57

POPIS OBJEVU
K DIPLOMU ČÍS. 57

Přihlášeno: 02.06.1986/PO 28 -86/

Právo přednosti od 21.11.1985

Zveřejněno: Folia microbiologica, 30, 1985, 6: 465 - 473

Uděleno: 19 12 90

Vydáno:

MDT 663.18

Autoři objevu: Kotyk Arnošt, doc. RNDr., DrSc., Praha a
Janda Stanislav, RNDr., CSc., Praha

Název objevu: Závislost rychlosti metabolických pochodů mikroorganismů na hustotě suspenze

Předmět objevu:

Zákonitost, spočívající ve vztahu mezi rychlostí metabolických pochodů mikroorganismů (bakterií *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Streptomyces granaticolor,* kvasinek *Saccharomyces cerevisiae, Rhodotorula glutinis, Lodderomyces elongisporus, Candida utilis, Endomyces magnusii*) jako je spotřeba kyslíku, anaerobní tvorba oxidu uhličitého a přenášečo-

vý transport monosacharidů, disacharidů, aminokyselin a iontů H^+, a hustotou suspenze, vyjádřená rovnicí

$$v = V \frac{a}{(a + K_m)(1 + i/K_i)} ,$$

kde

v = rychlost zkoumaného pochodu (vyjádřená např. v milimolech látky za minutu na gram sušiny),

V = maximální rychlost zkoumaného pochodu (v těchže jednotkách jako v),

a = koncentrace substrátu (např. O_2, cukru, atp., vyjádřená např. v milimolech na litr),

K_m = konstanta poloviční saturace (má rozměry koncentrace)

i = hustota suspenze, na níž je přímo závislá koncentrace oxidu uhličitého v mimobuněčném roztoku (vyjádřená buď v gramech sušiny na litr nebo v milimolech CO_2 na litr),

K_i = inhibiční konstanta (v těchže jednotkách jako i)

Předmětem zkoumání, které vedlo k déle uvedenému objevu, byl vliv hustoty suspenze mikroorganismů, jednak prokaryontních jednak eukaryontních, na intenzitu jejich metabolických pochodů, jako je dýchání, kvašení a membránový transport.

Ačkoliv při sledování těchto pochodů, ať v rostoucích ale zejména nerostoucích buňkách, je hodnota hustoty suspenze zcela nutným údajem - rychlost všech výše uvedených pochodů se musí vztahovat na množství buněk, jejich sušinu nebo obsah bílkovin, nebyla závislosti této rychlosti na hustotě suspenze věnována nikde systematická pozornost. Pokud se vyskytly v literatuře různé údaje o rychlosti daného procesu, příčina nebyla nikdy definována jako vliv hustoty suspenze, ale rozdíly byly připisovány "různým fyziologickým podmínkám" nebo "odlišnostem v použitém kmeni mikroorganismu."

Zkoumání metabolických pochodů mikroorganismů, ať Warburgovou manometrickou metodou (např. Umbreit W. W. a kol., Manometric Techniques, Burgess Minneapolis, 1957) nebo metodami specifickými pro stanovení určitých enzymových reakcí (např. Pascual C. a Kotyk A., Analyt. Biochem. 123: 201-204, 1982) nebo metodami membránového transportu pomocí radioaktivně značených látek (např. Horák J. a kol., Biochim. Biophys. Acta 649: 436-440, 1981) se provádí při

hustotách buněčné suspenze, odpovídajících 1 - 5 mg sušiny na ml. V tomto oboru hustot suspenze se intenzita mění málo, rozdíly eventuálně pozorované jsou přičítány rozptylu experimentálních hodnot. Ve většině prací se hustota suspenze ani neudává.

Při některých metodách, jako je měření spotřeby kyslíku Clarkovou specifickou elektrodou, se však pracuje se suspenzemi zředěnějšími, běžně 0.1 mg sušiny na ml. Při těchto a nižších koncentracích buněk byla pozorována řádově vyšší specifická rychlost spotřeby kyslíku než při koncentracích běžně v jiných metodách používaných.

