

## Sérologická metoda pro důkaz kulturních a divokých kvasinek

ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ a JOZEF ŠANDULA,

663,12/.13

Chemický ústav SAV, Československá akademie věd, Bratislava

Při biologické kontrole piva a jeho výrobního postupu se musí velmi často ověřit přítomnost „divokých“ kvasinek, tj. těch, které kontaminují a znehodnocují výrobek nebo meziprodukty výroby. Obvykle to bývá proto, že se tvoří na povrchu křísy (*Candida mycoderma*, *Candida krusei*, *Pichia membranaefaciens*), že se zakaluje tekutina (*Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces turbidans*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces willianus* apod.) a přitom tyto kvasinky dále zkvašují zbylé cukry (*Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces rouxii*) a metabolizují je jinak nežli kvasinky kulturní. Produkty jejich metabolismu dodávají potom výrobku rozmanité nežádoucí pachuti. Kvasinky křísové, rozmáhající se na povrchu tekutin, se snadno zjišťují a také příčina kontaminace se vysvětlí přístupem vzduchu. Avšak divoké kvasinky zákalo- tvorné nebo sedimentující (spodní) se těžko rozlišují od kulturních, protože se jim kultury biochemicky i vzhledem podobají. Také tvarově se těžko rozlišují, neboť to bývají kmeny velmi plastické, s velkou morfologickou variabilitou. V jedné naší starší práci [1] jsme zjistili, že mnohé z nich se za určitých kultivačních podmínek shodují i tvarem buněk s kulturními kvasinkami (*Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae*). Zejména obtížně se určují v pивních sedimentech, protože v nich i násadní kvasnice mívají k nepoznání protáhlé buňky. Důkaz divokých kvasinek odedávna zaměstnával pivovarskou biologickou kontrolu, jak o tom svědčí starší i soudobá literatura.

V podstatě můžeme metody na stanovení divokých kvasinek rozdělit do čtyř skupin:

1. Důkaz spor je u divokých kvasinek snadnější nežli u kulturních, které tvoří spory jen zřídka, a proto se používá takových metodických postupů, které tvorbu spor podporují. Nejčastěji se k tomu používá 2 až 4% roztoku kyseliny vinné. Windisch [2] sledoval citlivost různých kvasinek ke kyselině vinné a zjistil, že spodní kulturní kvasinky jsou

obvykle velmi citlivé, svrchní snášejí i 2% roztok, avšak lihovarské i více než 2%. Doporučuje [3] přidávat 2% kyselinu vinnou k sladině a předpokládá, že v tomto prostředí se budou rozmnožovat jen divoké kvasinky. Avšak sám autor upozorňuje na to, že také některé divoké kvasinky, jako např. *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces validus* nebo *Saccharomyces rouxii*, špatně rostou v přítomnosti kyseliny vinné. Naproti tomu některé druhy rodu *Candida* snášejí i 6 až 7% roztok, *Saccharomyces ellipsoideus* a *Saccharomyces exiguus* 3 až 5% i 10% a *Pichia membranaefaciens* 3%. Moller-Christensen [4] doporučuje dokazovat sporulaci divokých kvasinek na filtračním papíře, navlhčeném 0,5% roztokem octanu sodného.

2. Mnoho pracovníků používá metody, kterou se zkouší asimilovatelnost lysinu jako jediného zdroje dusíku [5, 6]. Divoké kvasinky lysin asimilují, kulturní ne. Avšak i tato metoda je kritizována [7].

3. Lund a Thygsen [7] doporučují suspendovat zkoumané vzorky 20 min v destilované vodě 50 °C teplé. V těchto podmínkách může přežít jen 0,05 až 0,6 % pivovarských kvasinek. Divoké kvasinky proti tomu snášením zvýšenou teplotu lépe. Také Delisle a Phaff [8] doporučují tuto i předešlou metodu.

