Zjišťování kontaminace pekařského expedičního droždí „divokými“ kvasinkami a disociačními formami provozního kmene

LUDMILA ŠILHÁNKOVÁ, Vysoká škola chemickotechnologická, Praha

664.642/646

Je všeobecně známo, že jakost prodejného droždí závisí jak na fyziologickém stavu jednotlivých buněk, tak i na přítomnosti kontaminujících kvasinek. Jako kontaminace droždí se vyskytují převážně kvasinky, u nichž převládá aerobní metabolismus, ať už jsou to křísotvorné typy, např. *Candida krusei*, *Candida mycoderma* nebo *Candida tropicalis*, nebo sedlinotvorné typy jako *Candida utilis*, *Torulopsis dattila*, *Torulopsis jamata* (synon. *Torulopsis minor*) nebo *Saccharomyces exiguus*. Aerobní proces výroby droždí je pro tyto kontaminující kvasinky výhodnější než pro provozní kmen, a proto může dojít k jejich značnému pomnožení ve větraných záparách. Jejich hojnější výskyt způsobuje sice poněkud větší výtěžky, avšak současně i velmi značné zhoršení jakosti expedičního droždí, především pokud jde o kvasivost, kynutí a trvanlivost. Podle Plevako a Givartovského [1949] má nejzhoubnější účinek na mohutnost kynutí a trvanlivost droždí především *Torulopsis dattila*, *Torulopsis utilis* (podle všeobecně uznávaného klíče Lodderové a sp. [1952] označovaná jako *Candida utilis*) a *Saccharomyces exiguus*, jejichž trvanlivost dosahuje asi $\frac{1}{5}$ trvanlivosti buněk *S. cerevisiae* a doba kynutí je 2 až 5násobkem doby kynutí *S. cerevisiae*. Doba kynutí *Mycoderma cerevisiae* (Lodderovou a sp. uváděná jako *Candida mycoderma*) je podle těchto autorů maximálně dvojnásobkem doby kynutí *S. cerevisiae* a trvanlivost je asi o $\frac{1}{3}$ nižší než trvanlivost kulturních kvasinek. Přítomnost většího množství *C. mycoderma* a ostatních křísotvorných kvasinek může podle Grégra [1957] způsobovat rovněž závady při lisování a liberkování droždí.

Mikroskopicky lze kontaminaci droždí divokými kvasinkami velmi těžko zjistit, neboť morfologicky se tyto kvasinky často příliš neodlišují od provozní kultury, i když mají někdy sklon k tvorbě menších buněk nebo k tvorbě pseudomyceliovitých až myceliovitých útvarů. Často lze velmi těžko rozlišit, zda jde skutečně o kontaminaci provozních kvasinek kvasinkami divokými nebo o morfologickou nejednotnost provozní kultury. Pro bezpečné rozlišení buněk provozní kultury navrhuji Kunz a Klaushofer [1961] diferenciální barvení kulturních kvasinek antisérem *S. cerevisiae*, které je značeno fluoresceinem. Jejich metoda má výhody i nevýhody všech mikroskopických metod, tj. rychlé získání výsledků, avšak poměrně malou kvantitativní přesnost. Značnou nevýhodou metody zmíněných autorů je však poměrně komplikovaná příprava a izolace antiséra z králíků a nákladné zařízení, neboť pro mikroskopii barevných preparátů je třeba fluorescenčního zařízení a kombinovaného fázového kontrastu. Přítom jsou buňky kontaminace méně zřetelně vybarveny, takže může dojít snadno k jejich přehlédnutí oproti fluoreskujícím buňkám provozního kmene.

Řada autorů se snažila vypracovat kultivační metodu pro zjištění běžné kvasinkové kontaminace droždí použitím vhodné selektivní půdy, na které by byl potlačen rozvoj provozního kmene kvasinek. Tohoto cíle lze dosáhnout jednak přidávkou selektivního inhibitoru, který by potlačoval pouze provozní kmen, jednak tím, že se jako zdroje uhlíku nebo dusíku v používaném živném prostředí volí sloučeniny, jež nejsou provozním kmenem asimilovány, takže jeho růst nemůže nastat. O obtížnosti nalézt vhodný selektivní inhibitor vůči *S. cerevisiae* svědčí práce Beeche a Carra [1955], kteří hledali vhodné selektivní půdy pro zjištění jednotlivých skupin mikroorganismů v jablečných šťávách a cidrech. Z 26 antibiotik a 20 jiných organických sloučenin našli pouze jednu sloučeninu, a to blíže nedefinovanou látku A-228 (výrobce Glaxo Laboratories Ltd, Anglie), která má nižší inhibiční účinek na některé divoké kvasinky (sledováno u *S. fragilis*, *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala*, *Candida utilis* a *Candida mycoderma*) než na *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *elipsoideus* a *S. pastorianus*, takže by této látky mohlo být použito ke zjištění kontaminace droždí jmenovanými divokými kvasinkami. Aktidionu, antibiotika účinného na kvasinky, nemůže být k tomuto účelu použito, neboť *C. utilis*, nejběžnější infekce droždí, je podle Whiffenové [1948] k němu stejně citlivá jako *S. cerevisiae* a řada kvasinek, přicházejících v úvahu jako kontaminace (*Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula*), jsou dokonce mnohem citlivější.

