\bar{A}_{\text{BCG}}(\lambda)$  je absorpční spektrum samotného barviva normované na absorpenci na vlnové délce  $\lambda = 512 \text{ nm}$ .



Obrázek 5.1: Strukturální vzorec  $pH$  indikátoru bromocresol purple (BCP).

## 5.1 Volba barviva a jeho citlivost na $pH$

Volbu  $pH$  citlivé látky je nutné provést především s ohledem na rozsah  $pH$ , pro který lze spektroskopicky detekovat změny v absorpci. V této práci byly na doporučení Karla Siglera. ověřeny vlastnosti dvou  $pH$  indikátorů a to Bromocresol purple - BCP a Bromocresol green - BCG, vzhledem k jejich vlastnostem: nepronikají přes cytoplasmatickou membránu kvasinek a nejsou adsorbovány jejich povrchem (v případě BCG byla tato vlastnost ověřena experimentálně, viz strana 59).

Charakteristická absorpční spektra těchto dvou látek v závislosti na  $pH$  roztoku jsou na obrázcích 5.2 a 5.5.

### 5.1.1 Bromocresol purple

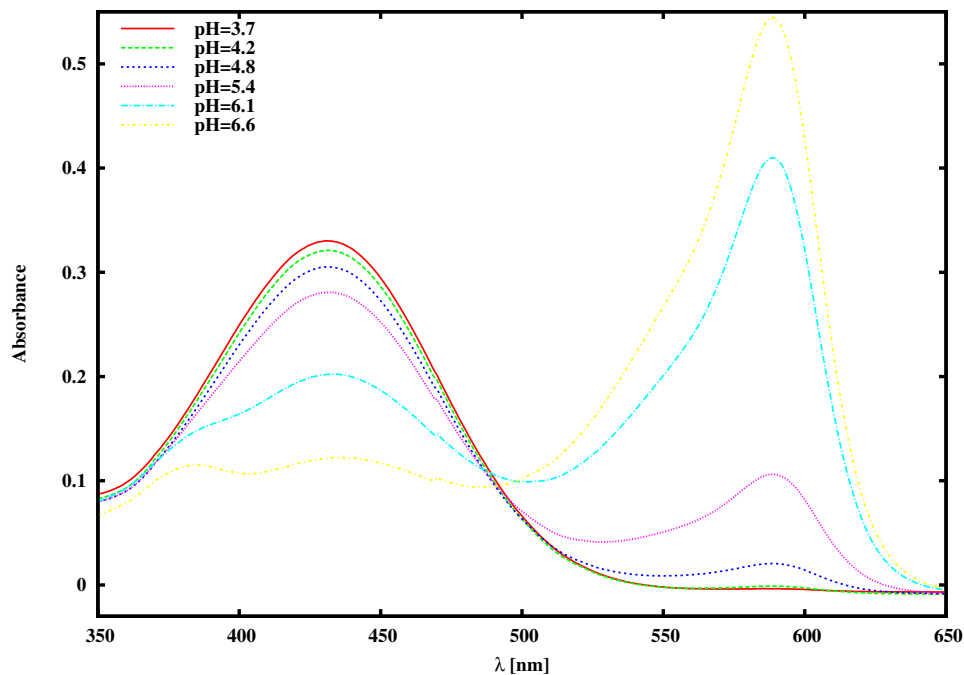
Tato látka má chemický vzorec  $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$  a váha jednoho molu této látky činí 540.223 g. Strukturální vzorec molekuly je na obrázku 5.1.

Na obrázku 5.2 jsou vynesena absorpční spektra roztoků BCP při různých  $pH$ . Z grafů je zřejmé, že spektrum BCP má dvě hlavní maxima na vlnových délkách  $\lambda = 431 \text{ nm}$  a  $\lambda = 588 \text{ nm}$  odpovídající absorpci acidické a alkalické formy této látky (dle rovnice 1.3).

$pH$  roztoků bylo upravováno pomocí 0.1 M NaOH a HCl. Naměřená spektra nejsou korigovaná na změny koncentrace zásobního roztoku, z tohoto důvodu se křivky neprotínají v jediném bodě - isobestickém.

Absorpční spektra tzv. „čistých“ forem (čili pouze alkalické a pouze acidické složky) této látky nebyla naměřena.

K určení vhodnosti barviva BCP pro použití při metodě AP-testu bylo nutné kvantifikovat jeho spektrální citlivost při změnách  $pH$ . Za tímto účelem je z obrázku 5.2 vynesena závislost absorpčních maxim  $\lambda = 431 \text{ nm}$  a  $\lambda = 588 \text{ nm}$  na hodnotě  $pH$ , průběh této závislosti je na obrázku 5.3. Z těchto grafů lze určit, že změna maxim absorbance při změně  $pH$  v rozsahu 3.5 – 5.0 činí cca 8 % resp. 19 %. Zmiňovaný rozsah  $pH$  je významný při metodě AP-testu (přesněji  $pH = 3.6 - 5.3$ ). Vzhledem k tomu,



Obrázek 5.2: Závislost absorbance roztoku BCP v destilované vodě na  $pH$  (nekorigované spektrum).

že změny hodnot absorpčních maxim jsou v tomto rozsahu relativně malé, tato látka není vhodná pro bezkontaktní měření změn  $pH$  při metodě AP-testu.

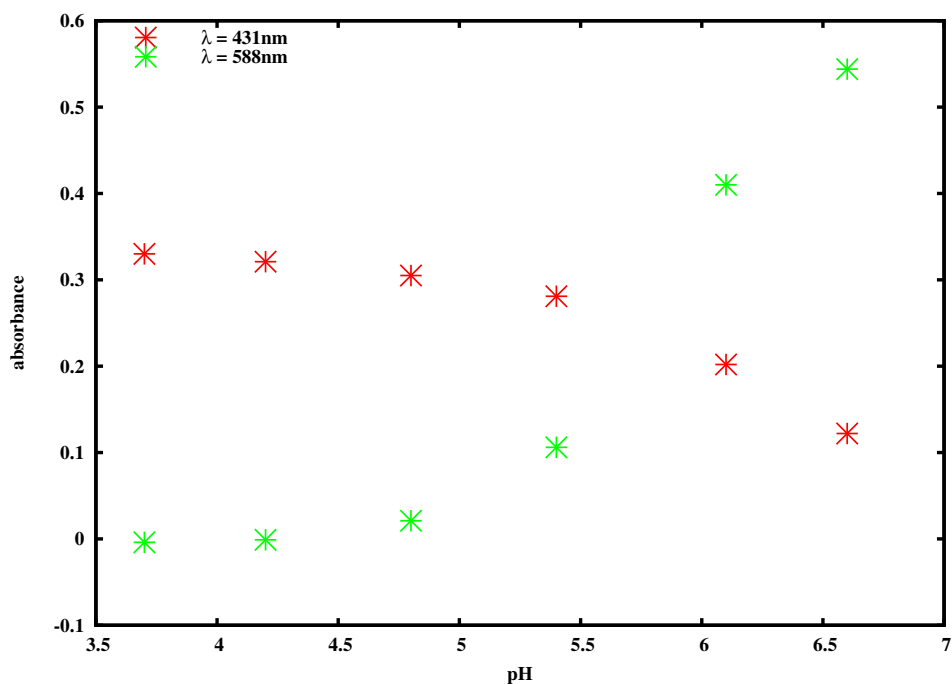
Analogickou analýzu jsme provedli pro barvivo BCG.

### 5.1.2 Bromocresol green

Tento  $pH$  indikátor má chemický vzorec  $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$  a váha jednoho molu této látky činí 698.02 g. Strukturní vzorec molekuly je na obrázku 5.4.

Stejně jako v případě barviva BCP byla naměřena závislost absorpčního spektra roztoku BCG při změnách  $pH$  (viz obrázek 5.5). K tomuto měření byl připraven roztok o složení 50 ml pufru (citrát-fosfátový) + 150  $\mu l$  BCG, jednalo se tedy o 0.43  $\mu M$  roztok (0.003 % koncentrace, ta byla zvolena na základě proměřených závislostí viz stránka 57).  $pH$  bylo upravováno pomocí 0.1 M roztoku NaCl a HCl. Celkové množství přidané kyseliny resp. zásady bylo minimální (relativní změna koncentrace BCG v roztoku v řádu procent) a tudíž nebylo nutné spektra korigovat.