V práci zde předkládané bylo provedeno systematické studium závislosti na hustotě suspenze v případě těchto fyziologických pochodů: (1) dýchání, tedy spotřeba kyslíku, (2) kvašení, tedy anaerobní produkce oxidu uhličitého, (3) membránový transport, pasivní i aktivní, cukrů, aminokyselin a některých kationtů. Zkoumány byly suspenze bakterií Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, aktinomycety Streptomyces granaticolor, a kvasinek Saccharomyces cerevisiae, Rhodotorula glutinis, Endomyces magnusii, Candida utilis, a Lodderomyces elongisporus.

Ve všech případech zde uváděných byla nalezena negativní závislost intenzity metabolických pochodů na hustotě suspenze, a to zejména výrazně v oboru mezi 0,02 a 0,2 mg sušiny na ml. Příklady této závislosti pro typický případ dýchání, tedy spotřeby kyslíku, jsou uvedeny pro bakterie v obr. 1, pro aktinomycetu v obr. 2 a pro kvasinky v obr. 3. Ve všech případech v přítomnosti 10 mM D-glukosy jako substrátu.

Vynesení intenzity spotřeby kyslíku v závislosti na hustotě

suspenze při různých parciálních tlacích kyslíku (a tedy i jeho koncentracích v roztoku) podle Dixona (Dixon M., Biochem. J. 55: 170-176, 1953) ukázalo, že jde o nekompetitivní inhibici "hustotou suspenze" a že, bez ohledu na faktor, který inhibici na molekulární úrovni působí, můžeme rychlost metabolického pochodu vyjádřit rovnicí

$$v = V \frac{a}{(a + K_m)(1 + i/K_i)} ,$$

kde

v = rychlost vyjádřená např. v milimolech látky za min na mg sušiny,

V = maximální rychlost dosažitelná při plném nasycení systému substrátem (v těchže jednotkách jako v)

K_m = konstanta poloviční saturace (v jednotkách koncentrace),

i = koncentrace inhibičního faktoru, v daném případě "hustota suspenze" (např. v milimolech nebo gramech na litr),

K_i = inhibiční konstanta (v těchže jednotkách jako i)

V případě endogenního dýchání buněk Saccharomyces cerevisiae je zdánlivá maximální rychlost dýchání při vysokých hustotách suspenze o tři matematické řády nižší než v extrémně zředěných suspenzích.

Podobný charakter nekompetitivní inhibice hustotou suspenze (tedy snížení maximální rychlosti zkoumaného procesu) byl nalezen v případě transportu cukrů a aminokyselin v různých druzích mikroorganismů.

Pokusy, jimiž byl prokázán vliv hustoty suspenze na fyziologické procesy v mikroorganismech, byly prováděny typicky takto.

1. Měření spotřeby kyslíku

Bylo použito kyslíkové elektrody Clarkova typu, vyrobené na Katedře fyziologie PřF UK, která má mimořádně nízkou vlastní spotřebu kyslíku a zanedbatelný drift. I při nejnižších spotřebách kyslíku experimentálně stanovených byla suma těchto technických faktorů menší než 10% a byla od naměřené spotřeby kyslíku odečtena.

Nádobka s elektrodou obsahovala destilovanou vodu nebo vhodný pufr, případě substrát, a otevřena byla temperována na 30 °C za intenzivního míchání až do nasycení atmosferickým kyslíkem (20 minut). Pak byla komůrka uzavřena skleněnou zabroušenou zátkou, v níž byla centrální kapilára pro přidání suspenze, eventuálně dalších substancí, o průměru 0.5 mm. Zapisovač sledující hodnoty naměřené elektrodou ukazoval tehdy nulovou spotřebu kyslíku i během několika minut.

Pak byla kapilárou přidána předem vytemperovaná suspenze bakterií nebo kvasinek v množství 10% celkového objemu, a zaznamenávána směrnice klesající křivky zapisující koncentraci kyslíku v nádobce. Ačkoliv byla vždy měřena počáteční rychlost toku, u elektrody se navodily de facto stacionární podmínky odpovídající různým koncentracím buněk.