Druhého způsobu, totiž použití jako zdroje výživy těch látek, které jsou kulturními kvasinkami neasimilovatelné nebo hůře asimilovatelné, doporučuje White [1954] pro zjištění kontaminace droždí křísotvornými kvasinkami. Jím navrhovaná metoda, používající půdy s acetátem jako zdrojem uhlíku, umožňuje za určité modifikace pouze semikvantitativní zjištění křísotvorné kontaminace. Rozvoj kulturních kvasinek však zde není úplně potlačen, takže nemůže být použito většího inokula droždí. Levi [1956] inspirován poznatkami Wickerhama a spol. [1948] o asimilaci nejrůznějších zdrojů uhlíku jednotlivými druhy kvasinek, použil k sledování *Oospora lactis* v droždí půdy obsahující jako zdroj uhlíku xylózu nebo jantaran, které nejsou asimilovány kulturními kvasinkami. *Oospora* a divoké kvasinky tvořily na této půdě zřetelné kolonie, přičemž bylo možno použít obrovského inokula droždí (pro zjištění divokých kvasinek až 0,1 g droždí na Petriho misku o průměru 30 cm). Burešová a Řach [1958], prověřující Leviho metodu čárkováním provozních kmenů kulturních kvasinek, zjistili, že oproti údajům Leviho nastává na jantarovém agaru přece jenom růst kulturních droždínských kvasinek, což je pravděpodobně způsobeno výživnými složkami agaru, používaného ke ztužení Leviho

půdy. Nahradili proto agar v Leviho půdě silikagelem a amoniový dusík dusíkem betainovým, který není kulturními kvasinkami asimilován. Vhodnost této modifikované metody potvrdili čárkováním čistých kultur řady kvasinek přicházejících v úvahu jako drožďařská infekce i řady kulturních kvasinek. Ovšem nevýhodou této modifikované metody je dosti zdoluhavá příprava silikagelu, jež neposkytuje záruku aseptické práce.

Při studiu účinku kyseliny jodoctové na metabolismus různých kvasinek jsme zjistili, že divoké kvasinky, přicházející často jako kontaminace drožďařských provozů, jsou podobně jako disociační oxydativní formy provozních kmenů kvasinek [Šilhánková 1958] mnohem odolnější k inhibičnímu účinku kyseliny monoiodoctové na růst než normální buňky provozních kmenů. Jako odolnější ke kyselině jodoctové se ukázaly tyto zkoušené druhy kvasinek (sledováno čárkováním na sladidinový agar o 8⁰Bg a pH 5,8 za přítomnosti 1 až 4 × 10⁻³M koncentrace kyseliny jodoctové): ze sedlinotvorných *Candida utilis*, *C. robusta*, *Torulopsis jamata* (syn. *Torulopsis minor*) a *Debaryomyces hansenii*, z křísotvorných *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. solani*, *Hansenula anomala* a *Pichia membranifaciens*. U *Lipomyces lipoferus* (dříve označováno jako *Torulopsis lipofera*), uváděné jako možná infekce droždí, je odolnost k jodoctové kyselině poněkud nižší než u kandid, avšak je ještě dostačující k rozlišení tohoto rodu od *S. cerevisiae*. Ze zkoušených kvasinek jedině *Saccharomyces exiguus* není možno touto metodou odlišit od provozních kmenů.

Zjistili jsme, že nejvhodnější koncentrace kyseliny jodoctové k rozlišení divokých kvasinek od provozních kmenů *S. cerevisiae* jsou v rozmezí 10⁻³M až 3 × 10⁻³M a vypracovali vhodnou metodu [Šilhánková 1962] pro kvantitativní zjištění kontaminujících kvasinek a nežádoucích buněk provozního kmene s aerobním metabolismem zvýšeným na úkor kvasných schopností.

V předkládané práci je uvedena tato metoda a její ověření na expedičním droždí 6 drožďáren ČSSR spolu s identifikací zjištěných kontaminujících mikroorganismů.

Materiál a metody

1. Zjištění kontaminace droždí buňkami se zvýšeným aerobním metabolismem

a) Použitá živná půda: Jako živné půdy bylo použito sladidinového agaru (8⁰Bg) o pH 5,8 (po sterilaci pH znovu upravováno) za přísady kyseliny monoiodoctové o konečné koncentraci 1 × 10⁻³M, 2 × 10⁻³M a 3 × 10⁻³M. Roztok kyseliny jodoctové byl připravován asepticky do sterilní vody a nebyl před použitím již sterilován. pH tohoto roztoku bylo upraveno pomocí 1 N NaOH na 5,8. Čerstvě připravený roztok kyseliny jodoctové (o koncentraci 4 × 10⁻²M) byl v příslušném množství pipetován do Petriho misek a přelit rozehřátým sladidinovým agarem o teplotě maximálně 45⁰, přičemž celkový objem vzniklé půdy činil 10 ml. Hotové desky byly sušeny asi 20 minut při 50⁰.

b) Příprava kvasničné suspence: Do sterilní baňky obsahu 250 ml byly asepticky na-

váženy asi 3 g droždí, přelity 27 ml sterilní vodo-
vodní vody nebo fyziologického roztoku a po 5-
minutovém stání důkladně roztřepány, aby vznikla
homogenní suspenze. Thomovou počítací komůrkou
byl zjištěn počet buněk v 1 ml suspence a naředěn
asepticky tak, aby v posledních dvou zředěních
bylo 4500 a 1500 buněk v 1 ml.

c) Způsob očkování a inkubace: Na
utuhlé sladidinové agary s různými koncentracemi
jodoctanu bylo pipetováno po 0,1 ml posledních
dvou zředění suspence a pomocí tyčinky vytažené
do kapiláry byla suspenze rozprostřena vždy po
celém povrchu desky. Po vyschnutí (asi 10 minut
při 38⁰C) byly misky inkubovány 2 až 4 dny při
30⁰C.