V naměřených spektrech (viz obrázek 5.5) lze rozlišit dvě hlavní maxima na vlnových délkách  $\lambda = 450$  nm a  $\lambda = 620$  nm, z nichž každé patří jedné ze dvou složek tohoto barviva: acidické, která má maximum na vlnové délce  $\lambda = 450$  nm, a alkalické, která má maximum na vlnové délce  $\lambda = 620$  nm. Každá absorpční křivka se skládá z těchto dvou částí.



Obrázek 5.3: Závislost absorbance absorpčních maxim (431 nm a 588 nm) barviva BCP na  $pH$ .

Tzv. spektra „čistých“ forem této látky (čili pouze acidické a alkalické složky) lze naměřit při krajních hodnotách  $pH$  v čisté kyselině nebo zásadě a jsou vynesena spolu s ostatními spektry do obrázku 5.5.

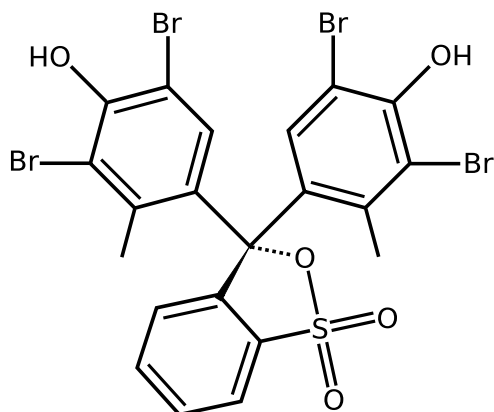
Na vlnové délce  $\lambda = 400\text{nm}$  je pak zřetelné další maximum, které je vedlejším maximem alkalické složky této látky. Jeho intenzita je i pro  $pH = 12$  (při tomto  $pH$  se BCG vyskytuje pouze v alkalické formě, viz obrázek 5.5 nebo 5.7) vůči hlavnímu maximu o řád menší a pro naše účely má druhořadý význam.

Spektra na obrázku 5.5 se setkávají v jediném místě, které se nazývá *isobestický bod*. Ten je charakteristický tím, že na vlnové délce odpovídající tomuto bodu (v našem případě  $\lambda = 512\text{nm}$ ) je absorbance obou forem barviva BCG stejně intenzivní a tudíž je hodnota absorbance v tomto bodě nezávislá na hodnotě  $pH$ .

Informaci o tom, zda je tato  $pH$ -senzitivní látka vhodná pro měření změn  $pH$  z pohledu AP-testu (charakteristické změny  $pH$  při testu činí 3.6 – 5.3) získáme vynesáním hodnot absorbance maxim ( $\lambda = 450\text{nm}$  a  $\lambda = 620\text{nm}$ ) v závislosti na  $pH$ . Tak je učiněno na obrázku 5.6. Pro kontrolu je v tomto grafu vynesena absorbance isobestického bodu ( $\lambda = 512\text{nm}$ ), která by se teoreticky neměla při změně  $pH$  roztoku měnit, čemuž hodnoty odpovídají. Změny absorbancí obou hlavních maxim při změnách  $pH$  v rozsahu 3.6 – 5.3 činí cca 79 % a 92 %. Tyto změny v absorpčním spektru činí změny  $pH$  detekovatelnými a barvivo Bromocresol green vhodným pro další použití.

Další informací, kterou můžeme získat z obrázku 5.6 je hodnota  $pK_a$ . Po přidání barviva do vodného roztoku dojde k jeho disociaci a vyskytuje se tak ve dvou formách,





Obrázek 5.4: Strukturní vzorec  $pH$  indikátoru bromocresol green (BCG).

acidické a alkalické, které lze spektroskopicky odlišit (viz rovnice 1.3). Rovnovážné zastoupení těchto dvou složek v roztoku nastává při určitém  $pH$ , které se značí  $pK_a$  a nazývá se *disociační konstanta* [5]. Hodnotu  $pK_a$  získáme z inflexe křivek absorpčních maxim na obrázku 5.6 a činí  $pK_a = 4.33 \pm 0.03$ <sup>1</sup>. Tato hodnota se liší oproti hodnotě uváděné v literatuře,  $pK_a = 4.7$ .

### 5.1.3 Koncentrační citlivost barviva

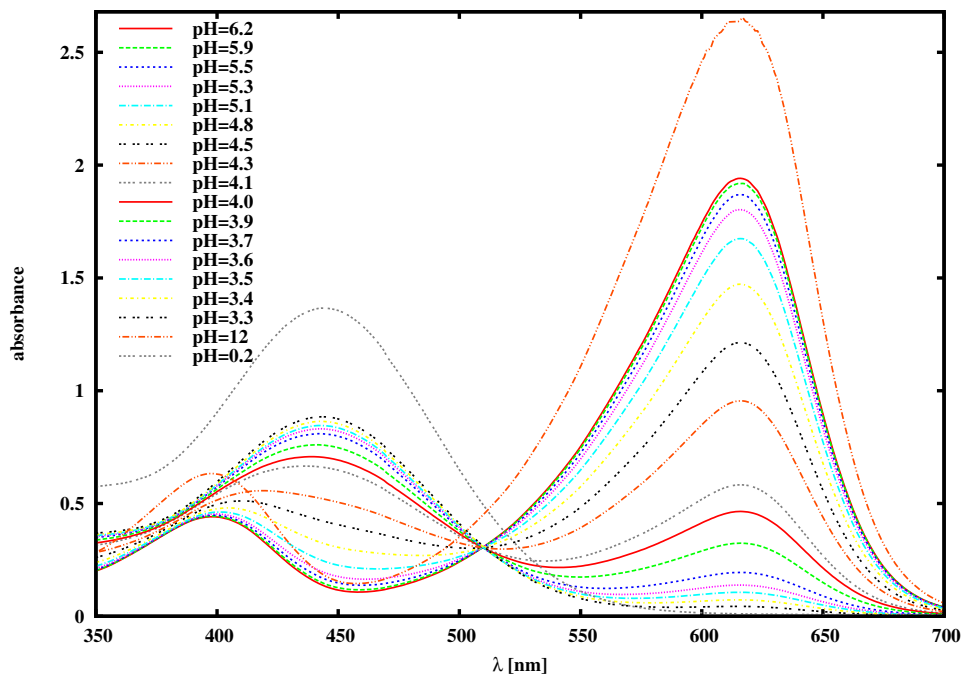
V předchozích odstavcích jsme provedli analýzu spekter BCG, nyní ještě zbývá proměřit, jak koncentrace tohoto barviva v roztoku ovlivňuje hodnotu absorbance, neboli do jaké míry je závislost absorpce lineární s koncentrací dle vyjádření Lambertova-Beerova zákona z rovnice 1.6:  $A = \epsilon_{10}cl$ .

Měříme-li kombinované spektrum obsahující absorbující látku - barvivo a rozptylující složku - kvasnice (viz např. obrázek 5.11), je snahou použít takovou koncentraci barviva aby bylo ve spektru rozlišitelné a tudíž aby z něj bylo možné určit  $pH$  vzorku. Při vysokých koncentracích barviva však přestává platit charakteristika Lambertova-Beerova zákona nebo se můžeme přiblížit na hranici absorbance rozlišitelné použitým spektrometrem (tři jednotky absorbance v případě našeho spektrometru). Je tedy nutné znát maximální použitelnou hodnotu koncentrace barviva v roztoku.

Za účelem jejího zjištění jsme proměřili závislost absorbance na koncentraci použitého barviva BCG v roztoku pufru při konstantním  $pH = 3.64$  (viz obrázek 5.7A) a při  $pH = 12.0$  (viz obrázek 5.7C). Hodnota  $pH = 3.64$  je minimální hodnotou, kterou dosáhnou kvasinky acidifikací při AP-testu. Při hodnotě  $pH = 12.0$  se barvivo BCG v roztoku vyskytuje pouze v alkalické formě a tudíž se ve spektru projeví pouze hlavní maximum na vlnové délce  $\lambda = 620$  nm a vedlejší maximum na vlnové délce  $\lambda = 400$  nm.

