

Vliv deficiencie růstových faktorů na citlivost buněk *Saccharomyces cerevisiae* k pH, teplotě a UV záření

582.282.23.04 535-31 536 5
541.132.3

RNDr. VLADIMÍR JIRKŮ, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha
Ing. ALENA ČEJKOVÁ, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: deficiencie různých faktorů, inaktivační křivka

Pracovní hypotézou dále uvedených experimentů je předpoklad, že nepřítomnost (snížená koncentrace) ve vodě rozpustných vitamínů s funkcí růstových faktorů, která v kultivačním prostředí ještě nevyvolává změnu růstové charakteristiky kvasinkové populace, může indukovat změny v biologické aktivitě i funkci základních buněčných struktur. Tato práce zároveň vychází z obecné představy o mechanismu účinku deficiencie růstového faktoru, která předpokládá, že změny v základních buněčných procesech a funkcích mohou být indukovány přímo nebo nepřímo [1]. Předpoklad, že vynechání nebo snížení koncentrace biotinu, thiaminu, inositolu, Ca-pantothenátu a pyridoxinu vyvolává při nezměněném růstu a množení deficientní populace výrazné změny v biochemické aktivitě, byl potvrzen studiem změn hladiny jednotlivých skupin lipidů [2], změnou citlivosti účinku polyenových antibiotik [3] a „killer“ toxinu [4] i cytologickými změnami deficientních buněk [5].

Vzhledem k stále otevřené otázce vlivu deficiencie růstových faktorů v průmyslových kultivacích kvasinkových kmenů, sleduje tato práce změnu citlivosti deficientní buňky k účinku pH, teploty a UV záření. Jinými slovy, jde o ověření předpokladu, že suboptimální koncentrace růstových faktorů mohou být příčinou zvýšené citlivosti kvasinkové populace drožďařského kmene k náhlým změnám pH a teploty i zvýšené citlivosti k UV záření.

MATERIÁL A METODY

Kmen. *Saccharomyces cerevisiae* 92 — drožďařská rasa Union (sbírka pracoviště) byl uchováván při teplotě 4°C na šikmém agaru (Malt Extract Agar, Oxoid), při pravidelném pasážování v intervalu 21 dnů.

Médium. Kultivace a příprava deficientních populací byly provedeny v syntetickém médiu [6] modifikovaném úplným vynecháním biotinu nebo thiaminu, nebo jednot-

livým snížením koncentrace pyridoxinu, pantothenátu a inositolu na 60 % optimální koncentrace (v textu dále označováno jako 40 % deficiencie). Sledované zdroje C byly přítomny v 1% výchozí koncentraci. Výchozí hodnoty pH média byly v rozmezí 3,8–4.

Puřry. Použité varianty puřru McIlvaina a borátového puřru byly připraveny podle Keila a Šormové [7].

Příprava inokula. V experimentech sledujících důsledky deficiencie růstových faktorů byla jako inokulum použita výhradně buněčná populace pozdní exponenciální fáze získaná kultivací v nepřítomnosti biotinu nebo thiaminu nebo v přítomnosti snížených koncentrací inositolu, pantothenátu nebo pyridoxinu. Způsob kultivace těchto kultur se nelišil od kultivací použitých ve vlastních experimentech.

Kultivace. Objemy 100 ml média byly inokulovány při dodržení standardní optické density (OD 0,08) a kultivovány za aktivní aerace při 30°C na třepacím stroji (88 kvů . min⁻¹) kombinovaném s vodní lázní.

Stanovení celkového počtu buněk. Vzorky pro toto stanovení byly odebrány do fyziologického roztoku obsahujícího 0,5 % obj. formaldehydu jako fixativa. Stanovení bylo provedeno v Bürgerově počítací komůrce.

Stanovení počtu buněk schopných tvořit kolonie. Vzorky byly ředěny fyziologickým roztokem a inokulace agarových ploten byla provedena 0,2 ml ředěné suspence ve dvou řádově se lišících paralelách. Počet vzniklých kolonií byl odečítán po 48 h.