2. Identifikace jednotlivých kmenů odolnějších ke kyselině jodoctové

byla prováděna podle Lodderové a sp. [1952].

Zkoušky nutné k této identifikaci byly prováděny
takto:

a) Zkvašování cukrů bylo sledováno
v 5% kvasničné vodě s přísadou cukrů o konečné
koncentraci 2% [Hampl a spol. 1958]. Bylo sledo-
váno zkvašování glukózy, sacharózy, maltózy, ga-
laktózy, laktózy, popř. též rafinózy. Zkvašování
těchto cukrů bylo zjištěno z vývoje plynu v Dur-
hamových plynovkách.

b) Asimilace zdrojů uhlíku a dusíku
byla sledována na agarových deskách obsahujících
2 % zdroje uhlíku, 0,1 % zdroje dusíku, 0,1 %
KH₂PO₄ a 0,05 % MgSO₄ · 7 H₂O, pH 6,0 [Hampl
a spol. 1958]. Jako zdroje uhlíku byly sledovány glu-
kóza, galaktóza, sacharóza, maltóza, laktóza a eta-
nol, vesměs za přítomnosti (NH₄)₂SO₄. Z dusíkatých
zdrojů byl sledován NO₃⁻ za přítomnosti glukózy.
Očkováno bylo z kultury na sladidinovém agaru na
povrch desky asimilační půdy obsahující sledované
zdroje uhlíku a dusíku. Všechny vyizolované kmeny
byly v přítomnosti vhodných zdrojů uhlíku a mine-
rálního dusíku schopny intenzivního růstu, což bylo
zjištěno v přítomnosti glukózy a (NH₄)₂SO₄, takže
nebylo třeba přidavku vitaminového roztoku, dpo-
ručovaného Wickerhamem [1946] pro asimilační
testy některých druhů kvasinek.

c) Tvorba spor byla sledována mikroskopic-
ky v preparátech získaných z 3 až 4 týdnů starých
kultur na šikmém sladidinovém agaru, a to z hořej-
ších partií nátěru, tam kde již agar vysychal. Tímto
způsobem byla zjištěna přítomnost spor u kultur-
ních kvasinek všech sledovaných drožďáren.

3. Respirační kvocient na glukóze

pro posouzení aerobního metabolismu vyizolova-
ných kmenů byl stanoven přímou metodou Warbur-
govou při 30⁰C ve fosfátovém pufru o pH 5,8 za
použití 2 mg sušiny buněk pro každou nádobku. Při
stanovení vydýchaného kyslíčnicku uhlíčitého byla
brána korekce na retenci CO₂ ve fermentační kapa-
lině [Kleinzeller a spol. 1954]. Konečná koncent-
race glukózy byla 0,65 %. Odečítání bylo započato
1 h po přidání buněk k reakční směsi. Příprava
kvasničné suspence: 20 ml sladiny o 8⁰Bg a pH 5,2
až 5,3 bylo zaočkováno očkem kultury ze sladino-
vého agaru a inkubováno stacionárně 24 h při 30⁰C.

Celý objem byl převeden do 100 ml sladiny stejného složení a po 20 h inkubaci za třepání (30 °C) převeden do 400 ml sladiny a inkubován za třepání dalších 20 hodin. Získané kvasinky byly odstředěny, promyty několikrát fyziologickým roztokem a naředěny tímto roztokem na koncentraci 4 mg sušiny/ml. Sušina suspence byla stanovena vázkově po sušení při 105 °C do konstantní váhy.

Výsledky

Při zjišťování přítomnosti „divokých“ kvasinek v expedičním droždí šesti droždářů ČSSR bylo zjištěno, že naší metodou, popsanou v kapitole „materiál a metody“, lze bezpečně rozlišit kolonie kontaminace od kolonií normálních forem provozní kultury. Buňky provozního kmene daly v přítomnosti kyseliny jodoctové vznik podstatně menším koloniím než buňky kontaminujících mikroorganismů (obr. 1 a, b, c). Průměr kolonií normálních buněk provozních kmenů byl po 3denní inkubaci při 30 °C na sladinném agaru 3 až 4 mm, zatímco v přítomnosti 1×10^{-3} M koncentrace kyseliny jodoctové byl pouze 0,5 až 1 mm, při 2×10^{-3} M již jen 0,5 mm a méně a při 3×10^{-3} M byly kolonie často jen velmi málo zřetelné. Kontaminující sedlinotvorné kvasinky tvořily při 10^{-3} M koncentraci kyseliny jodoctové kolonie o průměru asi 3 mm, při 2 až 3×10^{-3} M koncentraci pak kolonie o průměru 1,5 až 2 mm. Křísotvorné kontaminující kvasinky a disociací vzniklé drsné formy provozních kmenů kvasinek tvoří v přítomnosti kyseliny jodoctové kolonie ještě podstatně větší, než jsou kolonie sedlinotvorné kontaminace. Kolonie křísotvorných kvasinek jsou na tuhém substrátu snadno rozlišitelné svými nízkými matnými koloniemi a drsným až vráščitým povrchem. Při 3×10^{-3} M koncentraci kyseliny jodoctové dochází již někdy ke značnému poklesu počtu kolonií kontaminujících mikroorganismů, který se projevuje ještě patrněji při vyšších koncentracích této kyseliny. Počet kolonií provozních kultur značně poklesl již při koncentraci 1×10^{-3} M kyseliny jodoctové. Z těchto důvodů pokládáme za směrodatný počet buněk kontaminantů zjištěný při 1 až 2×10^{-3} M koncentraci kyseliny jodoctové vztažený na celkový počet kolonií, narostlý za nepřítomnosti jodoctové kyseliny.