Pro měření koncentrační závislosti při  $pH = 3.64$  byl připraven roztok o 50 ml pufru (citrát-fosfátový) + 20  $\mu\text{l}$  HCl (0.1 M roztok) a postupně do něj bylo přidáváno BCG po 50  $\mu\text{l}$  dávkách.

<sup>1</sup>Hodnota byla určena proložení křivky sigmoidální závislostí v programu gnuplot.



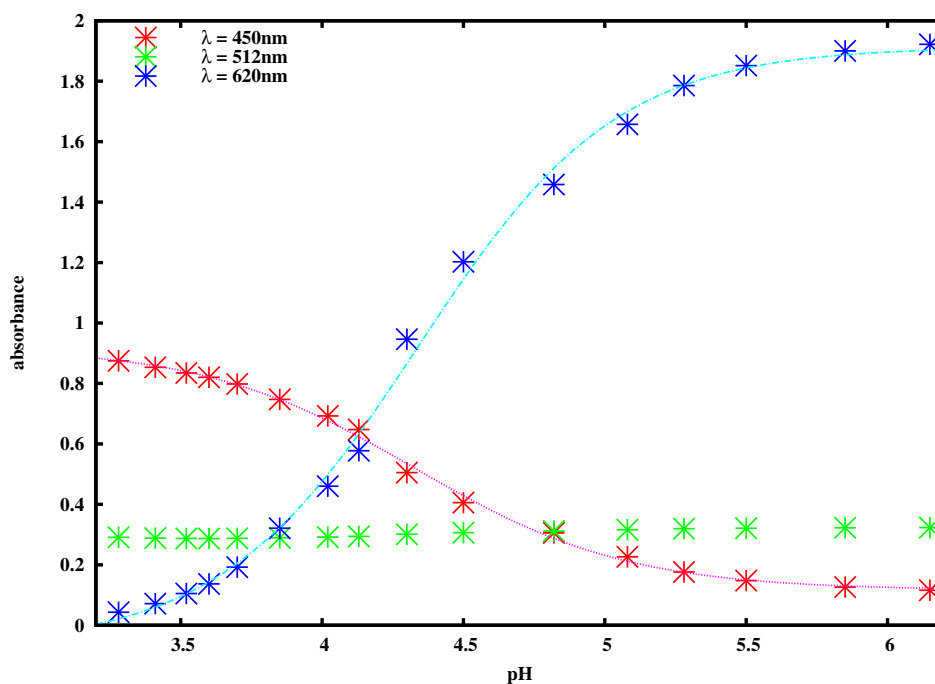
Obrázek 5.5: Závislost absorbance  $0.43 \mu\text{M}$  roztoku BCG na  $pH$  v citrát-fosfátovém pufru. Na obrázku jsou také absorpční křivky tzv. „čistých“ forem barviva v samotné kyselině ( $pH = 0.2$ ) a zásadě ( $pH = 12$ ) a byly naměřeny na  $0.57 \mu\text{M}$  roztoku. Mají téměř shodný průběh jako křivky odpovídající  $pH = 3.3$  a  $pH = 6.2$ , proto nebyly pro přehlednost obrázku korigovány na koncentraci.

Ve druhém případě byl připraven roztok 50 ml NaOH o  $pH = 12.0$  a do něj přidáváno BCG. V obou případech bylo BCG dávkováno do dosažení hodnoty maxima absorbance 2.5 absorpčních jednotek, kdy se blíží hranice detekovatelnosti použitého spektrometru.

Z naměřených hodnot byly dále vyneseny závislosti absorpčních maxim (na vlnové délce  $\lambda = 450 \text{ nm}$  resp.  $\lambda = 620 \text{ nm}$ ) na koncentraci barviva BCG, viz obrázky 5.7B a 5.7D. Ze závislostí vynesených dat vyplývá, že závislost absorpčního maxima  $\lambda = 450 \text{ nm}$  resp.  $\lambda = 620 \text{ nm}$  lze považovat za lineární až do cca 2.5 absorpčních jednotek, což odpovídá koncentraci cca  $1.4 \mu\text{M}$ .

### Závislost parametru $R$ na koncentraci BCG

Neméně důležitá je závislost (přesněji řečeno nezávislost) parametru  $R$  (viz rovnice 5.2), důležitého pro vypočtení  $pH$  z naměřeného spektra, na koncentraci barviva ve vzorku. Tato závislost byla naměřena a z výsledných hodnot vyplývá, že parametr  $R$  lze považovat nezávislým na množství BCG ve vzorku do koncentrace cca  $1 \mu\text{M}$ , při vyšších koncentracích klesá hodnota  $R$  o 6% a více. Jinými slovy, určení hodnoty  $pH$  z naměřeného spektra barviva je nezávislé na jeho koncentraci při použití maximálně  $1 \mu\text{M}$  roztoku, což bylo vždy splněno. Data nejsou publikována.



Obrázek 5.6: Závislost absorbance záření o vlnových délkách 450 nm, 512 nm a 620 nm v 0.43  $\mu$ M roztoku barviva BCG na  $pH$ .

Tabulka 5.1: Absorbance roztoku BCG před a po 6 hodinovém míchání se vzorkem kvasnic.

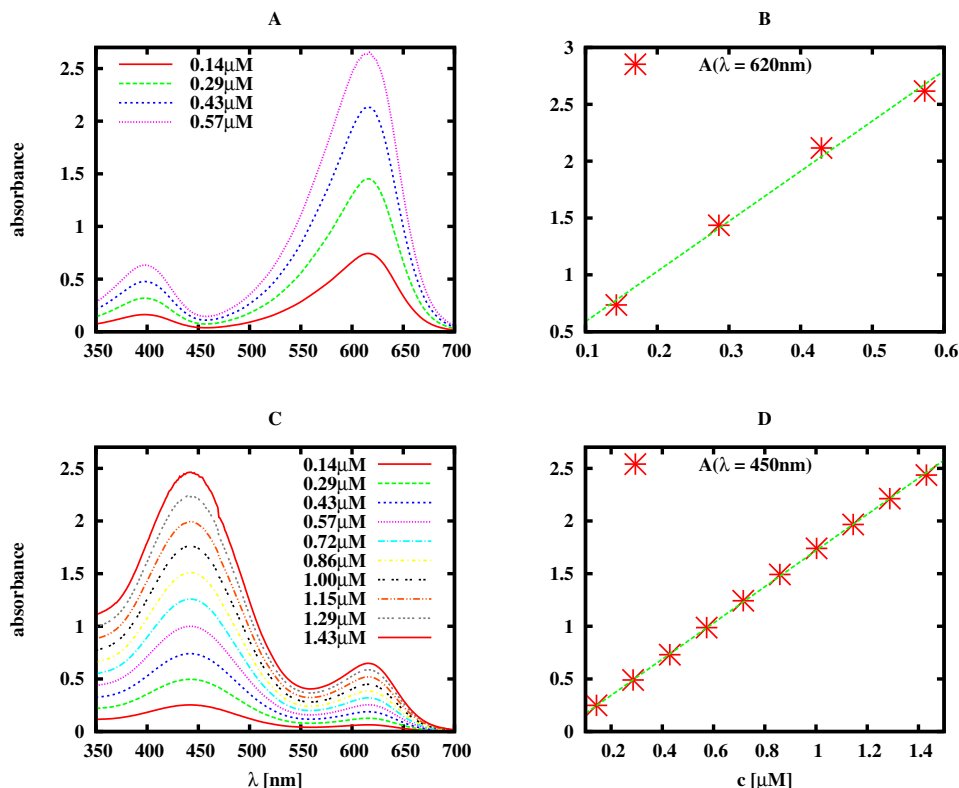
$\lambda$	před	po
512	0.389	0.385

### 5.1.4 Interakce BCG s kvasnicemi

Barvivo BCG bylo zvoleno s ohledem na své vlastnosti. Je významně spektrálně citlivé v oblasti  $pH = 3.6 - 5.3$  a neinteraguje s buňkami kvasnic. První vlastnost jsme experimentálně ověřili (viz předchozí odstavce), druhou vlastnost jsme ověřili následujícím pokusem.