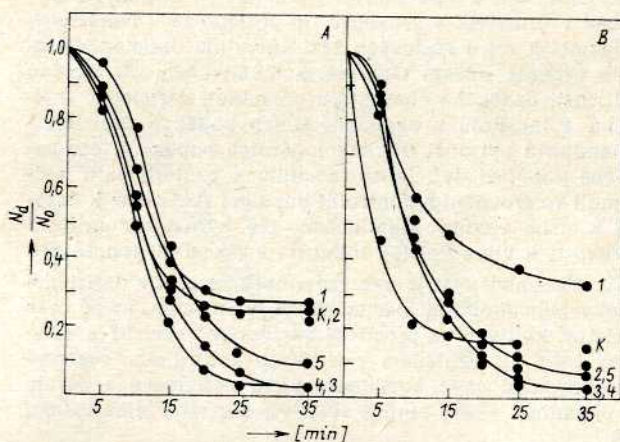
Inaktivační křivka. Změna citlivosti ke sledovaným faktorům byla charakterizována inaktivační křivkou jako závislost hodnoty N_d/N_0 na dávce d (N_0 — původní počet aktivních jedinců; N_d — počet aktivních jedinců v populaci vystavené účinku sledovaného inaktivačního faktoru — pH, teploty, UV). Sledovanou aktivitou je schopnost tvořit kolonie. Jednotlivé vzorky pro toto stanovení byly ředěny fyziologickým roztokem. Ředěná kultura

byla vyseta na agarové plotny, obsahující kromě složek použitého média i růstové faktory ve sledovaných koncentracích.

Ozáření UV světlem. Bylo provedeno ze vzdálenosti 32 cm od středu použitého UV zdroje (Philips TUV, 15 W) při intenzitě $5 \cdot 10^{-7} \text{ J} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

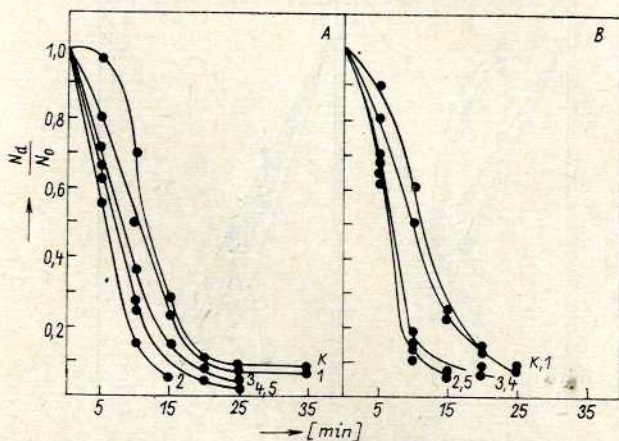
VÝSLEDKY A DISKUSE

Inaktivace deficientních populací byla sledována vzhledem k délce intervalu inkubace při 50 °C, nebo v prostředí pH 9 a k velikosti dávky UV záření. Teplota, pH i rozsah dávek UV záření byly zvoleny na základě předběžných experimentů, které ve stejném uspořádání sledovaly vliv teploty, pH a UV záření na buněčnou populaci, rostoucí v přítomnosti všech sledovaných růstových faktorů. Kritériem volby použitého inaktivačního faktoru byl požadavek přibližně 50% inaktivace v populaci, která byla vlivu teploty, pH a UV vystavena v čase (dávce), který je polovinou celkového intervalu inkubace



Obr. 1. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* teplotou 50 °C. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti glukosy a nepřítomnosti biotinu (1) nebo thiaminu (2), nebo při 40% deficienci inositolu (3), Ca-pantothenátu (4) nebo pyridoxinu (5)

K — kontrola; [min] — čas inkubace v 50 °C

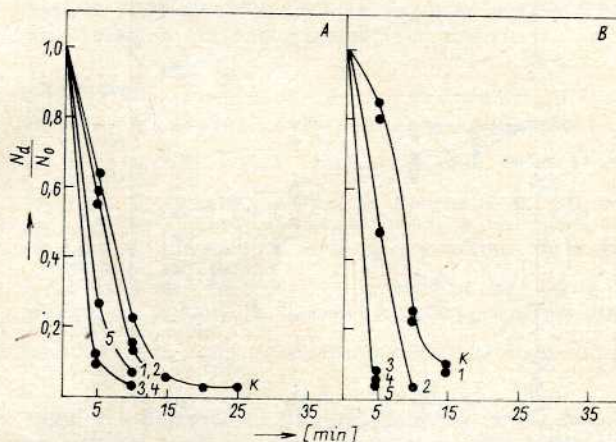


Obr. 2. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* teplotou 50 °C. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti sacharosy. Další podmínky viz legenda obr. 1.