Kolonie sedlinotvorných kontaminujících kvasinek byly zjištěny zkušeným okem většinou i na deskách sladinného agaru bez přídavku kyseliny jodoctové především poněkud odlišnou barvou (byly vždy trochu šedavější), vyšším leskem, a jakoby vyšší průsvitností, avšak zjištěný počet kolonií kontaminujících kvasinek byl za těchto podmínek vždy nižší než v přítomnosti kyseliny jodoctové (viz tabulku 1). Hlavním důvodem je pravděpodobně silný rozvoj kolonií provozního kmene, který potlačí rozvoj kolonií kontaminujících kvasinek. Dále k tomu může přispět fakt, že v některých případech je rozlišení obou typů kolonií dosti obtížné, především při nedostatečné velikosti kolonií (pod 2 mm v průměru).

Identifikací kmenů tvořících větší hladké kolonie v přítomnosti jodoctanu a průsvitnější a šedavější kolonie za jeho nepřítomnosti bylo zjištěno, že ve všech případech jde o příslušníky druhu *Candida utilis*, který se od provozních kmenů *S. cerevisiae* liší především neschopností tvořit askospory, zkvašovat maltózu a galaktózu a v asimilaci nitrátů (viz tabulku 2). Opakovanými testy bylo zjištěno, že *C. utilis* je jedinou sedlinotvornou kontaminací droždí všech sledovaných droždářů.

Křísotvorná kontaminace byla identifikována ve většině případů jako *Candida krusei*, pro níž je charakteristická schopnost zkvašovat i asimilovat pouze glukózu. U droždárny III. se vyskytovaly vedle poměrně vyššího obsahu křísotvorných kvasinek reprezentovaných většinou *Candida krusei* též typy s bradavčitými nebo slabě zvrásněnými koloniemi, tvořící přechod mezi sedlinotvornými a křísotvornými typy kvasinek. U žádných z nich nebyly nalezeny spory. Některé z těchto přechodných typů se kvasnými i asimilačními schopnostmi až na neschopnost zkvašovat galaktózu, jež je však pozorována i u některých sbírkových kmenů, shodovaly s *Candida tropicalis* (tabulka 2), jež jsou totožné s kvasnými a asimilačními schopnostmi *S. cerevisiae*, u jiných byla omezena až úplně odstraněna schopnost zkvašovat maltózu, což by odpovídalo *C. solani*, u jiných byla omezena i asimilace maltózy, u dalších byla poněkud snížena ještě schopnost zkvašovat sacharózu, u některých dokonce sacharóza zkvašována nebyla vůbec a asimilována

a) 10^{-3} M kyseliny jodoctové

b) 2×10^{-3} M kyseliny jodoctové

c) 3×10^{-3} M kyseliny jodoctové

Obr. 1. Zjištění kontaminace pekařského droždí pomocí kyseliny monojodoctové

Použito droždí droždárny označené I. Inkubace probíhala 3 dny při 30 °C. Drobné kolonie přísluší provoznímu kmenu, větší kolonie náleží *C. utilis*

Tabulka 1

Zjištění kontaminace expedičního droždí

Označení droždí	Počet kolonií na sladnovém agaru o koncentraci kyseliny jodotové:															% kontaminace				křísotvorné kvasinky (čárkovací metodou)					
	0					10 ⁻³ M					2 X 10 ⁻³ M					3 X 10 ⁻³ M									
	kontaminace		provozní- ho kmene			kontaminace		provozní- ho kmene			kontaminace		provozní- ho kmene			kontaminace		provozní- ho kmene							
	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy							
	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy	sedlino- tvorné	křiso- tvorné	přech. typy							
I.	859 798	34	0	0	0	720 759	66 48	0	0	0	548 556	68 58	0	0	0	497 510	53 48	0	0	0	0	0	0	0	
	805	119	0	0	0	685	165	17	0	0	549	137	3	0	0	246	21	1	0	0	0	0	0	+	
II.	339	38	0	0	0	334	42	1	0	0	320	42	1	0	0	133	2	1	0	0	0	0	0	+	
	846 585	75	0	0	0	732 505	95 57	1	0	0	500 408	84 56	0	0	0	455 385	77 62	0	0	0	0	0	0	0	++
III.	344 175	186 120	0	0	0	224 157	194 128	0	0	0	127 112	188 105	0	0	0	nezře- telné	169 122	0	0	0	0	0	0	0	++
	332 108 119	332 108 119	0	0	0	180 71 72	90 21 32	0	0	0	168 73 75	84 23 30	0	0	0	nezře- telné	88 23 33	1 0 0	0	0	0	0	0	0	+++
IV.	820	24	24	8	665	12	21	8	507	13	22	8	nezře- telné	20	20	7	1	1,5—2,5 %	2,5 %	1 %	+				
	237 104	9	11 3	20 7	174 74	9 3	10 4	19 7	170 67	7 4	10 4	20 8	nezře- telné	5 0	7 3	14 7	3,5 % 3,5 %	3,5 % 3,5 %	7 % 6—7 %	++					
V.	1030	39	39	25	768	42	35	25	735	43	36	24	598	36	37	11	4 %	3,5 %	2—2,5 %	+					
	48 153	11 20	0	0	0	41 140	12 32	0	0	0	35 120	10 28	0	0	0	nestanoven o		17,0—20,0 % 15,5—17,5 %	0 0	0 0	0	0	0	0	
VI.	497 237	0	0	0	320 105	23 13	0	0	0	172 64	26 15	0	0	0	0	nezře- telné	8 0	0	0	0	0	0	0	0	++

