

Stárnutí a zrání pekařského droždí

(Poznatky ze studia metody stanovení trvanlivosti droždí zkouškou na ztekucení při teplotě 35 °)

RADOVAN KUBÍČEK a ZDENĚK POTĚŠIL, Severomoravské lihovary a konzervárny, n. p., Olomouc

664.642/646

Některé neshody mezi výsledky stanovení trvanlivosti pekařského droždí obvyklou zkouškou na ztekucení v Petriho misce při 35 °C a skutečnou trvanlivostí zkoušeného droždí při běžné laboratorní teplotě, vedly autory k hlubšímu rozboru uvedené metody. Bylo přitom zjištěno, že výsledky stanovení často velmi podstatně závisí na stáří a vyžrání zkoušeného vzorku. Závislosti mezi stářím vzorků a nálezy měly neočekávaně rozmanitý průběh. Podle názoru autorů jde o různé stavy enzymatické aktivity droždí pro různý stupeň vyžrání kvasínek při výrobním procesu.

Trvanlivost pekařského droždí je jedním z významných znaků jeho jakosti. Přes tento fakt je spolehlivý a především rychlý způsob stanovení trvanlivosti droždí dosud nevyřešen. Hlavní nedostatek většiny používaných metod stanovení trvanlivosti je v tom, že jejich provedení je zdlouhavé; údaje o trvanlivosti expedovaného zboží jsou vlastně zjišťovány dodatečně. Při prodeji droždí není proto nikdy bezpečně jasno, s jakou trvanlivostí je výrobek dodáván na trh.

Dalším nedostatkem metod stanovení trvanlivosti je jejich omezená spolehlivost. Např. některé způsoby celkem se osvědčující v jedné výrobě, zcela selhávají v jiné. Tak např. způsob vypracovaný *dr. Berganderem*, spočívající na stanovení rychlosti úbytku glykogenu při 35 °C jódovým roztokem [1]. Jindy se objevuje nápadný nesouhlas mezi výsledky stanovení a skutečnou trvanlivostí. Zhodnotíme-li celkově objektivnost metod, sloužících současně ke stanovení trvanlivosti droždí, musíme konstatovat,

že jediným skutečně spolehlivým způsobem stanovení je prosté sledování stárnutí volně uložených liberek droždí při laboratorní teplotě a určení doby, po níž drožďová hmota výrazně změkne nebo ztekucuje — tedy projevuje výrazné známky autolýzy.

Tato práce se zabývá rozбором nesouhlasu mezi skutečnou trvanlivostí a nálezy jedné z nejužívanějších metod, donedávna považované za jednu z nejspolehlivějších, a to zkouškou na ztekucení v Petriho misce při 35 °C. Tohoto způsobu se v současné době užívá prakticky ve všech drožďárnách v ČSSR. K dosažení výsledku vyžaduje doby 3 až 8 dní, je však velmi jednoduchý a ve většině případů dává dosti spolehlivé výsledky. Někdy však i tento způsob selhává. Proč je tomu tak, zjistili jsme během dlouhodobého sledování trvanlivosti a vlastností droždí v drožďárně v Olomouci-Pavlovicích. Čas od času jsme pozorovali, že droždí, jinak se zcela normálními znaky, vyráběné pomocí osvědčené a dobře adaptované kultury, za běžné labora-

torní teploty uspokojivě trvanlivé (měknoucí při teplotě 20 až 25 °C po 14 až 20 dnech) se ztekucovalo při zkoušce trvanlivosti v termostatu při 35 °C již po 40 až 50 hodinách. Lyžát měl příjemnou droždovou vůni a byl pouze nepatrně kontaminován bakteriemi. Při mikroskopickém vyšetřování ztekuceného droždí většina buněk byla vzhledově zcela nepoškozena. Pouze část buněk byla plazmolizována. Dalo se předpokládat, že nešlo o žádný exogenní účinek, např. kontaminujících mikroorganismů, nýbrž o vlastnost vyrobeného droždí. Tento jev se nápadně až masově opakoval v létě a na podzim 1954, v dalších letech se vyskytoval vysloveně sporadicky a zcela nepravidelně.