4. V poslední době se začíná doporučovat také sérologická metoda, především ta, která pracuje s fluorescenčním antisérem [9, 10]. Antisérum se připravuje z kulturní kvasinky. Buňky kulturních kvasinek dávají na sklíčku fluoreskující komplex antigenu s antilátkou, čím se dají mikroskopicky rozlišit kulturní kvasinky od divokých, u nichž tento komplex nefluoreskuje.

Sérologické identifikační metody jsou běžné v lékařské mikrobiologii. Avšak do mikrobiologie kvasinkovitých mikroorganismů pronikly teprve s rozvojem těchto mikroorganismů jako původců chorob lidí a zvířat. Tyto choroby se značně rozšířily po zavedení léčby infekčních chorob antibiotiky. Proto také uplatňování sérologických metod v mikrobiologii kvasinek se rozšiřuje hlavně v posledních de-



seti létech tak, že dnes nabývá i praktického významu.

Dávno je známo, že člověk, který přežil infekční chorobu, se stává odolným vůči mikroorganismům, které ji vyvolaly. Když se zkoumaly příčiny této odolnosti, zjistilo se, že je to způsobeno schopností krevního séra specificky aglutinovat nebo rozpouštět tyto škodící mikroorganismy a zvyšovat jejich citlivost vůči fagocytům. Ehrlich zjistil, že v krevním séru se nacházejí specifické látky, tzv. protilátky (antilátky) a látky, které vyvolaly jejich tvorbu v krvi nazval antigeny. Už v r. 1897 Kraus dokázal, že jako antigeny mohou vystupovat nejen mikrobiální buňky, ale také látky méně složité, dokonce i látky rozpustné. Proto také na povrchu buněk mikroorganismů není jeden, ale více antigenů, které dohromady představují celkový antigen. Dříve se mělo za to, že antigeny jsou čistě bílkovinné povahy, avšak dnes se připisuje tato vlastnost také povrchovým polysacharidům [11] (obr. 1).

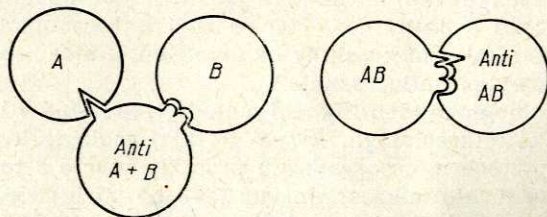
Tyto poznatky se aplikují při identifikaci bakterií již velmi dávno. Živočišného krevního séra se používá k důkazu aglutinační reakce antigenních bakteriálních kultur. Také při určování kvasinek je snaha uplatnit tuto metodu [12, 13]. Avšak ukázalo se, že různé druhy kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů mají mnoho antigenů společných, což se projevuje pozitivním aglutinačním testem i u takových druhů, které jsou morfologicky a biochemicky odlišné. Používání vysycovaných sér činí metodický postup složitějším. Dosud se nedospělo k žádným jednoznačným výsledkům.

Uspokojivější výsledky v tomto směru poskytují Ouchterlonyho precipitační metoda. Při ní se nechá difundovat agarovým gelem sérum s antilátkou a z druhé strany antigenní substance. Tam, kde se obě látky setkají, vytvoří se jeden nebo více pruhů sraženiny, které představují komplexy antigenů s antilátkou. Necháme-li takto reagovat s jedním antisérem více antigenních substancí odděleně, můžeme porovnávat sestavu jejich antigenů (obr. 2). V této práci se pokusíme předvést praktické výsledky s Ouchterlonyho metodou. Králíčí sérum obsahuje antilátku vyvolanou pivovarskou kvasinkou *Sacharomyces carlsbergensis* Hansen.