Bylo naměřeno absorpční spektrum roztoku BCG v pufru (20 ml 0.5 M citrát-fosfátový). Poté byly do tohoto vzorku přidány kvasnice (0.3 g, kvasnice připraveny dle optimalizovaného postupu na straně 39) a vzorek míchán po 6 h, následovalo odstředění na 3000 ot/min po dobu 20 min a naměření dalšího spektra supernatantu.

Z výsledných hodnot v tabulce 5.1 je vidět, že pokles absorbance na vlnové délce  $\lambda = 512$  nm (hodnota isobestického bodu BCG) činí po šesti hodinách míchání 1%, což je zanedbatelná změna. Můžeme tedy předpokládat, že barvivo BCG neinteraguje s buňkami.



Obrázek 5.7: Charakterizace spekter roztoků BCG při různých koncentracích a hodnotách  $pH$ . Obrázek A: závislost absorbance roztoku BCG o různých koncentracích při konstantním  $pH = 3.64$ . Obrázek B: z obrázku A vynesená závislost absorbance na vlnové délce 450 nm na koncentraci roztoku. Obrázek C: závislost absorbance roztoku BCG o různých koncentracích při konstantním  $pH = 12.0$ . Obrázek D: z obrázku C vynesená závislost absorbance na vlnové délce 620 nm na koncentraci roztoku.

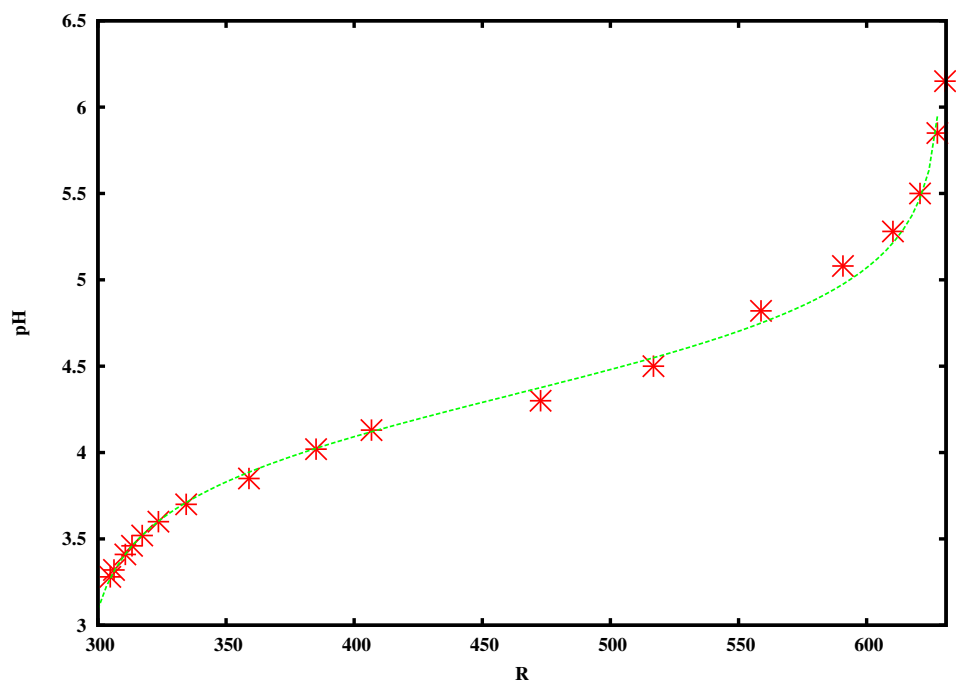
### 5.1.5 Výpočet $pH$ ze spektra BCG

Jak již bylo řečeno dříve, z každého absorpčního spektra můžeme vypočít hodnotu parametru  $R$  (dle rovnice 5.2), tato hodnota (za dodržení předpokladu nízkých koncentrací) je nezávislá na koncentraci barviva a závisí pouze na  $pH$  roztoku.

Důležitým krokem nyní je nalézt kalibrační křivku závislosti  $pH(R)$  a na jejím základě poté přidělit naměřenému spektru vzorku správné  $pH$ . Za tímto účelem byly vyneseny hodnoty koeficientu  $R$  jednotlivých spekter z obrázku 5.5 v závislosti na  $pH$  naměřeném klasickou elektrodou, viz obrázek 5.8. Tyto hodnoty byly proloženy teoretickou závislostí parametru  $pH(R)$  ve tvaru:

$$pH(R) = a + b \cdot \ln \left( \frac{c - R}{R - d} \right) \quad (5.3)$$

Zvolený tvar závislosti vychází z disociační rovnice.



Obrázek 5.8: Závislost parametru  $R$  vypočteného z absorpčních spekter roztoků BCG při různých  $pH$  z obrázku 5.5

Výsledné parametry proložení křivky a jejich chybami jsou:

parametr	hodnota	relativní chyba
$a$	$4.334 \pm 0.021$	0.5 %
$b$	$0.315 \pm 0.007$	2.3 %
$c$	$293.6 \pm 2.3$	0.8 %
$d$	$629.6 \pm 0.1$	0.02 %
$\overline{\chi^2}$	0.003	

Nyní jsme tedy schopni na základě funkce 5.3 určit  $pH$  libovolného roztoku BCG na z jeho absorpčního spektra. To bylo také provedeno na vzorcích obsahujících nejen barvivo, ale i rozptylující složku.

## Závěry

Pro bezkontaktní měření  $pH$  bylo vyloučeno barvivo BCP a zvoleno barvivo BCG, které dobře spektrálně reaguje na změny  $pH$  v požadované oblasti významné pro metodu AP-testu ( $pH = 3.6 - 5.3$ ). Byla naměřena závislost hodnot absorbance v hlavních maximech a hodnot parametru  $R$  na změnách koncentrace barviva BCG za účelem nalezení oblasti platnosti předpokladů rovnice 5.1. Odtud vyvozená maximální použitelná koncentrace pro měření spekter, která činí  $1 \mu\text{M}$ .

Byla parametrizována kalibrační křivka přiřazující hodnotu  $pH$  parametru  $R$  určenému z absorpčního spektra BCG (viz rovnice 5.3 a 5.2). Dále bylo ověřeno,

že barvivo neinteraguje s buňkami kvasnic a byly vypočteny parametry teoretické závislosti  $pH(R)$ .

Na základě zmíněných výsledků bylo BCG přidáváno do vzorků obsahujících rozptylovou složku, viz další odstavce.

## 5.2 Kombinovaná spektra

Pojmem kombinovaná spektra jsou v této práci myšlena absorpční spektra vzorků, jež obsahují silně absorbující (v našem případě  $pH$ -citlivé barvivo BCG) a silně rozptylující složku, zejména v podobě suspenze kvasnic nebo separonu. Jelikož při měření takového vzorku dochází v důsledku rozptylu ke zkreslení absorpčního spektra barviva, jehož průběh je důležitý pro určení  $pH$  vzorku, bylo naší snahou rozptylovou část ze spektra odečíst.

V případě použití kvasničné suspenze jako vzorku dochází při měření spekter k dalším komplikacím: mnohonásobný rozptyl způsobující nelinearitu závislosti absorpance na koncentraci a spontánní změny  $pH$  vzorku způsobené aktivitou kvasnic. Experiment směřující k nalezení vhodné koncentrace kvasničné suspenze je zpracován dále.