Při hledání příčin této náhlé autolýzy jsme kromě jiného podrobili jednoduchému statickému vyšetřování i závislost výsledků zkoušky trvanlivosti droždí na ztekucení v Petriho misce při 35 °C, a to na stáří vzorku uchovávaného volně na vzduchu při laboratorní teplotě. Zjistili jsme přitom na 100 sledovaných případech pozoruhodné variace v chování droždí, jež vysvětlují časté neshody mezi výsledky měření v továrních laboratořích a laboratořích zkušebních ústavů. O podobném vyšetření chování droždí jsme v běžně dostupné literatuře nenašli zmínky.

Materiál a metodika

Vyšetřováno bylo běžné expediční droždí v liberkách. Většina nálezů pochází z výroby roku 1954, zbytek z roku 1955. Veškeré vyšetřené droždí pocházelo z výroby drožďárny v Olomouci-Pavlovičkách. V uvedeném období mělo významné procento droždí sklon k výše popsané rychlé autolýze při 35 °C.

Zkouška trvanlivosti pekařského droždí na ztekucení se v současné době provádí běžně tak, že se pozoruje v 12hodinových intervalech 12 až 15 mm silný řez z liberky droždí, zabalený do pergaminu a vložený do Petriho misky v termostatu, vyhřátém na 35 °C, až do doby, kdy se projeví výrazné znaky autolýzy změknutím a konečně ztekucením vzorku [2]. V našem případě jsme postup obměnili vypuštěním balení řezu droždí do pergaminu. Ověřili jsme současně, že se tímto autolýza poněkud urychlí, avšak nijak neovlivní reprodukovatelnost stanovení. Reprodukovatelnost výchozích nálezů byla několikrát ověřena tak, že celá liberka droždí byla rozřezána na 8 až 9 řezů 12 až 15 mm silných, a souběžně stanovena jejich trvanlivost v Petriho miskách. V naprosté většině případů vzorky autolyzovaly ve stejné době; rozdíly činily nejvýše 24 hodin. Větší odchylka je výjimkou. Pravděpodobná chyba činí 10 až 12 hodin, což pro uvedené účely zcela vyhovuje.

U každé zkoušené liberky byl veden záznam takovým způsobem, že byla podchycena jednak doba volného uložení liberky při laboratorní teplotě, po jejímž uplynutí byl řez z liberky v Petriho misce vložen do termostatu, jednak doba, v níž došlo k jeho ztekucení. Jak je zřejmo z uvedených protokolů, křivka, tvořící spojnici bodů udávajících čas, kdy došlo k autolýze jednotlivých vzorků, vyjadřuje časovou závislost mezi délkou doby uložení vzorku droždí při laboratorní teplotě a výsledkem zkoušky trvanlivosti.

U části vzorků droždí byla prováděna vedle uvedeného stanovení časové závislosti ještě některá stanovení pomocná. Ze vzorku v Petriho misce bylo denně odebíráno 1,5 g droždí, jehož bylo užito k přibližnému stanovení glykogenu a ke stanovení aminodusíku formolovou titrací.

Glykogen byl určován tzv. glykogenovým testem podle Bergandera [1] na základě zbarvení vyvolaného roztokem jódu, a jeho množství bylo vyjádřeno čísly barevné škály. Test byl pro tento účel modifikován pro 1/2 g droždí.

Na 1 g droždí bylo prováděno stanovení aminodusíku formolovou titrací. Toto množství droždí bylo rozptýleno v 15 ml dest. vody, po přidavku 10 kapek roztoku fenolftaleinu (1%) rychle vytitrováno 0,04 N KOH do růžového zbarvení a po přidavku 5 ml 20% roztoku formaldehydu, předem neutralizovaného na fenolftalein, rychle dotitrováno z mikrobyrety tímtež roztokem KOH do růžového zbarvení téže intenzity. Při těchto pomocných stanoveních šlo o určení přibližná, dovolující odhadnout rozsah změn ve zkoušeném vzorku. Spotřeba 0,04 N KOH je velmi ovlivněna přítomnými kvasinkami. Přesto lze však tímto způsobem dosáhnout po krátkém zapracování dobře reprodukovatelných výsledků, pracujeme-li dostatečně rychle. [V protokolech je aminodusík udán v ml 0,04 N KOH spotřebovaných na 1 g vzorku.]