#### Pracovní postup

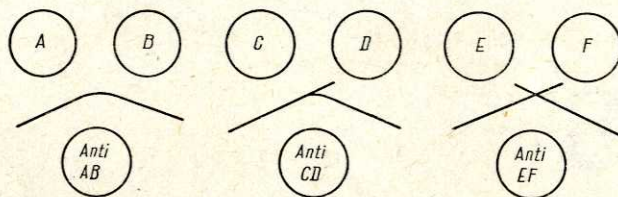
##### Použité kmeny

Použili jsme čistých kultur kvasinek z naší sbírky, jejichž původy jsou označeny v brožuře *Slovenské čisté kultury pivovarské* z r. 1960. Řídili jsme se přitom poslední typizací těchto kmenů, kterou



Obr. 1. Komplexy antigenů s antilátkou

A a B jsou různé determinující skupiny antigenů A + B, AB je antigen obsahující dvě determinující skupiny A a B, uložené vedle sebe [11]



Obr. 2. Vysvětlení k posuzování precipitačních linií Ouchterlonyho metodou

A, B = antigeny jsou totožné, C, D = antigeny jsou příbuzné, E, F = antigeny jsou rozličné

jsme provedli v r. 1962 [14]. K přípravě antilátky jsme vybrali jeden z nejtypičtějších kmenů s nejprůměrnějšími vlastnostmi. Je to kmen č. 48-63, vedený v propagační stanici a v provozu pivovaru v Bratislavě.

#### Příprava kultury k očkování králíka

Kmen *Saccharomyces carlsbergensis* č. 48-63 jsme nechali růst 5 až 7 dní na sladidlovém agaru v Petriho misce při teplotě místnosti. K usmrcení buněk jsme použili merthiolátu sodného ve fyziologickém roztoku v zředění 1:10 000. Tímto roztokem jsme spláchli kulturu do zkumavky a suspenzi jsme denně několikrát protřepali. Po třech dnech jsme ji odstředili a kvasinky jsme promyli fyziologickým roztokem, aby se všechen merthiolát odstranil. K očkování králíka jsme použili suspenze kvasinek ve fyziologickém roztoku. 1 ml této suspenze obsahoval 80 až 100 mg vlhkých kvasinek. Tuto suspenzi jsme uchovávali v ledničce při 4 °C.

#### Imunizace králíka

K přípravě sér používáme šedé králíky (čínčila) váhy 2 až 2,5 kg. Přípravenou suspenzi mrtvých buněk jsme očkovali do ušní žíly třikrát týdně v průběhu 3 až 4 neděl. Začínali jsme dávkou 1,5 ml suspenze mrtvých buněk a postupně jsme tuto dávku zvyšovali na 2,5 až 3 ml. Týden po posledním očkování jsme odebrali 1 až 2 ml krve a aglutinační metodou jsme přezkoušeli titer séra, který má být aspoň 160 až 320, tzn. že sérum ještě při zředění 160 až 320násobném aglutinuje živé kvasinky, z nichž bylo sérum připraveno. Nedosahuje-li titer séra této výšky, je třeba imunizovat králíka ještě dále 1 až 2 týdny. Potom se králík zabije, nechá vykrvácet a z jeho krve připravené sérum se uskladňuje v chladničce při -15 °C. Účinnost antilátek se v něm zachovává po dobu 6 až 12 měsíců.

#### Aglutinační metoda

Antisérum jsme zředili fyziologickým roztokem v poměru 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, atd. K 0,5 ml zředěného antiséra jsme přidali 0,5 ml suspenze živých kvasinek z 2 až 3 dní staré kultury. Suspenze buněk měla hustotu 10<sup>8</sup> buněk v ml. Zkumavky jsme protřepali, nechali 2 hod při teplotě místnosti a potom jsme je uložili do chladničky o 4 °C. Druhého dne jsme zjišťovali aglutinaci. U pivovarských kvasinek tuto metodu velmi ztěžuje samovolná aglutinace (autoaglutinace). Proto jsme u každého testu pořizovali také kontrolu kvasinek ve fyziologickém roztoku bez séra.