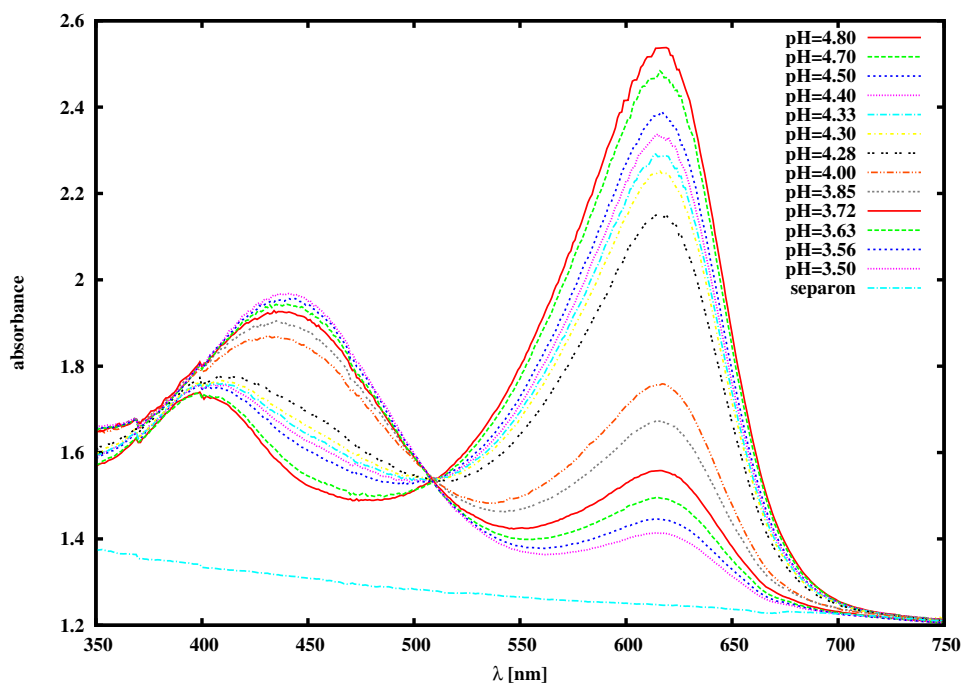
Kvasnice jakožto živé buňky přirozeně reagují na vnější prostředí ať už v něm jsou živiny nebo ne (viz Teorie). Tato reakce se projevuje změnami  $pH$  media. Změny  $pH$  jsou však nežádoucí ve chvíli, kdy máme ověřit kalibraci přiřazení  $pH$  naměřenému spektru. Z toho důvodu jsme hledali možnosti, jak zastavit acidifikaci kvasnic ve vzorku, k tomu se nabízí inhibitory metabolismu použité v kapitole Využití AP-testu (viz stránka 48). Požadavkům zastavení acidifikace dobře odpovídá např. glukosamin, který inhibuje fosforylaci glukosy. K uplatnění inhibitorů k tomuto účelu nakonec z časových důvodů nedošlo.

Další možností jak ověřit kalibraci na vzorku s rozptylující složkou je použití částic majících stejné (nebo podobné) spektrální vlastnosti jako kvasnice a přitom by neovlivňovaly  $pH$  během měření. Jako vhodné se ukazují částice separonu.

### Postup výpočtu $pH$ z kombinovaného spektra

Než-li se pustíme do charakterizace částic separonu, shrňme ve stručnosti postup, jímž z naměřeného kombinovaného spektra získáme informaci o hodnotě  $pH$  vzorku.

- Z naměřeného kombinovaného spektra ( $A(\lambda)$ ) odečteme část patřící rozptylové složce ( $A_{\text{rozptyl}}(\lambda)$ ). Získáme část spektra patřící samotnému BCG ( $A_{\text{BCG}}(\lambda)$ ).
- Spektrum BCG ( $A_{\text{BCG}}(\lambda)$ ) normujeme na hodnotu absorpance na vlnové délce isobestického bodu  $\lambda = 512$  nm.
- Z normovaného spektra BCG ( $\bar{A}_{\text{BCG}}(\lambda)$ ) vypočteme  $R$  dle rovnice 5.2.
- Parametru  $R$  přiřadíme hodnotu  $pH$  dle kalibrace.



Obrázek 5.9: Kombinovaná spektra ( $0.14 \mu\text{M}$  roztok BCG +  $0.5 \text{ g}$  separonu -  $10 \mu\text{m}$ ) v závislosti na  $pH$  vzorku.

### 5.2.1 Separon

Jako rozptylová centra pro modelový rozptyl na kvasnicích byly použity částice separonu (Separon SI VSK). Jedná se o hydrofilní silikagel, který je tvořen částicemi  $\text{SiO}_2$  o průměru  $10 \mu\text{m}$ . Tento materiál se používá jako plnidlo do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) kolon a vykazuje kulovitý tvar s úzkou distribucí velikosti částic, proto je vhodný pro modelování tvaru a velikosti buněk kvasnic (charakteristická velikost buněk *Saccharomyces cerevisiae* činí  $5 - 10 \mu\text{m}$ ). Částice separonu jsou navíc neživé a nemění spontánně  $pH$  vzorku.

Charakteristické absorpční spektrum separonu je zachyceno na obrázku 5.9. Naměřená absorbance klesá s rostoucí vlnovou délkou a neobsahuje žádné maximum. Při měření vzorků obsahujících BCG a separon jsme vždy naměřili i spektrum separonu samotného, které bylo odečítáno od celkového kombinovaného spektra.

Kombinovaná spektra se separonem při různých hodnotách  $pH$  jsou zachycena na obrázku 5.9. Zásobní roztok obsahoval  $80 \text{ ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.5 \text{ g}$  separonu ( $10 \mu\text{m}$ ) a  $60 \mu\text{l}$  BCG ( $0.14 \mu\text{M}$  roztok BCG).  $pH$  vzorku bylo laděno pomocí  $1.5 \text{ M}$  roztoku  $\text{HCl}$ , celkové množství přidané kyseliny bylo cca  $200 \mu\text{l}$ , což způsobilo zanedbatelné změny koncentrace roztoku BCG (v řádu procent) a spektra tak není nutné korigovat.

Změny  $pH$  vzorku se pohybují v rozmezí  $4.8 - 3.5$  ( $pH = 3.5$  je dolní mez  $pH$  dosažitelná kvasnicemi acidifikací). Obrázek 5.9 také obsahuje spektrum samotného separonu (bez BCG), které jasně ukazuje, o kolik je posunuto spektrum BCG (linearita platí při nízkých koncentracích). Barvivo samotné na vlnové délce  $\lambda = 750 \text{ nm}$

Tabulka 5.2: Teoretické hodnoty  $pH$  vypočtené na základě naměřených kombinovaných spekter (se separonem) a naměřené hodnoty  $pH$  získané klasickou elektrodou.

$R$	$pH_{\text{teor}}$	$pH$
579.4	4.88	4.80
567.6	4.80	4.70
552.4	4.71	4.50
535.5	4.63	4.40
518.2	4.55	4.33
515.2	4.54	4.30
497.1	4.47	4.28
410.9	4.14	4.00
391.8	4.06	3.85
367.2	3.93	3.72
357.4	3.88	3.63
342.2	3.77	3.56
331.6	3.69	3.50

již neabsorbují a tudíž hodnota absorpance v tomto bodě odpovídá absorpanci čistě separonu. Díky tomu jsme schopni ze spektra odečíst rozptylující složku (separon) a získat spektrum samotného BCG. Takto získané spektrum poté normujeme na hodnotu absorpance na vlnové délce  $\lambda = 512 \text{ nm}$  (nezávislost na koncentraci) a vypočteme hodnotu parametru  $R$  dle rovnice 5.2. Z parametru  $R$  pak vypočteme  $pH$  dle rovnice 5.3 a výsledky porovnáme s naměřeným  $pH$ . Výsledné vypočtené hodnoty  $pH$  včetně parametru  $R$  a kontrolní hodnoty  $pH$  naměřené klasickou  $pH$  elektrodou jsou v tabulce 5.2.

Z tabulky 5.2 je vidět, že vypočtené a naměřené hodnoty se kolem  $pH = 3.60$  liší až o 8 %. Relativní chyba vypočtené hodnoty  $pH$  z kalibrace je kolem 2.5 % a relativní chyba určení  $pH$  klasickou elektrodou je kolem 1.5 %. Tyto chyby však nekompensují rozdíl mezi oběma hodnotami.