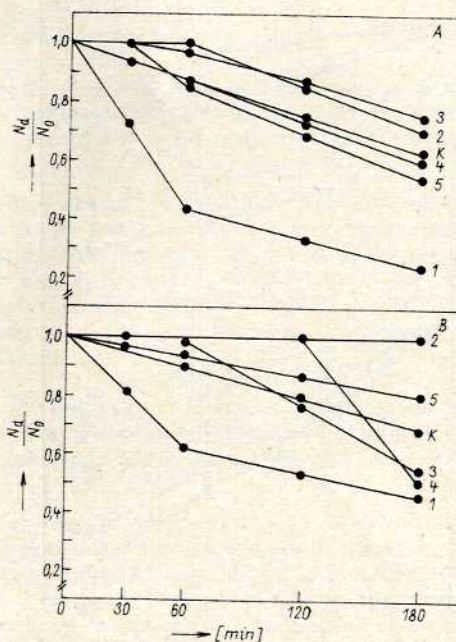
v dané teplotě a pH nebo polovinou sledovaného rozsahu dávek UV záření.

Inaktivace vlivem teploty. Exponenciální a stacionární populace deficientních buněk získaných v prostředí glukosy, sacharosy a maltosy byly po promytí v 0,03 M citran-fosfátovém pufru (pH 4,5) vystaveny teplotě 50 °C, a to v intervalech 5 až 35 min. Průběh inaktivace vyjádřený inaktivačními křivkami shrnují obr. 1–3.

Z grafického vyjádření průběhu inaktivace deficientních populací získaných kultivací v prostředí glukosy (obr. 1) je zřejmé, že exponenciální buňky deficientní na biotin a pyridoxin jsou rezistentnější k teplotním šokům 5 až 15 min, než buňky kontrolní populace. Zároveň je zřejmé, že průběh inaktivace delšími teplotními šoky v po-

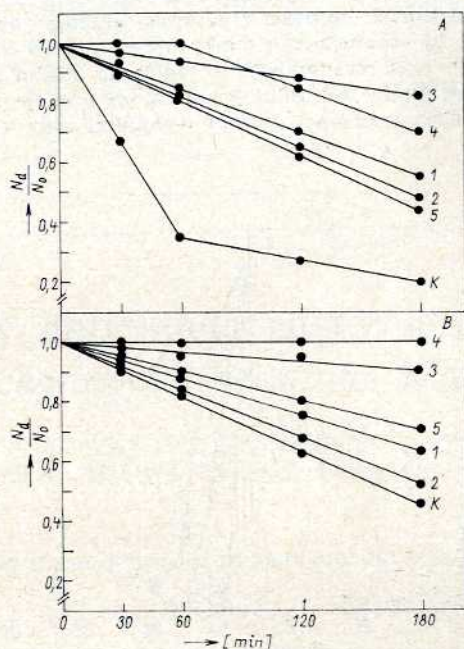


Obr. 3. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* teplotou 50 °C. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti maltosy. Další podmínky viz legenda obr. 1.