#### Precipitační metoda

K provedení této zkoušky je zapotřebí připravit autolyzát z buněk kvasinek. Buňky se s povrchu



šikmého sladivového agaru spláchnou 3 až 4 ml fyziologického roztoku tak, aby 1 ml obsahoval přibližně 700 až 800 miliónů buněk. Takovou suspenzi jsme autolyzovali v termostatu při 56 °C po dobu 3 dnů. Suspenzi jsme denně dvakrát protřepávali a nakonec jsme ji odstředili. Tekutou část jsme zahustili v exsikátoru nad kyslíčnickem fosforečným na jednu třetinu původního objemu. Na Petriho misku průměru 8 cm jsme vlili 12 ml 1% čištěného agaru [značka „Kobe“] ve fyziologickém roztoku s merthiolátem v zředění 1:10 000. Po utužení agaru jsme korkovrtem vyřezali kroužky průměru 8 mm, jeden v středu a 6 okolo něho tak, aby vzdálenost okrajových od středního byla 8 až 10 mm. Do středního kroužku nakapáváme anti-sérum a do okolních jednotlivé autolyzáty. Misky jsme uložili do vlhké komory. Při teplotě místnosti se po 2 až 3 dnech začnou objevovat precipitační pruhy a jejich vyvinutí se dokončí asi po týdnu.

#### Čištění agaru\*)

Běžně používaný obchodní agar nevyhovuje čistotou pro precipitační reakce, může se však poměrně jednoduše přechistit. Odváží se 50 g agaru „Kobe“ a 10 g křemeliny, doplní se to do 1000 ml fyziologickým roztokem s merthiolátem (1:10 000). Agar se rozvaří, několik minut se třepe a potom za horka odstřeďuje ve vyhřáté kyvetě. Čirý horký agar se vyleje do velké misky do výšky asi 0,5 až 1 cm a po vychladnutí a utužení se rozkrájí na malé kostky, které se potom v kádince 3 dni vyluhují denně vyměňovanou destilovanou vodou. Takto připravený agarový gel obsahuje asi 3,5 % agaru. Uchovává se v prachovnici v chladničce anebo se se lyofilizuje. Před použitím se rozvaří s fyziologickým roztokem s merthiolátem ve vhodné koncentraci.

#### Výsledky pokusů

Především jsme s připraveným antisérem kvasinky č. 48-63 otestovali aglutinační metodou všechny naše kmeny pivovarských kvasinek, které udržujeme (tab. 1). Přitom jsme zjistili, že některé kmeny nedávají pozitivní reakci (např. 48-12, 48-14, 48-24, 48-53, 48-39, 48-44 a 48-62). Kmen č. 48-39 jsme již při poslední typizaci vyřadili, protože ne-náležel vůbec do rodu *Saccharomyces*. Několik kmenů dávalo jen velmi slabou aglutinační reakci (jako 48-4, 48-19, 48-32 a 48-52), avšak v mnohých případech byl tento test rušen samovolnou aglutinací. Proti tomu antisérum „48-63“ dávalo pozitivní aglutinační reakci s celou řadou jiných kvasinek II. kvasného typu [15], např. se *Saccharomyces logos*, *S. cerevisiae* (avšak ne se všemi kmeny), *S. uvarum*, *S. pastorianus*, *S. willianus*, *Torulopsis colliculosa*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Z. florentinus*, *Candida robusta* apod. (tab. 2). Ačkoli jsme takto aglutinační reakcí zjistili vzájemnou sérologickou příbuznost různých druhů II. kvasného typu, neříká tato reakce nic o antigenní skladbě jednotlivých kmenů. Pro značnou schopnost kmenů samovolně aglutinovat je dokonce někdy nesnadné rozhodnout o výsledku testu. Proto jsme přistoupili k testování precipitační metodou.

\*) podle osobního sdělení inž. Škvařila z Ústavu sér a očkovacích látek, Praha.