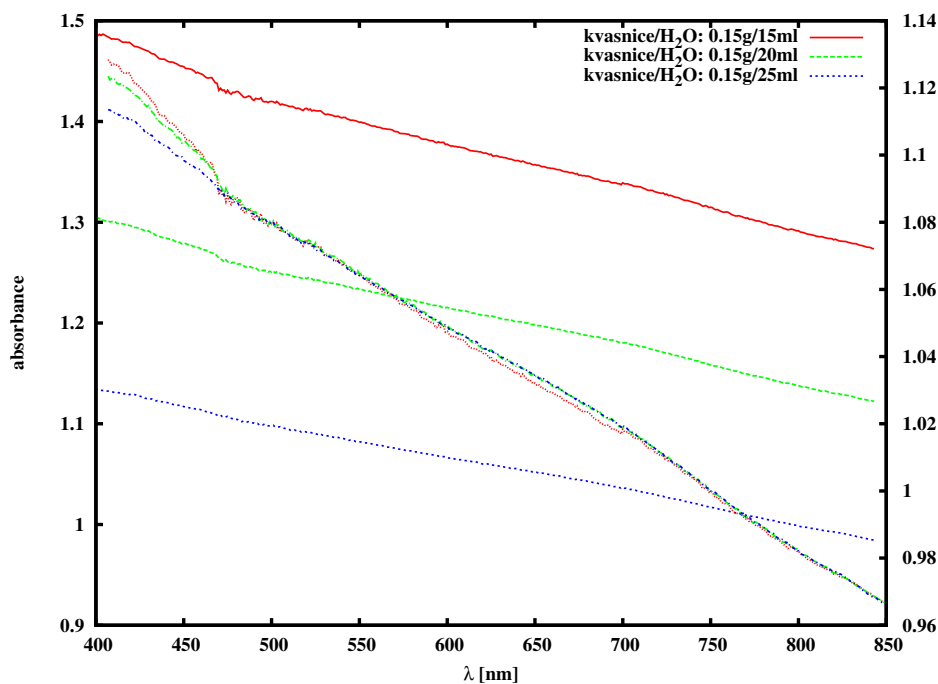
Jak je vidět z grafického vynesení hodnot  $pH$  naměřených elektrodou a teoretických hodnot na obrázku 5.12 (křivka  $S_1$ ), naměřené hodnoty jsou vůči těm teoretickým pouze vertikálně posunuty, průběhy obou závislostí se však shodují. Tento jev byl pozorován i v dalších případech a je diskutován dále.

### 5.2.2 Kvasnice

Jedním z cílů této práce bylo ověřit možnosti bezkontaktního měření  $pH$  na vzorcích kvasničných suspenzí, čehož by bylo možné využít při metodě AP-testu. Za tímto účelem bylo nutné charakterizovat spektra kvasnic.

Při měření optimalizovanou metodou AP-testu pomocí kontaktního měření  $pH$  elektrodou byla použita koncentrace kvasnic 1.5 g/15 ml. Užití této koncentrace přináší některé výhody, např. výsledek testu tak nebyl ovlivněn přesností navážení kvasnic





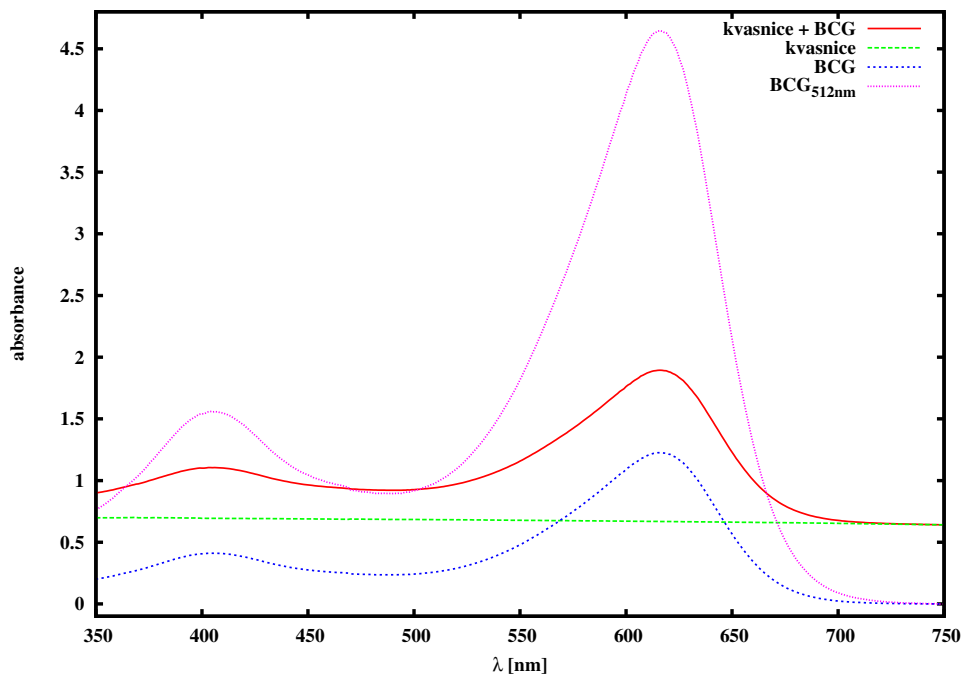
Obrázek 5.10: Závislost absorpce roztoku kvasnic o třech různých koncentracích, včetně normovaných spekter na absorpenci na  $\lambda = 750$  nm.

(viz stránka 37). Při bezkontaktním měření  $pH$  je však použití takto vysoké koncentrace kvasnic nežádoucí kvůli vysoké absorpci vzorku, nic nám však nebrání v použití nižší gramáže kvasnic, je ale nutné dbát na přesnost odvážení kvůli principiálnímu srovnání výsledků různých testů. Další nevýhodou pak je, že acidifikace buněk bude pomalejší a délka testu se tak prodlouží.

Jak již bylo naznačeno výše, z naměřeného kombinovaného spektra vzorku je nutné odečíst rozptylovou složku, v tomto případě spektrum kvasnic. Proto jsme naměřili spektra roztoku kvasnic při různých koncentracích. Výsledné průběhy absorpce jsou zachyceny na obrázku 5.10.

Složení měřeného roztoku bylo: 0.15 g kvasnic na 15 ml, 20 ml a 25 ml pufru. Z obrázku 5.10 je vidět, že maximum absorpce je pod 2 absorpční jednotky, což je v lineární oblasti použitého spektrometru, navíc je třeba počítat s přidáním  $pH$  citlivého barviva, které také absorbuje. Spektrum nemá žádné maximum, se zvyšující se vlnovou délkou se snižuje hodnota absorpce.

Po normování těchto spekter (viz obrázek 5.10) na absorpenci na vlnové délce  $\lambda = 750$  nm je vidět, že naměřená spektra se shodují téměř v celém měřeném rozsahu vlnových délek, čili se neprojevuje vliv mnohonásobného rozptylu, ke kterému však při těchto koncentracích již dochází. Tato shoda normovaných spekter kvasnic při vyšších koncentracích obecně nemusí platit. V žádném z dalších měření ale nebyla vyšší koncentrace použita. Odečtení složky spektra odpovídající rozptylu na kvasnicích by tedy nemělo výrazně změnit tvar absorpčního spektra BCG.



Obrázek 5.11: Kombinované spektrum (kvasnice + BCG) a jeho postupné změny při separaci spektrální složky patřící barvivu.