Výsledky

Podstatou stanovení trvanlivosti zkouškou na ztekucení je předpoklad, že ve zkoušeném droždí proběhnou při zvýšené teplotě přiměřeně rychleji obdobné děje, jaké normálně probíhají ve stárnoucím droždí za obvyklé venkovní nebo laboratorní teploty, čili že máme před sebou zkrácený obraz skutečné trvanlivosti. Tento předpoklad se snad shoduje ve většině případů se skutečností, rozhodně však ne vždy. V údobí našich zkoušek se osvědčil jako správný pouze u 44 % případů. Místo, aby ve shodě s uvedeným předpokladem hodnoty jednotlivých nálezů trvanlivosti u postupně odebíraných vzorků z téže liberky zvolna klesaly, byly u 56 % případů nalezeny závislosti značně složitější. Jako příklad uvádíme 3 z protokolů.

1. Droždí, jevící průměrnou trvanlivost

Čís. kádě: 1118		Lisováno 20. 9. 1954, vzorek vzat 20. 9. 1954									
Den vložení do termos. 35 °C	Pomocná stanovení	Nálezy v jednotlivých dnech zkoušky									
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	
20. 9.	glykogen	8	4	3	3	2	A				
	dušik	0,4	0,7	0,7	0,6	2,0					
22. 9	glykogen	7	4	3	1	A					
	dušik	0,2	0,4	1,5	2,5						
24. 9	glykogen	5	3	—	3	3	3	3	3	2	A
	dušik	0,2	0,2	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	4,7	
27. 9	glykogen	5	4	4	3	2	2	A			
	dušik	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	5,3				
29. 9.	glykogen	5	3	3	2	A					
	dušik	0,4	0,2	1,1	3,7						
1. 10.	glykogen	4	3	2	A						
	dušik	0,3	0,3	2,2							

A : den výrazné autolýzy vzorku

2. Droždí rychle autolyzující při termostátové zkoušce

Čís. kádě: 1133 Lisováno 23. 9. 1954, vzorek odebrán 23. 9. 1954

Den vložení řezu do term. 35 °C	Pomocná stanovení	Nálezy v jednotlivých dnech zkoušky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
23. 9.	glykogen	8	3	2				
	dusík	0,4	1,6	2,5				
25. 9.	glykogen	8	4	3	3	2	2	2
	dusík	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,8	9,2
27. 9.	glykogen	6	4	4	3	3	2	
	dusík	0,2	0,2	0,2	0,2	1,1	4,2	
29. 9.	glykogen	5	4	3	1			
	dusík	0,3	0,2	0,2	3,3			
1. 10.	glykogen	4	3	2				
	dusík	0,3	0,3	1,1				

3. Droždí rychle autolyzující, z téže výrobní partie jako v případě 2., pokusná liberka však byla uložena místo při laboratorní teplotě v chladnici při 3–5 °C

Číslo kádě: 1133 Lisováno 23. 9. 1954, vzorek odebrán 23. 9.

Den vložení řezu do term. 35 °C	Pomocná stanovení	Nálezy v jednotlivých dnech zkoušky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
23. 9.	glykogen	8	3	2				
	dusík	0,4	1,6	2,5				
25. 9.	glykogen	7	4	3	3			
	dusík	0,4	0,3	0,4	3,0			
27. 9.	glykogen	7	4	4	3	3	3	2
	dusík	0,5	0,2	0,3	0,5	0,5	0,7	7,0
29. 9.	glykogen	6	4	3	3	2		
	dusík	0,4	0,4	0,3	0,4	5,5		
1. 10.	glykogen	5	3	2	2			
	dusík	0,8	0,4	0,6	3,2			
5. 10.	glykogen	6	4	4	3	3	3	
	dusík	0,5	0,5	0,2	0,3	0,4	4,4	

Roztříděním získaného materiálu jsme zjistili, že křivka závislosti výsledků zkoušky trvanlivosti na ztekucení na stáří vzorku probíhá v podstatě dvojím způsobem:

1. buď jde o průběh zhruba lineární s více méně strmým spádem křivky (typy průběhu 4, 5, 6 na obr. 1), nebo

2. o průběh s více méně výrazným minimem a maximem, tedy o křivky třetího stupně (typy průběhu 1, 2, 3 na obr. 1).

Uvedené dvě hlavní skupiny jsme dále roztřídili podle tvaru křivek na celkem 6 výraznějších typů, jež jsou schematicky znázorněny na obr. 1. Třídění bylo provedeno jednak podle strmosti křivek, jednak podle polohy a výraznosti maxima.