Výsledky jsou průměry dvou paralelních stanovení. Vodorovné čáry oddělují jednotlivé vzorky expedičního droždí.

Tabulka 2

Srovnání některých biochemických a morfologických vlastností provozního kmene a kontaminujících kvasinek

	Provozní kmene <i>S. cerevisiae</i>	Sedlinotvorná kontaminace (<i>C. utilis</i>)	Kmeny křísotvorné a přechodné							
			(<i>C. krusei</i>)				(<i>C. solani</i>)		(<i>C. tropi- calis</i>)	
Z k v a š o v á n í	Glukóza	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Sacharóza	++++	+++ až ++++	0	0	++ až ++	++++	++++	++++	++++
	Maltóza	++++	0	0	0	0	0	0	++++	++++
	Rafinóza	++	++	0	0	0	0	0	0 až ++	0 až ++
	Galaktóza	+++	0	0	0	0	0	0	0 až ++	0 až ++
	Laktóza	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A s i m i l a c e	Glukóza	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Sacharóza	++++	++++	0	++	++ až +++	++++	++++	++++	++++
	Maltóza	++++	++++	0	0	0	++++	++++	++++	++++
	Galaktóza	++++	0	0	0	0	+++	0	+++	+++
	Laktóza	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KNO ₃	0	++++	0	0	0	0	0	0	0
	Růst v kapalině	sedlina	sedlina	sedlina s prstencem nebo křís	křís	křís	sedlina nebo křís	sedlina nebo křís	sedlina nebo křís	sedlina nebo křís
	Nátěr na agaru	hladký, lesklý	hladký lesklý někdy okraj rýhovaný	zvrásněný lesklý až drsň křídovitý	drsň křídovitý	drsň křídovitý	zvrásněný až drsň křídovitý	zvrásněný až drsň křídovitý	zvrásněný až drsň křídovitý	zvrásněný až drsň křídovitý
	Tvorba spor	+	0	0	0	0	0	0	0	0

Očkováno z nátěru na sladidlovém agaru a zkoušky sledovány po 3 dnech inkubace při 30 °C, u negativních výsledků inkubováno další 2 dny.

pouze slabě. Některé z těchto kmenů (tabulka 2) nelze pro tyto jejich biochemické vlastnosti zařadit k žádným popsaným nesporeotvorným druhům kvasinek a sporeotvorným zase neodpovídaly morfologicky. Protože podobné postupné snižování kvasných schopností v přítomnosti maltózy nebo sacharózy jsme zjistili u drsných forem *S. cerevisiae* vzniklých disociační kultury [Šilhánková 1957 a], u nichž však byla zachována schopnost sporulace, domníváme se, že v tomto případě jde rovněž o disociační formy provozní kultury. Pro tuto možnost svědčí též okolnost, že ze vzorků této droždárny byly získány kultury s téměř spojitou řadou biochemických i morfologických vlastností od plných zkvašovací a asimilační schopností a poměrně hladkých lesklých kolonií ke schopnostem velmi omezeným, což se v morfologii projevilo postupným zvrásňováním kolonií a přítomností protáhlých bu-

něk až myceliovitých útvarů. Podobná situace byla, i když v menší míře, zjištěna též u droždárny označené IV. U droždárny II., u níž se vyskytovaly křísotvorné typy jen sporadicky, byly rovněž zjištěny kmeny, jež není možno zařadit ke známým druhům a jež můžeme pokládat za disociační formy provozní kultury. Pro rychlé bezpečné rozlišení disociačních forem provozních kultur od kontaminujících druhů zatím nemáme vhodné metody. Určitým ukazatelem zde snad může být vyšší citlivost drsných forem vzniklých disociační ke kationaktivním saponátům [Šilhánková 1957 b], avšak tato zkouška není jednoznačná, neboť podobně se chovají i některé křísotvorné kvasinky, jak bylo zjištěno u *Pichia membranaefaciens* a *Candida krusei*, zatímco jiné z křísotvorných, např. *Hansenula anomala* a *Candida tropicalis* jsou k těmto látkám poměrně odolné. Kmeny pokládané za disociační formy, vy-