2. Měření membránového transportu

Suspenze kvasinky Rhodotorula glutinis vyrostlé na syntetickém médiu do stacionární fáze byla připravena ve 1,8 ml destilo-

vané vody v Erlenmeyerově nádobce do příslušné hustoty a inkubována na reciproké třepačce ve vodní lázni při 30 °C, s frekvencí 1,2 Hz a s amplitudou 5 cm. Po 10 min bylo přidáno 0,2 ml roztoku 6-deoxy-D-glukosy univerzálně značené izotopem ^{3}H. Po 1, 2, 3, 4, 5 a 60 min byly odebrány 0,2-ml vzorky, filtrovány přes membránový filtr Synpor 5 (průměr pórů 0,6 μm), filtr promyt 2 ml ledové destilované vody a přenesen do toluen-ethanolové scintilační směsi a v ní měřena radioaktivita ve scintilačním spektrometru.

(6-Deoxy-D-glukosa používá typického glukosového přenášeče, ale není v kvasinkách metabolizována).

Taková inkubace a měření byly provedeny (a) při koncentracích 6-deoxy-D-glukosy 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 a 0,8 mM a (b) při hustotách suspenze přibližně (avšak přesně) 20, 40, 60, 80, 100, 200 μg sušiny v 1 ml. Z počátečních rychlostí vstupu při různých koncentracích 6-deoxy-D-glukosy byly vypočteny kinetické konstanty transportu, K_m a V (viz rovnice výše) a zjištěno, že hustotou suspenze je postižena především maximální rychlost, která při nejnižší použité hustotě suspenze je v průměru 25,6 nmol min^{-1} $(mg\ sušiny)^{-1}$, zatímco při nejvyšší hustotě suspenze je 3,2 nmol $min^{-1}(mg\ sušiny)^{-1}$.

3. Měření produkce H^{+}

Skleněná temperovaná komůrka obsahovala 10 ml suspenze kvasinky Lodderomyces elongisporus při 30 °C. Do ní ponořená kombinovaná kalomelová a skleněná elektroda (Radiometer) zaznamenávala elektrické napětí a tyto hodnoty, po příslušné konverzi, byly registrovány na zapisovači jako pH. Po přidání 1 ml 10% roztoku

glukosy se původní pH okolo 5,5 prudce snížilo během 3-5 min na hodnoty mezi 3,5 a 4,0. Počáteční rychlost této změny udávala po příslušném přepočtu na koncentrace H^+ rychlost produkce iontů H^+ kvasinkami. (Pro kontrolu byla tu měřena i tzv. titrační acidita - množství roztoku NaOH o známé koncentraci potřebné k převedení pH supernatantu 5 min po přidání glukosy na původní hodnotu před přidáním glukosy.) Při hodnotě suspenze 0,05 mg sušiny v 1 ml byla produkce H^+ 28 mmol za min na 1 g sušiny, při hustotě 2 mg sušiny v 1 ml pouze 1,8 mmol za min na 1 g sušiny.

V pokusech o definici molekulární podstaty inhibujícího faktoru bylo zjištěno, že (1) jde o látku vylučovanou do vodného prostředí buněk, (2) je to látka bez rozdílu působící na kterýkoli ze zkoumaných mikroorganismů, (3) látku lze odstranit z filtrátu (nebo supernatantu) suspenze povařením nebo intenzivním třepáním, (4) inhibiční účinek látky lze odstranit inkubací suspenze spolu se zelenou sladkovodní řasou.

Všechna tato zjištění naznačují, že tu jde o rozpuštěný oxid uhličitý. Tato domněnka byla alespoň kvalitativně potvrzena přidáváním vody nasycené oxidem uhličitým k velmi řídké suspenzi kvasinek, což vedlo jak k inhibici dýchání tak inhibici membránového transportu.

Zjištěná závislost mezi rychlostí metabolických pochodů a hustotou suspenze mikroorganismů, která má charakter zákonitosti, má význam jak teoretický (a) tak praktický (b).