V bližší charakterizaci jednotlivých typů křivek je zapotřebí uvést četnost, jak byly jednotlivé typy procentuálně zastoupeny:

Typ 1. byl zastoupen 26 %. U tohoto typu křivky je zahrnuto prakticky veškeré droždí, jevíci nápadně rychlou počáteční autolýzu. Jak je z grafu zřejmo, již po 3 až 5 dnech dává zkouška na ztekucení až pozoruhodně vysoké nálezy, takže křivka má velmi výrazné maximum. V dalším průběhu křivky je typický poměrně rychlý spád.

Typ 2. byl zastoupen 20 %. Křivka závislosti jevila i v tomto případě výrazné maximum, objevující se však teprve u vzorků uložených 6 až 7 dní při laboratorní teplotě. Počáteční nálezy zkoušky na ztekucení byl obvykle vyšší než hodnota maxima.

Typ 3. byl zastoupen 8 %. Ploché maximum křivky závislosti se objevovalo až po 6 dnech uložení při laboratorní teplotě a výrazně převyšovalo počáteční nálezy.

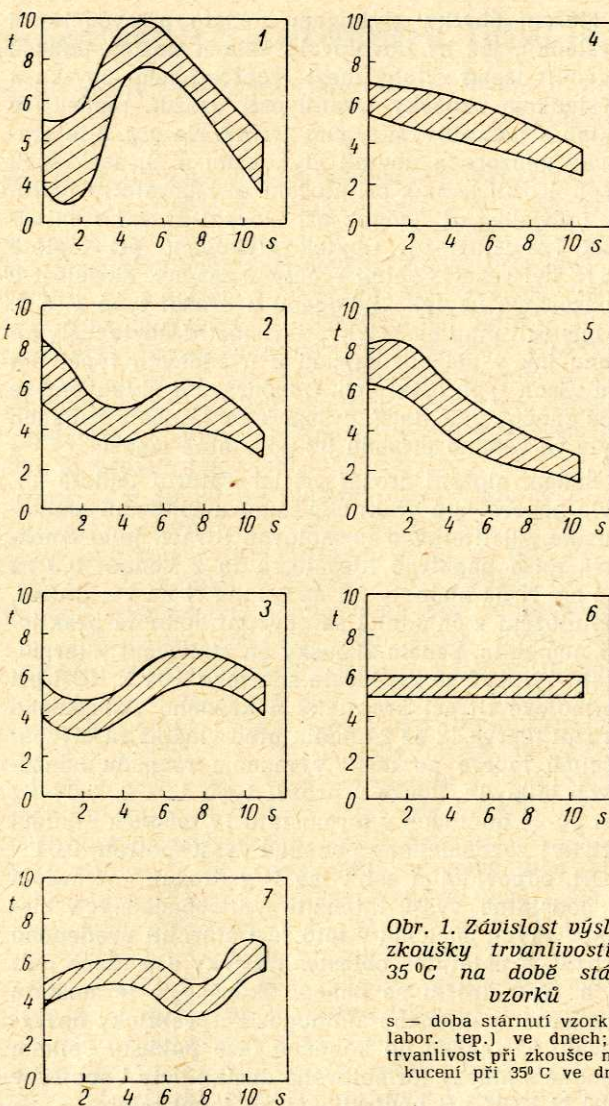
Typ 4. byl zastoupen při našich měřeních pouze 20 %, ač šlo o typ, který by prakticky ideálně odpovídal představě, že mezi nálezem zkoušky na ztekucení a skutečnou trvanlivostí droždí je přímá závislost.

Typ 5. byl zastoupen 22 %. Průběh křivky je rovněž zhruba lineární, avšak s mnohem prudším spádem.

Typ 6. byl zastoupen pouze 2 %. Po celou dobu zkoušky byly nálezy shodné.

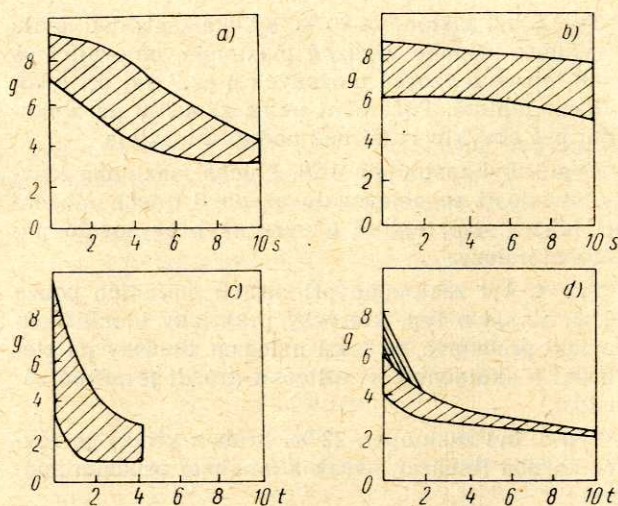
Nutno ještě uvést, že u určitého počtu vzorků nebyly nálezy zcela jednoznačné podle uvedených typů — získané křivky měly přechodný charakter a bylo je nutno přiřadit k nejbližšímu typu.