izolované z droždí závodů označených III. a IV. vykazovaly vesměs vyšší citlivost k inhibičnímu účinku kationaktivního saponátu Ajatinu než normální provozní kvasinky. Přitom křísotvorné typy, se silně zvrásněnými koloniemi, u nichž pokládáme disociaci za nejpokročilejší, byly stejně citlivé jako typické drsné formy kvasinek, které jsme vyizolovali z lihovarských a vlnářských kvasinek [Šilhánková 1957 b], kdežto typy sedlinotvorné, u nichž se počínající disociace projevuje prodlužováním buněk a pouze mírně zvrásněným okrajem kolonií, byly k Ajatinu poněkud odolnější než drsné formy kvasinek. Přitom např. kmeny izolované ze zkoušeného droždí a podle biochemických vlastností odpovídající *C. tropicalis*, nebyly tak odolné k Ajatinu jako sbírkové kmeny *C. tropicalis*, nýbrž byly stejně citlivé jako drsné disociační formy. Ovšem tento důkaz není úplně průkazný, neboť jsme neměli dostatek sbírkových kmenů *C. tropicalis*, abychom mohli posoudit, zda všechny vykazují zjištěnou odolnost k Ajatinu. Jako důkaz, že jde o křísotvorné nebo přechodné typy vzniklé disociací provozní kultury je vhodné několiknásobné (až 15násobné) pasážování těchto typů v tekuté sladince, které většinou postačí alespoň k částečné regeneraci jejich původních vlastností.

Nežádoucnost disociačních forem v pekařském droždí je patrná především z toho, že mají za přítomnosti vzduchu velmi nízkou glykolytickou aktivitu i na nejsilněji zkvašovaném cukru, tj. glukóze, jak je zřejmé z jejich respiračních kvocientů, v čemž se vyrovnají nežádoucí *C. utilis*. Respirační kvocienty, tj. poměr uvolněného CO_2 ke spotřebovanému kyslíku disociačních forem lihovarského provozního kmene *S. cerevisiae* i kmenů *C. utilis* vyizolovaných z pekařského droždí, jsou uvedeny v tabulce 3.

Pokud jde o kvantitativní zastoupení kontaminace v expedičním droždí (tabulka 1), je zřejmé, že znepokojující je především poměrně vysoký výskyt

Tabulka 3

Respirační kvocienty jednotlivých kmenů kvasinek

Zkoušený kmen	Respirační kvocient na glukóze
Provozní kmen <i>S. cerevisiae</i> droždárny I.	2,0–2,2
Provozní kmen <i>S. cerevisiae</i> droždárny II.	4,0–4,3
Kmen <i>C. utilis</i> vyizolovaný z droždí droždárny I.	1,1
Kmen <i>C. utilis</i> vyizolovaný z droždí droždárny II.	1,2
Provozní kmen lihovarský	4,5–4,7
Drsná forma provozního kmene lihovarského	1,1–1,2

C. utilis, která, jak již bylo uvedeno, má značně nepříznivý vliv na jakost droždí. Podle Plevako a Givartovského [1949] dobré droždí s dobou kynutí 50 až 65 minut neobsahuje obvykle více než 1 až 2 % sedlinotvorné kontaminace, zatímco křísotvorná kontaminace může dosáhnout až 15 %. U 6 vzorků z 11 sledovaných vzorků expedičního droždí byla zjištěna kontaminace *C. utilis* do výše 10 % (u droždářen III., IV., VI.), která je podle těchto autorů charakteristická pro droždí střední jakosti. Zbývající vzorky vykazovaly vyšší kontaminaci *C. utilis*, přičemž u droždárny označené II., u níž jsou často pozastávky na jakost droždí ze strany pekárů, byla zjištěna kontaminace *C. utilis* přes 35 % (počítáno na celkový počet buněk). Pokud jde o křísotvorné kvasinky, je situace podstatně lepší. Kvantitativně byla zjištěna pouze u dvou droždářen (III., IV.), přičemž v žádném případě nebyla překročena hranice 15 %, kterou Plevako a Givartovskij [1949] uvádějí jako přípustnou pro droždí dobré jakosti. U ostatních droždářen byla křísotvorná kontaminace zjištěna jen sporadicky. Tato příznivá situace je pravděpodobně dosažena díky větší morfologické odlišnosti křísotvorné kontaminace od provozního kmene, ať už jde o protáhlé buňky a přítomnost pseudomycelia nebo o vzhled kolonií. U sedlinotvorné kontaminace není tak markantních morfologických rozdílů od provozních kmenů *S. cerevisiae*, takže dosud mohla její přítomnost droždářským pracovníkům snadno uniknout.

Pro zjištění velmi nízké kontaminace křísotvornými kvasinkami se nám osvědčilo čárkování suspenze droždí (3 g droždí ve 27 ml sterilní vody) zředovací metodou na sladinový agar s 2×10^{-3} M až 4×10^{-3} M koncentracemi kyseliny jodoctové, kdy rozvoj ostatních kvasinek je již značně potlačen. Křísotvorné kvasinky rostly v tomto případě ve formě široce se rozrůstajících kolonií na počátku náteru. Tento způsob zjištění křísotvorných kvasinek je podle našich analýz mnohem citlivější než metoda uváděná Whitem [1954]. U Whiteovy metody nedochází totiž k tak značnému potlačení provozního kmene kvasinek, který pak při hustším zásevu nedovoluje rozvoj kontaminujících mikroorganismů. Čárkovací metodou byla zjištěna nepřítomnost křísotvorných kvasinek pouze u dvou vzorků (I. a V. droždárna).