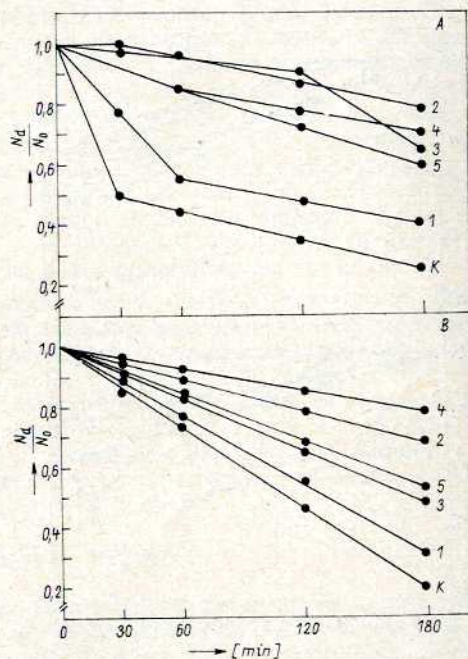


Obr. 4. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* vlivem pH 9,0. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti glukosy. Další podmínky viz legenda obr. 1.

pulacích deficientních na thiamin, inositol a pantothenát přibližně odpovídá inaktivaci kontrolní buněčné populace. Z hlediska vlivu teplotních šoků 20–30 min je zřejmé, že populace deficientní na biotin, thiamin a populace kontrolní obsahují přibližně stejně velkou frakci buněk, které jsou k daným teplotním šokům rezistentní.



Obr. 5. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* vlivem pH 9,0. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti sacharosy. Další podmínky viz legenda obr. 1.



Obr. 6. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* vlivem pH 9,0. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti maltosy. Další podmínky viz legenda obr. 1.

Průběh inaktivace v populacích deficientních stacionárních buněk ukazuje, že všechny deficiencie podmiňují výraznější rezistenci k teplotním šokům 5–15 min. Stacionární populace deficientní na biotin je výrazně rezistentnější i k šokům 15–30 min.

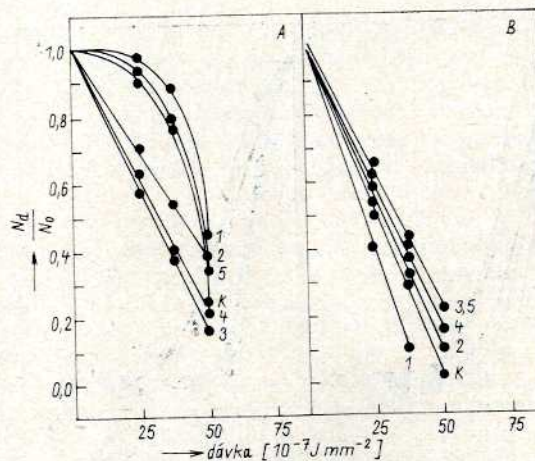
Celkem opačná situace byla zaznamenána v průběhu inaktivací u deficientních exponenciálních a stacionárních populací, které byly získány kultivací v prostředí sacharosy (obr. 2). V obou případech všechny sledované deficiencie podmiňují zvýšení citlivosti buněk k teplotě 50 °C.

Stejný závěr lze učinit i v případě jednotlivých exponenciálních a stacionárních populací, získaných kultivací v prostředí maltosy (obr. 3) a deficientních na inositol, pantothenát a pyridoxin.

Inaktivace v prostředí alkalického pH. Exponenciální a stacionární buňky byly promyty a resuspendovány v 0,05 M borátovém pufru pH 9. Změna schopnosti tvořit kolonie byla sledována po 30, 60, 120 a 180 min intervalu statické inkubace v uvedeném pH a teplotě 30 °C. Obrázek 4 shrnuje průběh inaktivace v deficientních exponenciálních a stacionárních populacích získaných kultivací v prostředí s glukosou. Je zřejmé, že v buněčných populacích obou růstových fází stimuluje deficiencie biotinu výrazné snížení citlivosti k alkalickému pH. Změnu citlivosti opačného charakteru podmiňují deficiencie thiaminu a inositolu u exponenciálních buněk a deficiencie thiaminu a pyridoxinu u stacionárních buněk. V této buněčné populaci deficiencie inositolu a pantothenátu podmiňují ve srovnání s kontrolní populací rezistenci k časově kratším vlivům alkalického pH a naopak zvýšení citlivosti k vlivu delších inkubací v prostředí tohoto pH.

V této souvislosti je pak zcela uniformní vliv deficiencí v exponenciálních a stacionárních populacích, které byly získány kultivací v prostředí sacharosy (obr. 5) a maltosy (obr. 6). Vzhledem k citlivosti kontrolního systému všechny sledované kombinace vlivu deficiencie a zdroje C podmiňují různý stupeň rezistence k vlivu alkalického pH.