Obdobné zkoušky byly provedeny i u několika



Obr. 1. Závislost výsledků zkoušky trvanlivosti při 35 °C na době stárnutí vzorků

s — doba stárnutí vzorku (při labor. tep.) ve dnech; t — trvanlivost při zkoušce na ztekucení při 35 °C ve dnech



Obr. 2. Časová závislost úbytku glykogenu

vzorků droždí, jež bylo po celou dobu pokusu uchováváno v chladnici při 3 až 5 °C. Nálezy u těchto vzorků byly ještě komplikovanější. Křivky jevíly např. i dvě výrazná maxima (znázorněno čís. 7 na obr. 1; viz též protokol č. 3) u vzorků, jež odpovídaly typům 1. nebo 2.

Měření úbytku glykogenu nedalo přesvědčivých výsledků, jež by dovolovaly během našich pokusů odvodit jasné vztahy mezi rychlostí jeho úbytku a výsledkem zkoušky trvanlivosti droždí, respektive vztah k jednotlivým typům křivek. Na obr. 2 je graficky znázorněn úbytek glykogenu u zhruba všech typů droždí jednak při uložení za laboratorní teploty (závislost a), jednak při uložení droždí v chladnici (závislost b). Úbytek glykogenu při teplotě 35 °C byl vesměs velmi rychlý a značný. Závislost c znázorňuje úbytek glykogenu u droždí typů 1. a 2. v místech minima křivky, závislost d úbytek glykogenu jak v oblasti maxima u uvedených typů, tak i u všech typů ostatních. Odbourávání glykogenu je zde značně pomalejší, ovšem jeho zásoba v buňkách byla ve většině případů již podstatně menší.

Během uložení droždí při laboratorní teplotě nebylo pozorováno prakticky žádné uvolňování aminodusíku, zjištěitelného formolovou titrací. Jeho množství spíše nepatrně klesalo, a to z hodnot 0,3 až 0,4 mg N na hodnoty 0,1 až 0,2 mg N na 1 g droždí. Při uložení v chladnici se původní hodnota prakticky neměnila. Během zkoušky na ztekucení v termostatu výrazně se zvyšovala spotřeba 0,04 N KOH při formolové titraci prakticky u každého zkoušeného droždí teprve 12 až 24 hodin před vlastní autolýzou; zřejmě teprve po dosti výrazném rozpadu buněčných bílkovin. Pouze u droždí typů 1. a 2. byly již asi po 24 hodinách v termostatu (v místech minima křivky) zaznamenány poněkud vyšší spotřeby 0,04 N KOH, odpovídající asi 1 mg N/g droždí, což svědčí o podstatně vyšší intenzitě vnitrobuněčných biochemických pochodů v této fázi stárnutí uvedeného droždí. V ostatních oblastech křivky a u všech dalších typů droždí se během zkoušky v termostatu množství uvolněného aminodusíku prakticky nezvyšovalo až takřka do konečné fáze pokusu. Celkem shodné s nálezy formolového dusíku byly i spotřeby 0,04 N KOH při neutralizaci na fenolftalein.

Diskuse

Sama skutečnost, že droždí celkem dobré trvanlivosti při běžné laboratorní teplotě může nečekaně rychle autolyzovat při zkoušce na ztekucení, vzbuzuje pochybnost o všestranné vhodnosti této metody ke stanovení trvanlivosti.

Na druhé straně je třeba uvážit, že naše nálezy byly učiněny v době, kdy se droždí vzaté k pokusům nechovalo normálně. Lze očekávat, že při obdobném vyšetřování droždí v jiných droždárnách bychom našli mnohem častěji droždí odpovídající typům 4. a 5. než typům 1., 2. a 3. Nutno však zdůraznit, že se čas od času takové droždí objevuje a že ho není možno běžně užívaným chemickým vyšetřením odlišit. Vzhled kvasničných buněk, struktura plasmy i obsah hrubých proteinů a kyseliny fosforečné jsou normální.