Rozbory kontaminace droždí uvedené v tabulce 1 ukazují, že kolísání výsledků je většinou v rozmezí 2 % (počítáno na celkový počet buněk). Bezpečně zjištělná je kontaminace již o minimální výši 1 %, neboť při paralelních stanoveních jsou při zhruba 400 koloniích na misce 4 kolonie kontaminace dobře patrné. Pro křísotvorné kvasinky lze citlivost zjištění ještě zvýšit čárkovací modifikací, přičemž však již nejde o jejich kvantitativní stanovení. Dvojí zředění (4500 buněk/ml a 1500 buněk/ml) pro výsev volíme proto, že běžné počítací komůrky pro svůj vysoký přepočítávací faktor (4×10^6) neskýtají začínajícímu pracovníku jistotu, že se na misce dosáhne při jednom zředění optimální počet kolonií, tj. 350 až 450. Původně používaná koncentrace (kolem 800 kolonií na misce) umožňuje poměrně přesné zjištění absolutního počtu buněk kontaminace při jejím nižším výskytu, avšak nezaručuje přesné

stanovení počtu buněk provozního kmene, k jehož stanovení by bylo třeba dalšího zředění. Není-li počítací komůrka k dispozici, je možno pomocné počítání buněk vypustit a nahradit vyočkováním několika ředění suspense na Petriho misky tak, aby chom měli jistotu, že zachytíme na miskách ředění dávající vznik 120 až 500 kolonií. Tento způsob má ovšem za následek větší spotřebu nádobí a živných půd. V každém případě je však třeba bezpodmínečně dodržeti uvedený způsob očkování, tj. rozstírání suspense po povrchu utužené půdy. V případě rozmíchání suspense kvasinek do ztekucené půdy totiž dochází ke vzniku různě velkých kolonií podle toho, jak hluboko v půdě jsou kolonie uloženy a jaký je tedy přísun kyslíku ke koloniím.

Navrhovaná metoda dovoluje zjistit velkou většinu druhů kvasinek uváděných v literatuře jako možná kontaminace droždí. Podle našeho zjištění se vymyká těmto možnostem pouze *Saccharomyces exiguus* podobně jako je tomu u metody Burešové a Řacha [1958]. *Torulopsis dattila* uváděná jako možná kontaminace droždí [Plevako a Givartovskij, 1949] nebyla sledována, neboť je nám nedostupná, avšak dá se předpokládat, že se bude chovat obdobně jako *Torulopsis famata* (dříve uváděná jako *Torulopsis minor*), která naší metodou zjistitelná je. Pro orientační zjištění, zda buňky, tvořící větší hladké kolonie v přítomnosti kyseliny jodoctové, přísluší druhu *C. utilis*, doporučujeme tyto zkoušky (viz tabulku 2): zkvašování sacharózy a maltózy a asimilace dusičnanů. Při sledování asimilace je na jednu Petriho misku možno současně načárkovat 8 kultur.

Nežádoucí disociační formy provozní kultury, at už jde o přechodné, tj. sedlinotvorné formy s koloniemi lesklými, jen mírně zvrásněnými nebo o drsné křísotvorné formy, se chovají podobně jako kontaminující kvasinky.

Navrhované metody s kyselinou jodoctovou lze použít nejen pro expediční droždí, ale i pro zákvasy a jednotlivé generace a popř. pro prověření čistoty zásobní provozní kultury udržované v laboratoři drožďárny. Ve všech těchto případech stačí pouze zjistit počet buněk v 1 ml dozrávajcího zákvasu nebo kultury na sladnině a naředit je na příslušnou koncentraci buněk (tj. asi 4500 buněk/ml a 1500 buněk/ml) a zaočkovat uvedeným způsobem na desky sladinného agaru s kyselinou jodoctovou.

Této metody lze rovněž použít pro hrubé zjištění přítomnosti buněk *S. cerevisiae* v torulovém krmném droždí. Jde ovšem jen o orientační zjištění, neboť získané výsledky budou nižší než skutečný stav kontaminace, avšak vzhledem k tomu, že zatím není vypracována vhodná metoda pro zjištění kontaminace torulového droždí, může být i toto hrubé přiblížení užitečnou pomůckou pracovníkům v provozu.

Shrneme-li dosažené výsledky, vidíme, že nová metoda zjištění nežádoucích kvasinek v pekařském droždí se plně osvědčila. Identifikačními testy bylo prokázáno, že všechny kolonie označené v přítomnosti kyseliny jodoctové jako kontaminace patřily skutečně příslušníkům kontaminujících druhů nebo nežádoucím disociačním formám provozního kme-

ne. Nevýhodou metody je neschopnost rozlišení křísotvorné kontaminace od disociačních forem provozní kultury a neschopnost zjištění *S. exiguus*, jež bývá uváděna jako možná infekce pekařského droždí. Přednost metody je především v bezpečném zjištění druhu *C. utilis*, který se morfologicky příliš neodlišuje od provozních kmenů, avšak velmi nepříznivě ovlivňuje jakost droždí. Tím je dána do rukou drožďáren i kontrolních laboratoří jednoduchá metoda pro rychlé zjištění kontaminace droždí, jejíž potřebnost se jeví právě pro poměrně vysoký výskyt nežádoucí *C. utilis* ve výrobcích několika našich drožďáren.