Tabulka 1

Aglutinační sérologická reakce kmenů *Saccharomyces carlsbergensis* in sensu stricto s antisérem „48-63“

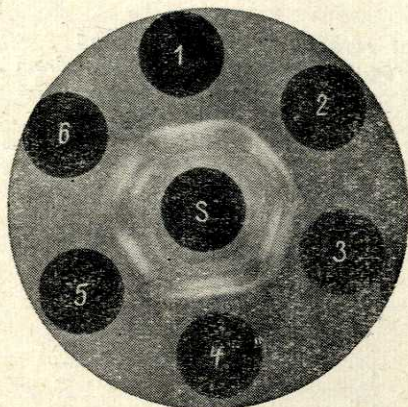
Kmen č.	Titr 1				kontrola
	20	80	160	320	
48-1	+	(+)	(+)	(+)	—
48-2	(+)	(+)	(+)	(+)	—
48-3	+	(+)	(+)	(+)	—
48-4	(+)	±	±	±	±
48-5	+	(+)	—	—	—
48-6	++	+	+	+	(+)
48-7	+	+	+	(+)	—
48-8	(+)	(+)	(+)	(+)	—
48-9	+	++	(+)	(+)	—
48-10	+	(+)	+	+	—
48-11	++	+	—	—	—
48-12	—	—	—	—	—
48-13	++	+	+	+	—
48-14	—	—	—	—	—
48-15	+	+	(+)	—	—
48-16	+	+	+	+	+
48-17	+	+	+	+	(+)
48-18	+	+	+	+	—
48-19	(+)	(+)	(+)	(+)	±
48-20	(+)	(+)	(+)	(+)	—
48-21	++	+	(+)	(+)	±
48-22	+	+	(+)	(+)	±
48-23	+	+	(+)	—	—
48-24	—	—	—	—	—
48-25	+	+	(+)	—	—
48-26	+	(+)	(+)	—	—
48-27	+	(+)	(+)	—	—
48-28	++	+	—	—	—
48-29	+	+	(+)	—	—
48-30	(+)	(+)	(+)	—	—
48-31	(+)	(+)	(+)	—	—
48-32	(+)	+	(+)	(+)	(+)
48-33	+	+	(+)	(+)	—
48-34	+	(+)	(+)	(+)	—
48-35	++	+	+	(+)	—
48-36	+	+	(+)	(+)	(+)
48-37	(+)	(+)	—	—	—
48-38	(+)	(+)	±	—	—
48-39	—	—	—	—	—
48-40	++	+	—	—	—
48-41	(+)	(+)	+	+	(+)
48-42	+	(+)	—	—	—
48-43	(+)	+	—	—	—
48-44	—	—	—	—	—
48-45	+	(+)	(+)	—	—
48-46	+	(+)	(+)	—	—
48-47	+	(+)	(+)	(+)	—
48-48	+	(+)	(+)	—	—
48-49	+	—	—	—	—
48-50	+	(+)	(+)	—	—
48-51	++	(+)	—	—	—
48-52	±	±	±	±	±
48-53	—	—	—	—	—
48-54	(+)	(+)	(+)	(+)	—
48-55	++	—	—	—	—
48-56	++	+	(+)	—	—
48-57	+	(+)	(+)	—	(+)
48-58	+	(+)	(+)	—	—
48-59	(+)	(+)	—	—	—
48-60	+	(+)	—	—	—
48-61	+	(+)	—	—	—
48-62	—	—	—	—	—
48-63	+	+	(+)	—	—

+, ++ — pozitivní a silně pozitivní reakce;  
(+) — slabá aglutinační reakce;  
± — velmi slabá aglutinační reakce;  
— — negativní reakce;  
N — kmen se nedá použít v provozu

Nejdříve jsme přezkoušeli reakci mezi antisérem „48-63“ a některými našimi domácími kmeny. Obr. 3 ukazuje, že celkový antigen u spodních pivovarských kvasinek vytváří s antilátkou pět precipitačních pruhů. Těchto pět pruhů je u pěti kmenů (48-63, 48-18, 48-1, 48-2 a 48-37) totožných, což potvrzuje vzájemné spájení precipitačních linií autolyzátů. Jedině u kmene č. 48-19 chybí jeden vnější precipitační pruh. Zajímavé je, že tento kmen také při poslední morfotypizaci [14] změnil svoji polohu proti předešlému hodnocení [16]. Jeho buňky se