Inaktivace deficientních buněk vlivem UV záření. U standardně připravených deficientních buněčných populací byl vliv UV záření sledován v podmínkách, které vylučují fotoreaktivaci a fotoprotekci. V experimentálním provedení nebylo rovněž použito postupů, o kterých je obecně známo, že snižují letální účinek UV záření.



Obr. 7. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* vlivem UV záření. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti glukosy. Další podmínky viz legenda obr. 1.

Obrázek 7 shrnuje inaktivační křivky, které charakterizují citlivost deficientních populací kultivovaných na glukóze ke zvyšující se dávce UV záření. Je zřejmé, že z hlediska charakteru inaktivace exponenciálních populací lze rozlišit dva typy inaktivačních křivek. Lineární průběh inaktivačních křivek byl zaznamenán u populací deficientních na thiamin, inositol a panthothénát. Z hlediska zásahové teorie křivky, které charakterizují inaktivaci populace kontrolní a populací deficientních na biotin a pyridoxin, odpovídají víceterčovému modelu.

Inaktivace deficientních stacionárních populací má jednotný charakter a odpovídá inaktivaci jednoterčového modelu. Celkově je zřejmé, že kromě deficiencie biotinu, podmiňují sledované deficiencie určitou rezistenci stacionárních populací k UV záření. V tomto směru zhruba opačně reagují populace exponenciální.

Obrázek 8 ukazuje, že průběh inaktivace v exponenciálních a stacionárních populacích, kultivovaných v prostředí se sacharóou, lze charakterizovat inaktivačními křivkami, které odpovídají jednoterčovému i víceterč-

vému modelu. Je zřejmé, že zejména deficiencie biotinu a inositolu podmiňují opačný charakter inaktivace v populaci exponenciální a stacionární.

Prostředí s maltosou (obr. 9) podmiňuje, že sledované deficiencie stimulují výrazné zvýšení rezistence k UV v populacích exponenciálních. Zároveň je zřejmé, že v charakteru inaktivačních křivek převládá model více-

terčový. Z uvedených výsledků lze shrnout, že předpokládaný vliv deficiencie na stav metabolismu a biochemické aktivity buňky zřejmě podmiňuje i zjištěné změny v citlivosti deficientní populace k vlivu pH, teploty a UV záření. Tyto výsledky odpovídají obecnému předpokladu, že citlivost jednobuněčného organismu k změnám vnějšího prostředí je vždy určena celkovou biochemií buňky, jejím fyziologickým stavem a funkcí obranných a reparačních mechanismů [8]. Tyto výsledky zároveň ukazují význam deficiencie růstových faktorů jako klíčový faktor průmyslových kultivací kvasinkových kmenů.

Literatura

- [1] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A., BASAŘOVÁ, G.: Kvas. prům., 1984 (v tisku)
- [2] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A., PÁČA, J.: Sborník VŠCHT (Praha) E55, 1983, s. 143
- [3] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A., PÁČA, J.: Experientia, **37**, 1981 s. 39
- [4] JIRKŮ, V., ČEJKOVÁ, A.: Z. Allg. Mikrobiol., **21**, 1981, s. 423
- [5] JIRKŮ, V., LUDVÍK, J., ČEJKOVÁ, A., KRUMPHANZL, V.: Z. Allg. Mikrobiol., **22**, 1982, s. 389
- [6] OLSON, B. H., JOHNSON, M. J.: J. Bacteriol., **57**, 1949, s. 235
- [7] KEIL, B., SORMOVÁ, Z.: Laboratorní technika biochemie, Nakl. CSAV, 1959, s. 739
- [8] HUGO, W. B.: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell, Academic Press, 1971

Jirků, V. - Čejková, A.: Vliv deficiencie růstových faktorů na citlivost buněk *Saccharomyces cerevisiae* k pH, teplotě a UV záření. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 12, s. 276–280

Provedená srovnávací studie byla zaměřena na vliv deficiencie růstových faktorů na citlivost kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae*. Inaktivační křivky exponenciálních a stacionárních deficientních buněk prokázaly výrazné změny v citlivosti k pH, teplotě a UV záření. Tento účinek deficiencie růstových faktorů se výrazně mění s vlivem zdroje uhlíku a růstové fáze.