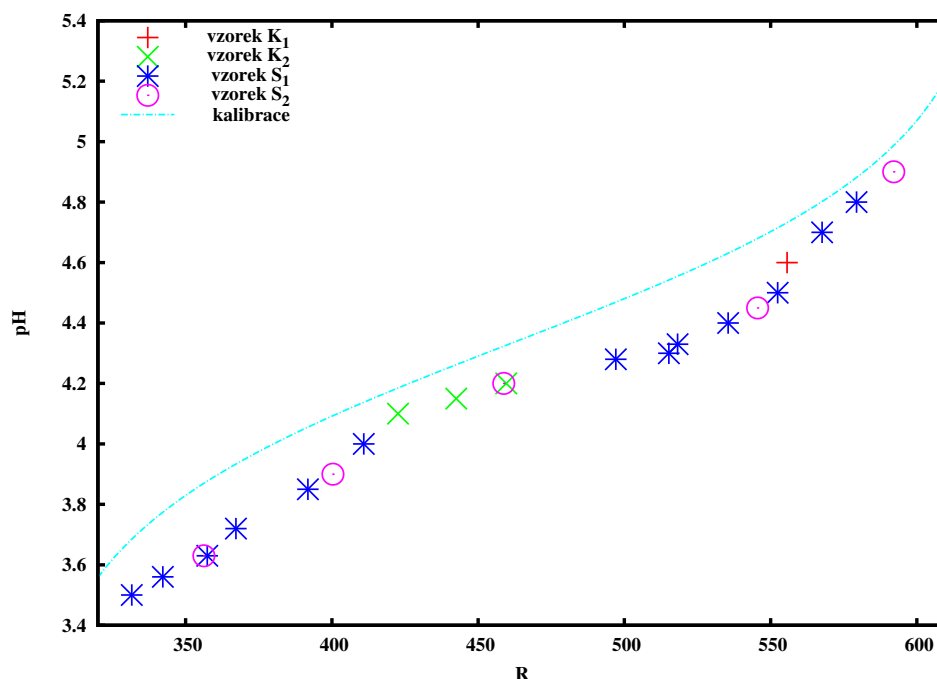
Normovaná spektra se rozcházejí na krátkých vlnových délkách pod  $\lambda = 470$  nm. Při hodnotě  $\lambda = 470$  nm byl zpozorován skok i v jiných naměřených spektrech nezávisle na druhu vzorku. Proto tuto diskontinuitu připisujeme vlastnostem spektrometru, pravděpodobně chybné zařazování filtrů.

Použitá vlnová délka pro normování ( $\lambda = 750$  nm) byla zvolena záměrně, na této vlnové délce totiž barvivo BCG neabsorbuje, čehož lze využít při zpracování kombinovaných spekter.

Pro další měření je tedy vhodné použít koncentraci kvasnic do 0.15 g na 15 ml pufru. Tato relativně nízká gramáž ( $10\times$  nižší než při optimalizované metodě AP-testu) může být obtížná k navážení (vlastní zkušenost). Tato nevýhoda je však kompenzována možností použít k měření více vzorků (paralelní měření) touto metodou.

Jak již bylo řečeno určení  $pH$  z naměřeného kombinovaného spektra vzorku obsahujícího kvasnice a BCG spočívá v izolování části spektra patřící barvivu. Podrobný popis tohoto postupu si ukážeme na následujícím experimentu.

Na obrázku 5.11 je spektrum vzorku obsahujícího 0.04 g kvasnic v 15 ml pufru s přidanými  $30\ \mu\text{l}$  BCG,  $0.29\ \mu\text{M}$  roztok (viz křivka s popisem „kvasnice + BCG“). Tato hmotnostní koncentrace kvasnic ve vzorku (cca 0.3 %) je na úrovni koncentrace zalkvasné dávky používané v pivovarech. I při této relativně nízké hustotě vzorku však dochází k mnohonásobnému rozptylu na buňkách. Použití nižší dávky kvasnic by však nereflektovalo podmínky používané v pivovarech a navíc by byl výsledek značně ovlivněn přesností navážení.



Obrázek 5.12: Souhrnné výsledky naměřených hodnot  $pH$  (klasickou sondou) z kombinovaných spekter vůči kalibrační křivce (teoretické hodnoty). Vzorek  $K_1$ : kvasnice/BCG/pufr 0.04 g/30  $\mu$ l/15 ml (viz měření na obrázku 5.11); vzorek  $K_2$ : 0.1 g/60  $\mu$ l/20 ml; vzorek  $S_1$ : separon/BCG/pufr 0.5 g/60  $\mu$ l/80 ml (viz měření z obrázku 5.9); vzorek  $S_2$ : 0.1 g/60  $\mu$ l/20 ml.

Spektrum na obrázku 5.11 obsahuje část patřící barvivu a část patřící kvasnicím (dle rovnice 5.1). Odečtením spektra samotných kvasnic (viz křivka „kvasnice“) získáme spektrum samotného BCG (viz křivka „BCG“), to je pak nutné normovat na hodnotu absorbance na vlnové délce  $\lambda = 512 \text{ nm}$  (viz křivka „BCG<sub>512 nm</sub>“) a vypočítat parametr  $R$  z plochy pod křivkou (dle rovnice 5.2). Z něj podle kalibrace (rovnice 5.3) určíme  $pH$  vzorku. Tímto postupem byla z naměřených dat vypočtena teoretická hodnota  $pH$  vzorku  $pH = 4.73$ , kontrolně naměřená hodnota klasickou elektrodou činila  $pH = 4.6$ , což činí rozdíl 2.9 %.

Nepřesnost ve vypočtené hodnotě  $pH$  se projevila i při sérii dalších měření při různých koncentracích kvasnic a barviva. Výsledky dalších měření jsou vyneseny spolu s kalibrační křivkou na obrázku 5.12. Jak je z obrázku vidět vypočtené hodnoty  $pH$  z kombinovaných spekter, ať už s kvasnicemi nebo separonem, se neshodují ani v rámci chyby, která v případě teoretických hodnot činí cca 2.5 % a v případě naměřených hodnot (klasická elektrochemická sonda) cca 1.5 %.

## Závěry kapitoly

Bylo vybráno barvivo BCG, jež má vhodnou spektrální citlivost v rozsahu změn  $pH$  významném při metodě AP-testu ( $pH = 3.6 - 5.3$ ). Byla naměřena jeho spektrální

charakteristika, experimentálně ověřen rozsah koncentrací, při kterých je absorbance závislá lineárně na koncentraci a zároveň parametr  $R$  nezávislý na koncentraci. Její maximální hodnota činí  $1 \mu\text{M}$  roztok (0.007 %).

Dále byl zaveden parametr  $R$ , navržen jeho výpočet a parametrizována závislost  $pH(R)$  na základě spekter roztoku samotného barviva (v závislosti na  $pH$ ) z obrázku 5.5. Hodnota statistické veličiny  $\overline{\chi^2}$  zvolené teoretické závislosti ( $pH(R)$ ) činí 0.003, což ukazuje na velmi dobře zvolený tvar modelové funkce. I přes tuto teoretickou shodu se při ověřování metody vyskytly neshodující výsledky.

Byla naměřena kombinovaná spektra se separonem, který je rozměry a tvarem podobný buňkám kvasnic. Vypočtené hodnoty  $pH$  uvedené v tabulce 5.2 se liší od naměřených (při  $pH = 3.60$ ) až o 8 %. Podobných nepřesností dosahují i výsledky dosažené měření kombinovaných spekter s kvasnicemi. Výsledky těchto měření jsou souhrnně uvedeny na obrázku 5.12.

Metoda je pravděpodobně zatížena systematickou chybou, jejíž příčin může být hned několik. Zřejmě se projevuje vliv mnohonásobného rozptylu na spektra a to i při použití řádově různých koncentrací rozptylové složky vzorku - kvasnice nebo separon, viz výsledky měření na obrázku 5.12.

Dalším faktorem ovlivňujícím nepřesnost metody je zkreslení spektra při nízkých vlnových délkách způsobené vlastnostmi spektrometru (cca při vlnové délce  $\lambda = 450 \text{ nm}$  a méně). Značný vliv má také závislost  $pK_a$  konstanty barviva na iontové síle (viz [16]) a způsob výpočtu parametru  $R$ . Při námi zvoleném postupu je sice minimalizována chyba způsobená celkovým zploštěním spekter po přidání rozptylové složky díky normalizaci spekter na hodnotu absorbance na vlnové délce  $\lambda = 512 \text{ nm}$ . Ale deformaci spekter způsobené různým vlivem rozptylové složky (na spektrum barviva) při krátkých a dlouhých vlnových délkách zabráněno není.