Souhrn

Je popsána jednoduchá metoda pro zjištění kontaminace droždí křísotvornými i sedlinotvornými divokými kvasinkami a pro zjištění přítomnosti disociačních forem provozní kultury. Princip metody spočívá v potlačení rozvoje provozního kmene kvasinek působením kyseliny jodoctové. Metoda, která umožňuje zjistit kontaminaci sedlinotvornými kvasinkami ve výši minimálně 1 % a u křísotvorných kvasinek při ještě nižším rozsahu kontaminace, byla prověřena na expedičním droždí 6 drožďáren ČSSR. Její pomocí bylo zjištěno, že nejběžnější kontaminace našeho droždí je způsobena *C. utilis*, jejíž buňky činí 5 až 35 % všech buněk. Kontaminace křísotvornými kvasinkami je mnohem vzácnější a je reprezentována hlavně *C. krusei*. Kromě toho byly u dvou drožďáren zjištěny kolonie odpovídající pravděpodobně disociačním formám provozní kultury. Protože přítomnost *C. utilis* značně ovlivňuje jakost droždí, je přezkoušená metoda doporučována jako kontrolní metoda k posouzení jakosti droždí. Současně jí může být použito ke kontrole čistoty jednotlivých stupňů výroby droždí i k prověření zásobní provozní kultury.

Literatura

- [1] Beech F. W., Carr J. G.: A survey of inhibitory compounds for the separation of yeast and bacteria in apple juices and ciders. J. Gen. Microbiol. 12, 85–94 (1955).
- [2] Burešová B., Řach P.: Elektivní půda pro zjištění kvasinkovitých infekcí v drožďárství. Kvasný prům. 4, 60 (1958).
- [3] Hampl B., Málek J., Šilhánková L.: Návod k mikrobiologickému cvičení, Praha 1958.
- [4] Grégr V.: Chemie a technologie drožďárství. Praha 1957.
- [5] Kunz Ch., Klaushofer H.: Purity control of the production of baker's yeast employing a fluorescent serum. Applied Microbiology 9, 469–471 (1961).
- [6] Kleinzeller A., Málek J., Vrba R.: Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii. Praha 1954.
- [7] Levi J. D.: Improved media and methods for the estimation of infecting organism in baker's yeast. J. Inst. Brew. 62, 261–264 (1956).
- [8] Lodder J., Kreger van Rij N. J. W.: The Yeasts. Amsterdam, 1952.
- [9] Plevako E. A., Givartovskij R. V.: Technologija drožževogo proizvodstva. Moskva 1949.
- [10] Šilhánková L.: Působení povrchově aktivních látek na drsné a hladké formy kvasinek. Kandidátská disertační práce. Praha 1957a.
- [11] Šilhánková L.: Působení povrchově aktivních látek na drsné a hladké formy kvasinek. Čs. mikrobiologie 2, 193–202 (1957b).
- [12] Šilhánková L.: Disociace kvasinek. Příloha časopisu Kvasný průmysl, seš. 4, 1–6 (1958).
- [13] Šilhánková L.: A new method of quantitative determination of contamination of baker's yeast by wild yeasts or by dissociation forms of the production culture. Folia microbiologica. V tisku.
- [14] Whiffen A. J.: The production assay and antibiotic activity of actidione. J. Bact. 56, 283–91 (1948).
- [15] White J.: Yeast Technology. London 1954.
- [16] Wickerham L. J.: A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. J. Bact. 52, 293–301 (1946).
- [17] Wickerham L. J., Burton K. A.: Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. J. Bact. 56, 363–371 (1948).

Došlo do redakce 14. 3. 1962.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАРАЖЕНИЯ
ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ
ДИКИМИ ДРОЖЖАМИ
И ДИССОЦИАЦИОННЫМИ ФОР-
МАМИ ОСНОВНОГО ШТАММА

В статье описывается новый метод определения заражения дрожжей дикими дрожжами вызывающими цвель и осаживание. Принцип метода заключается в подавлении деятельности основного штамма иодуксусной кислотой. Метод был проверен на шести дрожжевых заводах. Это можно рекомендовать для контроля дрожжей в разных фазах производства, а также для проверки состояния чистоты складываемых запасных культур.

ERMITTLUNG DER BACKHEFEKONTAMINATION DURCH „WILDE“ HEFEN UND DISSOZIATIONSFORMEN DES BETRIEBSSTAMMES

Es wird eine Methode zur Ermittlung der Kontamination durch Kahmhaut- und Bodensatz-bildende wilde Hefen beschrieben. Das Prinzip der Methode besteht in der Unterdrückung des Betriebs-Hefestammes mittels Jodessigsäure. Die Methode wurde auf der Expeditionshefe in 6 tschechoslowakischen Hefefabriken erprobt. Das Verfahren kann auch zur Kontrolle der einzelnen Hefeproduktionsstufen und der Reinheit der Reserve-Betriebskultur benutzt werden.

ASCERTAINING THE CONTAMINATION OF BAKER'S YEAST BY WILD YEAST AND DISSOCIATING FORMS OF WORKING YEAST

The article deals with a new method which has been developed for ascertaining the contamination of standard, working yeast by wild strains causing sedimentation and floating mould films. The method is based on subduing the standard, working strain by iodacetic acid. The suggested method was applied successfully and verified at 6 yeast plants. It could be used also for routine checking at various production stages, as well as for ascertaining the condition of stored supplies of standard strain yeast.