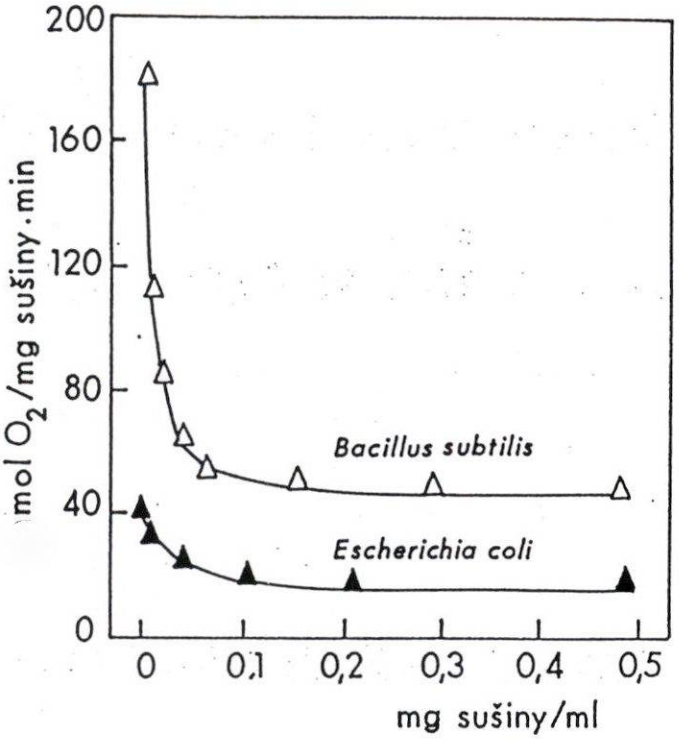
a. Skutečnost, že oxid uhličitý jako konečný produkt metabolismu většiny uhlíkatých sloučenin má negativní efekt na základní životní pochody mikroorganismů (ve vyšších organismech to nebylo zkoumáno, ale lze to extrapolací předpokládat), je objev zcela zásadního významu pro pochopení stacionárního stavu, který obecně v přírodě existuje. Nelze vyloučit, že tento efekt má i význam globální při udržování stabilního objemu biomasy na zemi a tím i množství oxidu uhličitého v atmosféře.

b. Toho, že hustota mikrobní suspenze se zdráží v koncentraci oxidu uhličitého v roztoku, lze využít při některých speciálních výrobách v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, kdy s menšími náklady na živiny lze dosáhnout téhož efektu jako v normě, pokud je ze systému in situ odstraňován oxid uhličitý.

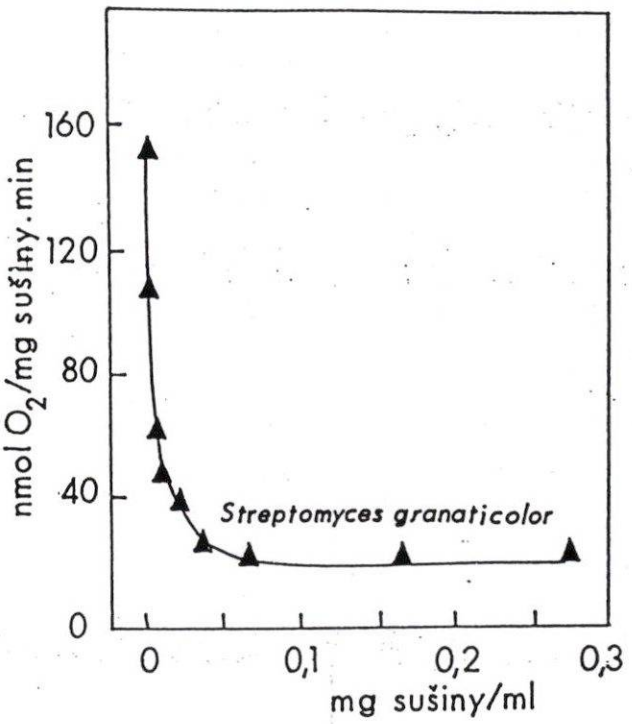
Využití ve společenské praxi je prozatím testováno pokusně v areálu Biologických ústavů ČSAV v Praze - Krči. Jde zvláště o možnosti tzv. kokultivace (v růstových podmínkách) nebo koinkubace (v nerůstových podmínkách) některého druhu kvasinek, např. Saccharomyces cerevisiae nebo Candida utilis, spolu se zelenou řasou, např. rodu Vaucheria. Řasa odnímá in situ oxid uhličitý, čímž se zvyšuje metabolická aktivita kvasničných buněk. O tomto zvýšení se dá předpokládat, že bude mít i sekundární, zcela praktické účinky na produkci metabolitů hospodářského významu.