Ke kumulaci dalších chyb dochází při normování spekter (BCG na vlnové délce  $\lambda = 512 \text{ nm}$  a separonu resp. kvasnic na  $\lambda = 750 \text{ nm}$ ) kde se promítá chyba naměřené hodnoty absorbance na příslušných vlnových délkách.

# Závěr

V předložené práci se podařilo (v návaznosti na předchozí články [13] a [2]) optimalizovat metodu AP-testu pro průmyslově významné pivovarské kvasinky. Navrženým postupem přípravy vzorků a měření je dosaženo maximální hodnoty AP, která odpovídá potenciální vitalitě kvasnic, a reprodukovatelnosti testu s přesností do 3 %.

Skladování kvasnic mezi odběrem a vlastním měřením by mělo probíhat v lednici pod pivem při teplotě 0 – 2 °C a nemělo by přesáhnout maximální dobu deseti dnů. Po době delší buňky ztrácí vitalitu.

Navržený optimální metodický postup při provádění AP-testu je následující:

- Zásobní roztok s kvasnicemi roztřepeme (kvůli homogenizaci) a odebereme z něj „dostatečné“ množství (cca 5 ml) koncentrované suspenze.
- Vzorek krátce odstředíme, cca 1000 ot/min po dobu 60 s (cca 145 × *g*), a dekantujeme pivo.
- Promyjeme destilovanou vodou (cca 15 ml) o teplotě cca 25 °C.
- Promývání (včetně krátkého odstředění) opakujeme, provedeme celkem třikrát.
- Po třetím promytí následuje prudké odstředění, cca 3000 ot/min po 10 min (1300 × *g*), slití supernatantu.
- Odvážíme (1.5 ± 0.1) g čisté váhy kvasnic.
- Přidáme 15 ml destilované vody do vzorku, spustíme měření času a vzorek roztřepeme.
- Měření probíhá za stálého míchání (200 ot/min, musí zabránit flokulaci) a při stabilní teplotě 25.0 ± 0.1 °C.
- V desáté minutě přidáme 1.5 ml glukosy (50 % roztok); konečná koncentrace glukosy v mediu 4.55 % (hmotnost glukosy na objem vzorku).
- Odečteme hodnoty *pH* v desáté a dvacáté minutě.

Optimalizovaný test byl následně použit na vzorcích z průmyslové praxe při měření vitality kvasnic z výroby piva v CKT. Bylo prokázáno, že buňky při opětovném nasazování ztrácí svoji vitalitu.

Pivovarské kmeny kvasnic jsou během procesu výroby piva vystaveny mnoha stresovým faktorům, např. při moderní technologii HGB (high-gravity brewing) mohou být při nasazení do CKT s mladinou vysoké stupňovitosti ovlivněny vysokým osmotickým tlakem. Navržený optimalizovaný AP-test byl proto použit při studiu vlivu osmotického tlaku na vitalitu buněk.

Výsledky ukázaly, že vystavení buněk osmotickým změnám se projeví krátkodobým poklesem vitality, zatímco při fermentaci kvasnic v mediu s obsahem mladiny odpovídajícím pivu o stupňovitosti 12°, ale osmotickým tlakem (simulovaným obsahem sorbitolu) odpovídajícím pivu o stupňovitosti až 20° se pokles vitality dlouhodobě neprojeví. Mladina má tedy ochranný vliv na pivovarské kvasnice a pomáhá jim přizpůsobit se osmotickým změnám.

Dalším využitím optimalizovaného AP-testu bylo při sérii prvotních měření studujících vliv xenobiotických látek, inhibujících některé metabolické pochody, na průběh AP-testu. Potvrdilo se, že průběh a výsledky testu odráží průběh metabolismu.

V další části práce byly ověřeny možnosti bezkontaktního měření  $pH$ , které bylo možné využít při metodě AP-testu a jeho specifických podmínkách. Za tímto účelem bylo vybráno vhodné barvivo (Bromocresol green) a provedena jeho spektrální charakterizace. Na sérii absorpčních spekter této látky při různých hodnotách  $pH$  byla vypočtena kalibrace, která parametru  $R$  přiřazuje hodnotu  $pH$ . Navržený způsob výpočtu parametru  $R$  vychází z integrace absorpčního spektra BCG normovaného na hodnotu absorbance na vlnové délce  $\lambda = 512$  nm (isobestický bod).

Navržená kalibrace a způsob výpočtu  $pH$  byly použity na vzorcích obsahujících rozptylující částice (kvasnice nebo separon). Na těchto vzorcích se naměřené a vypočtené hodnoty  $pH$  liší až o 8 %.

Výsledky metody jsou zatíženy systematickou chybou, která je způsobena několika faktory a to zejména vlivem mnohonásobného rozptylu a závislostí  $pK_a$  konstanty barviva na iontové síle roztoku. Další ovlivnění přesnosti výsledků je způsobeno použitým spektrometrem, který zkresluje spektra při nízkých vlnových délkách (pod  $\lambda = 470$  nm) a zvoleným postupem výpočtu parametru  $R$ .

Při navrženém výpočtu je minimalizována chyba způsobená celkovým zploštěním spekter po přidání rozptylující složky (kvasnice nebo separon) do vzorku oproti původním spektrům barviva samotného, na kterém byla prováděna kalibrace. Chyba způsobená deformací spektra barviva různým vlivem rozptylující složky na dlouhých a krátkých vlnových délkách kompenzována není.

Navržená metodika bezkontaktního měření  $pH$  prozatím není připravena pro použití při metodě AP-testu, ale může sloužit pro hrubé rozlišení kvality kvasnic.

Odstranění systematických chyb metodiky a zvýšení přesnosti by mělo umožnit její využití při měření metodou AP-testu a mohlo by být náplní další práce.

# Literatura

- [1] Čejka P. a kol.: Využití kryoskopie ke stanovení extraktu v původní mladině, *Kvasný průmysl* **43(9)** (1997), 237 – 238
- [2] Gabriel P., Dienstbier M., Matoulková D., Kosař K., Sigler K.: Optimized acidification power test of yeast vitality and its use in brewing practice, *J. Inst. Brew.*, v tisku
- [3] Gabriel P., Dienstbier M., Sladký P., Sigler K.: A new method of optical detection of yeast acidification power, *Folia Microbiologica*, v tisku
- [4] <http://en.wikipedia.org/wiki/Osmosis>
- [5] <http://en.wikipedia.org/wiki/PKa>
- [6] Imai, T., Nakajima I., Ohno T.: Development of a new method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular *pH*, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52(1)** (1994), 5 – 8
- [7] Kara B. V., Simpson W. M., Hammond R. M.: Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test, *J. Inst. Brew.* **94** (1988), 153 – 158
- [8] Kodedová M.: Studium sedimentace a flokulace vybraných kmenů kvasnic metodami komplexní turbidimetrické analýzy, Diplomová práce (2006)
- [9] Košin P., Šavel J., Kolouchová I., Brož A.: Viabilita a vitalita kvasnic v provozním kvašení, *Kvasný průmysl* **53** (2007), 30 – 34
- [10] Opekarová M. a Sigler K.: Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Folia Microbiologica* **27** (1982), 395 – 403
- [11] Prosser V. a kol.: Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha, (1989)
- [12] Sigler K. a Höfer M.: Mechanisms of acid extrusion in yeast, *Biochemica et Biophysica Acta* **1071** (1991), 375 – 391
- [13] Sigler K., Mikyška A., Kosař K., Gabriel P., Dienstbier M.: Factors affecting the outcome of the acidification power test as a measure of yeast quality: critical reassessment, *Folia Microbiologica* **51(6)** (2006), 525 – 534

- [14] Šusta J., Hodaň J., Opekarová M., Sigler K.: A simple method for determining the metabolic activity of brewer's yeast during the brewing process, *Food Microbiologica* **1** (1984), 168 – 171
- [15] Thomas Lee S. a kol.: A sensitive fibre optic  $pH$  sensor using multiple sol-gel coatings, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **3** (2001), 355 – 359
- [16] Yamazaki H., Sperline R. P., Freiser H.: Spectrophotometric determination of  $pH$  and its application to determination of thermodynamic equilibrium constants, *Anal. Chem.* **64** (1992), 2720 – 2725