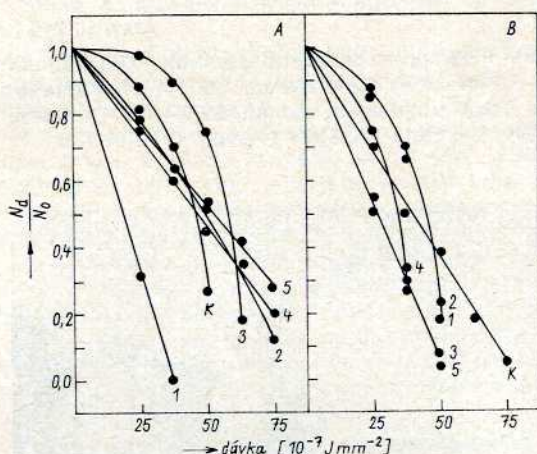
Иирку, В., Чейкова, А.: Влияние дефицита фактора роста на чувствительность клеток *Saccharomyces cerevisiae* в отношении к pH, температуре и УФ излучению. Квас. прум. **30**, 1984, № 12, стр. 276–280.

Проведенные сопоставительные исследования были направлены на изучение влияния дефицита факторов роста на чувствительность дрожжевой клетки *Saccharomyces cerevisiae* к pH, температуре и УФ излучению. Это действие дефицита факторов роста значительно изменяется в связи с влиянием источника углерода и фазы роста.

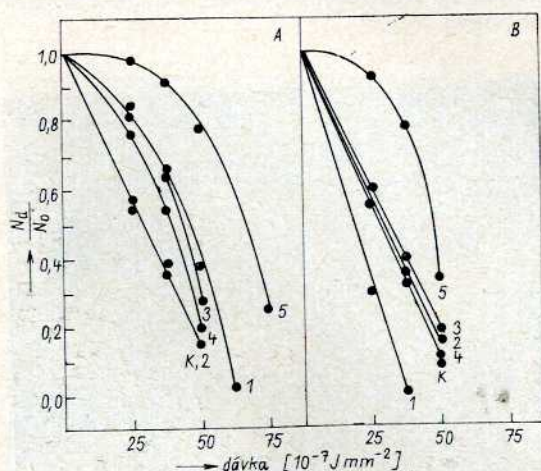
Jirků, V. - Čejková, A.: Effect of growth factor deficiency on pH, temperature and UV sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Kvas. prům. **30**, 1984, No. 12, pp. 276–280.

A comparative study was made of sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to growth factor deficiency. Inactivation curves of exponential and stationary cells revealed significant changes in pH, temperature and UV sensitivity of deficient cells. This effect of growth factor deficiency can considerably vary with carbon source and growth phase.

Jirků, V. - Čejková, A.: Einfluß der Defizienz der Wachstums-Faktoren auf die Empfindlichkeit der Zellen *Sac-*



Obr. 8. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* vlivem UV záření. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti sacharósy. Další podmínky viz legenda obr. 1.



Obr. 9. Inaktivace exponenciální (A) a stacionární (B) populace *Saccharomyces cerevisiae* vlivem UV záření. Buněčné populace byly získány kultivací v přítomnosti maltósy. Další podmínky viz legenda obr. 1.

***Saccharomyces cerevisiae* gegen pH, Temperatur und UV-Strahlung.** Kvas. prům. **30**, 1984, Nr. 12, S. 276—280

Die durchgeführte Vergleichsstudie wurde auf den Einfluß der Defizienz der Wachstumsfaktoren auf die Empfindlichkeit der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae*

gerichtet. Die Inaktivationskurven der exponentialen und stationären defizienten Zellen zeigten markante Änderungen in der Empfindlichkeit gegen pH, Temperatur und UV-Strahlung. Diese Einwirkung der Defizienz der Wachstumsfaktoren ändert sich wesentlich mit dem Einfluß der Kohlenstoffquelle und der Wachstumsphase.