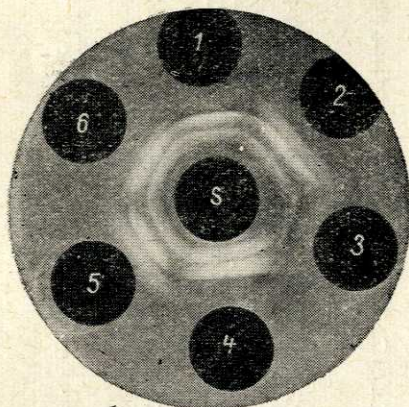
N  
svrchní  
svrchní  
respiračně  
deficientní  
S. cerevisiae





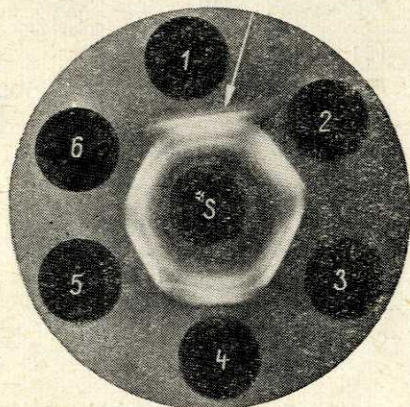
Obr. 3

1 — kmen č. 48-63, Bratislava 1958; 2 — kmen č. 48-18, Plzeň 1950; 3 — kmen č. 48-1, Smíchov 1950; 4 — kmen č. 48-2, Smíchov 1950; 5 — kmen č. 48-19, Plzeň 1950; 6 — kmen č. 48-37, Holešovice, Praha 1952 (Foto K. Gürth)



Obr. 4

1 — kmen č. 48-22, Zürich 1950; 2 — kmen č. 48-23, Feldschlösschen 1950; 3 — kmen č. 48-24, Spaten 1949; 4 — kmen č. 48-25, Louisville 1949; 5 — kmen č. 48-60, Ottakring, Wien 1959; 6 — kmen 48-4, Belgie 1948; (Foto K. Gürth)



Obr. 5

1 — kmen č. 48-63; 2 — kmen č. 48-68, kmen Froberg, CBS; 3 — kmen č. 21-1-1, Saccharomyces logos 1943; 4 — kmen č. 21-1-2, Saccharomyces logos CBS; 5 — kmen č. 48-73, Saccharomyces uvarum; 6 — kmen č. 48-64, izolovaný inž. Minárikem z tokajské vinohradnické oblasti a jím určený jako S. carlsbergensis. Šipka ukazuje charakteristické antigenní schéma S. carlsbergensis in sensu strictu (Foto K. Gürth)

ukázaly velmi malými a kulatými. Obr. 4 ukazuje porovnání precipitačních testů u pivovarských kvasinek, které jsme obdrželi z cizozemských pivovarů.

Tyto kmeny nedávaly již tak jednotný obraz o antigenní struktuře, jako kmeny předešlé. Stejných 5 precipitačních pruhů dávaly kmeny 48-23 a 48-60, kmeny č. 48-22 a 48-25 měly antigenní schéma jen o čtyřech pruzích, kmen 48-4 měl za čtvrtým pruhem ještě jeden nový a kmen č. 48-24 dával jen jednu slabou precipitační linii, zcela odlišnou od ostatních. O tomto kmenu jsme již v naší první morfotypizaci [17] diskutovali s pochybností. Pravděpodobně vůbec nejde o pivovarskou kvasinku, o čem svědčí i to, že neúplně využívá rafinózu (tab. 3). Pravděpodobně došlo tu k záměně již dávno v minulosti, ještě dříve, nežli jsme kmen obdrželi.