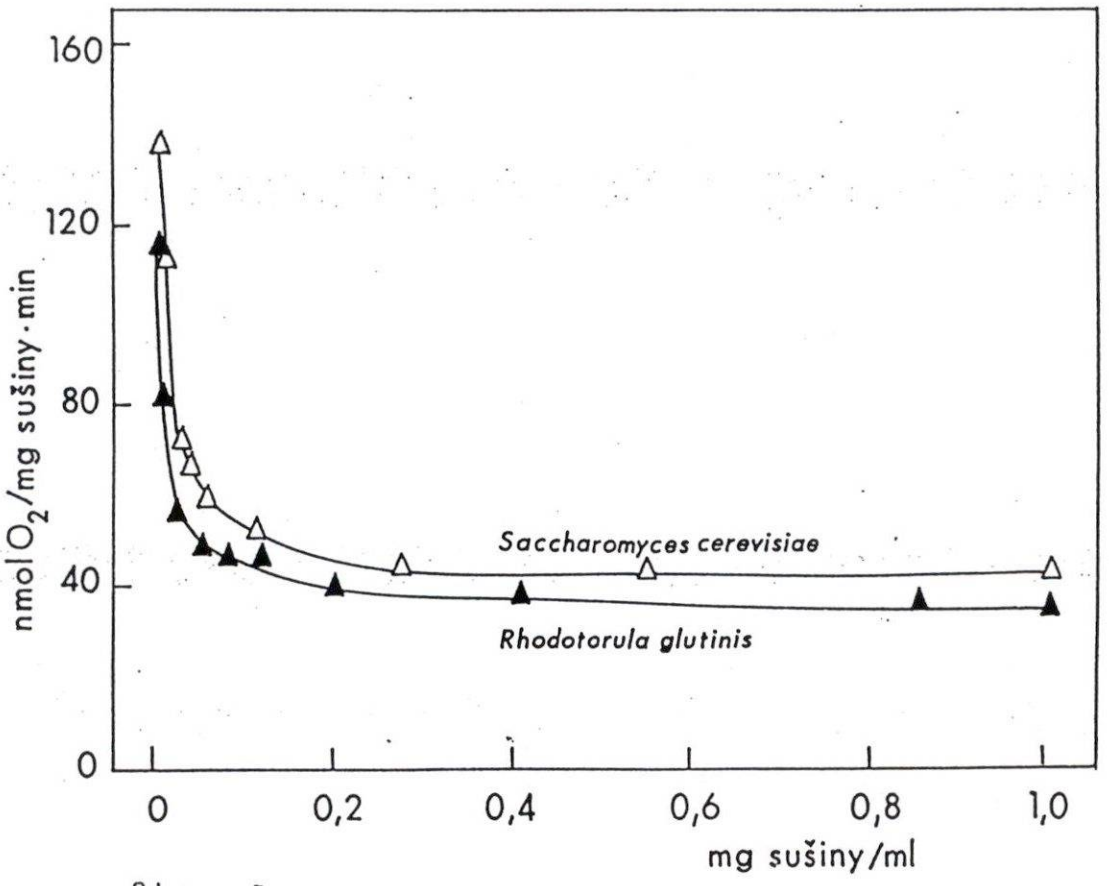
Naopak lze uvažovat o tom, že zvýšením koncentrace CO_2 v roztoku lze potlačit některé primární procesy a tím posílit produkční pochody sekundární (např. některá antibiotika).

Obr. 1



Obr. 2





Obr. 3