Uvažujeme-li o příčině popsaného jevu, docházíme ke dvěma pravděpodobným výkladům.

V prvním výkladu jde o droždí, které nevyzrálo během technologického procesu, jeho enzymatická soustava není ustálená a není proto schopno vzdorovat poněkud zvýšené teplotě, při níž dochází k tak intenzivním procesům vnitřního trávení, že část buněk po spotřebování zásobních látek za nepříznivých podmínek autolyzuje. Při pokojové teplotě může toto droždí během několika dní dozrát a potom se nijak neliší od obvyklého. Tomuto výkladu nasvědčují nálezy, učiněné u droždí typu 1. při uložení v chladnici. Proces zrání se tam značně zpomalí; buňky se zprvu přizpůsobí nižší teplotě a teprve potom zvolna dozrávají. Intenzitu procesu zrání můžeme dobře sledovat na úbytku glykogenu jednak při laboratorní teplotě, jednak při teplotě 3 až 5 °C. S tímto výkladem souhlasí také častá zkušenost z výroby droždí, že některá droždí, jež neprošla chladírnou, mají lepší trvanlivost než droždí prochlazovaná.

Druhý možný výklad spočívá v tom, že nepostřehnutou změnou v živění kvasinek při výrobním procesu, např. změnou složení vody, úbytkem některého mikroprvku, změnou používané melasy, ztrátou některého z biosfaktorů, produkovaného určitou mikroflórou z melasy, popř. vlivem některého metabolitu byly porušeny podmínky pro vývoj kvasinek. I když jejich množení probíhá zcela obvykle, produkují snad v omezené, respektive v nadměrné míře některé významné vnitřní regulátory a tento nedostatek vnitřní rovnováhy vykompenzují teprve po několika dnech zrání. Že je tento výklad možný, plyne např. z toho, jak hluboce ovlivňují vývoj a chování mikroorganismů růstové faktory, jimiž jsou např. v malé koncentraci i četná antibiotika.

Literatura

- [1] Bergander E.: Glykogenový test, používaný v droždárnách v NDR, zkoušený v r. 1954 v droždárnách v ČSR.
- [2] Jonáš V.: Technologie drožďářství, II. díl, s. 508. Vědecko-technické nakladatelství, Praha 1951.

Došlo do redakce dne 13. 12. 1962.

СТАРЕНИЕ И СОЗРЕВАНИЕ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

В статье рассматриваются результаты изучения процесса старения и созревания дрожжей и объясняются причины наблюдаемой иногда разницы между фактической стойкостью дрожжей и стойкостью, установленной при лабораторных испытаниях, т. е. при сжижении и при температуре 35 °C. Изучение доказывает, что поведение дрожжей зависит от степени зрелости продукта, т. е. от его энзимной активности. Процессы созревания продолжаются и в период складирования. Ввиду значительного влияния старения и созревания на свойства дрожжей, результаты анализов, сделанных в разных лабораториях, могут весьма значительно расходиться.

DIE ALTERUNG UND REIFUNG DER BACKHEFE

Es wurde der Prozess der Alterung der Backhefe studiert, der die Erklärung der öfteren Unterschiede zwischen der tatsächlichen und der im Laboratorium ermittelten Haltbarkeit (durch Verflüssigung bei 35°) ermöglicht. Es wurde dabei festgestellt, dass die Veränderungen der Hefe hauptsächlich von dem Reifegrad des Erzeugnisses, d. h. seiner enzymatischen Aktivität, abhängen. Der Prozess der Hefereifung verläuft auch während der Lagerung. Die Ergebnisse der Haltbarkeitsproben bei Benützung der Verflüssigungsmethode können bei der Alterung und Reifung starke Schwankungen aufweisen. Man kann dadurch auch die Unterschiedlichkeit der Befunde der einzelnen Laboratorien erklären.

AGEING AND MATURING OF BAKER'S YEAST

The process of yeast ageing has been studied to find the reasons of differences between the actual durability of product and durability determined by laboratory tests with yeast liquified at 35 °C. It has been ascertained, that the behaviour of yeast depends largely upon the stage of its maturity, i. e. upon its enzymatic activity. The maturing process continues during the storing period. The durability tests based upon liquefaction are not quite reliable, since their results are effected by ageing and maturing factors and may therefore differ.