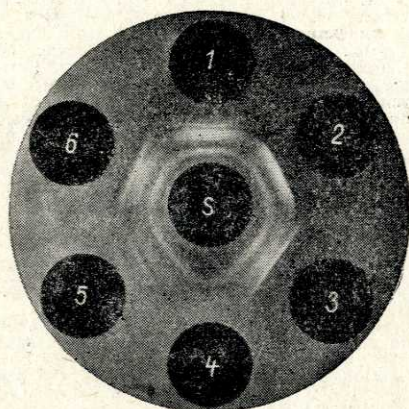
Dále jsme zkoumali precipitační testy některých příbuzných druhů k druhu *Saccharomyces carlsbergensis*, které se uvádějí také v systematikách jako tento druh v jeho širokém pojetí [18]. Obr. 5 ukazuje jejich antigenní schéma v porovnání s kmenem 48-63. Toto charakteristické schéma pro *Saccharomyces carlsbergensis* se zjevně liší od všech ostatních. Ani jeden z ostatních kmenů nedává tak silný vnější precipitační pruh (vyznačený šipkou obr. 5 a 7). Podle tohoto testu se kmen „Froberg“ spíše podobá *Saccharomyces logos*, a to zejména kmeni č. 21-1-2. Kmen č. 48-64, který určil inž. Minárik jako *Saccharomyces carlsbergensis* [14] se tímto testem také odlišuje od tohoto druhu, má však slabý pruh, který je obsažen i v schématu *Saccharomyces uvarum*, avšak liší se i od něho.

Tabulka 2

Aglutinační sérologické reakce různých druhů rodu *Saccharomyces* s antisérem „48-63“

Kmen	Titř 1			Číslo kmene
	20	40	80	
<i>Saccharomyces logos</i>	++	++	(+)	21-1-1
<i>Saccharomyces logos</i>	+	+	+	21-1-2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> rasa M	+	+	(+)	21-4-1
<i>S. cerevisiae</i> rasa saké	++	++	+	21-4-2
<i>S. cerevisiae</i> Steiner	+	(+)	—	21-4-3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	+	+	21-4-4
<i>S. cerevisiae</i> rasa saké	+	++	+	21-4-5
<i>S. cerevisiae</i> kmen Johannisberg	—	—	—	21-4-6
<i>S. cerevisiae</i> kmen Saaz	+	++	(+)	21-4-7
<i>S. pastorianus</i>	(+)	+	(+)	21-6-1
<i>S. pastorianus</i>	(+)	(+)	(+)	21-6-2
<i>S. cerevisiae</i> kmen Vordermanni	+	+	+	21-4-8
<i>S. cerevisiae</i> kmen turbidans	+	+	+	21-4-9
<i>S. cerevisiae</i> var. ellipsoideus kmen valesiacus	+	+	+	21-4-10
<i>S. cerevisiae</i> kmen marschalianus	+	++	(+)	21-4-11
hybrid pekařského droždí a rasa XII	++	+	(+)	21-4-12
<i>S. cerevisiae</i> rasa XII	+	(+)	+	21-4-13
<i>S. cerevisiae</i> kmen Boinot	—	—	—	21-4-14
<i>S. cerevisiae</i> rasa M	(+)	(+)	(+)	21-4-15
<i>S. cerevisiae</i> kmen Wertheimer	+	(+)	(+)	21-4-16
<i>S. cerevisiae</i> rasa IV	++	+	+	21-4-17
<i>S. cerevisiae</i> , Pirna sulfit.	++	+	+	21-4-18
<i>S. willianus</i>	(+)	(+)	(+)	21-15-1
<i>S. uvarum</i>	(+)	(+)	(+)	48-73
<i>S. uvarum</i>	(+)	(+)	±	48-74
<i>S. uvarum</i>	(+)	(+)	(+)	48-75
<i>S. formosensis</i>	—	—	—	21-29-1
<i>Candida robusta</i>	±	±	(+)	29-14-1
<i>Candida robusta</i>	(±)	+	±	29-14-2
<i>Candida robusta</i>	±	(+)	±	29-14-3





Obr. 6

1 — kmen č. 21-4-9, *Saccharomyces cerevisiae* var. *turbidans*, CBS; 2 — kmen č. 21-6-1, *Saccharomyces pastorianus*, CBS; 3 — kmen č. 21-17-1, *Saccharomyces paradoxus*, SBS; 4 — kmen č. 21-14-1, *Saccharomyces cartilaginosus*, CBS; 5 — kmen č. 21-28-1, *Saccharomyces odessa*, CBS; 6 — kmen č. 21-31-1, *Saccharomyces heterogenicus*, CBS (Foto K. Gürth)

Tabulka 3

Kmeny, které jsou zařazeny v naší sbírce jako pivovarské kvasinky a neštěpí rafinózu nebo jen částečně

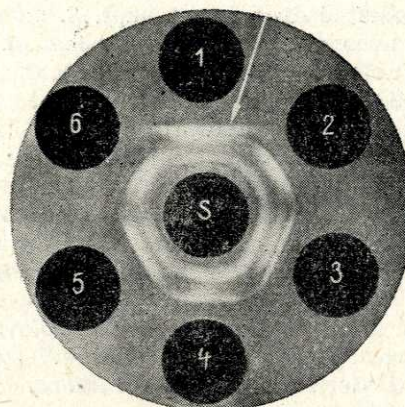
Číslo kmenů		
neštěpících rafinózu	štěpících rafinózu částečně (zanechávající v prostředí rafinózu melibiózu)	
48-25	48-11	48-41
48-39	48-14	48-42
	48-24	48-43
	48-27	48-44
	48-28	48-51
	48-29	48-56
	48-40	48-62

Zkouška byla provedena papírovou chromatografií kvasné tekutiny po týdnu kultivace v 2% roztoku rafinózy s 5% kvasničnou vodou.

Porovnávali jsme i některé vzdálenější druhy, vyskytující se jako divoké kvasinky. Obr. 6 ukazuje antigenní schémata druhů *Saccharomyces cerevisiae* var. *turbidans*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S. cartilaginosus*, *S. odessa*, *S. heterogenicus*. Především se ukazuje, že *S. cartilaginosus* dává negativní reakci a *S. odessa* slabou. Podobné se zdají pruhy pro *S. paradoxus* a *S. heterogenicus*. Přitom musíme poznamenat, že náš kmen *S. paradoxus* kvasí slabě také maltózu, ačkoli tento znak v původním popise druhu chybí. Není tedy mezi ním a druhem *S. heterogenicus*, který kvasí maltózu i sacharózu slabě, velkého rozdílu v biochemických vlastnostech. Nejbližší se jevil antigenní strukturou k *S. carlsbergensis* druh *S. cerevisiae* var. *turbidans*, avšak nemá výrazný ten nejcharakterističtější vnější pruh. Obr. 7 ukazuje antigenní strukturu ještě některých dalších divokých kvasinek v porovnání s kmenem 48-63. Toto schéma velmi dobře ukazuje jaký je rozdíl v antigenní struktuře kulturních pivovarských kvasinek a kvasinek divokých.

#### Závěr

Popsali jsme zde postup pro sérologické rozlišení *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, jako spodní pivovarské kvasinky, od ostatních, biochemicky blízkých druhů rodu *Saccharomyces*. Zde popsána upravená precipitační Ouchterlonyho metoda poskytuje možnost rozdělit celkový komplex antigen-



Obr. 7

1 — kmen č. 48-63; 2 — kmen č. 21-13-1, *Saccharomyces bayanus*, CBS; 3 — kmen č. 28-7-3, *Torulopsis colliculosa*; 4 — kmen č. 21-21-1, *Saccharomyces oviformis*, CBS; 5 — kmen č. 21-6-1, *Saccharomyces pastorianus*, CBS; 6 — kmen č. 21-6-2, *Saccharomyces pastorianus*. Šipka ukazuje charakteristické antigenní schéma *S. carlsbergensis* in sensu stricto. (Foto K. Gürth)

antilátka na jednotlivé složky. Rozmanitost soustavy precipitačních pruhů ukáže tak citlivé rozdíly, že se projeví i mezi samými produkčními kmeny spodních pivovarských kvasinek (obr. 3). Naše domácí kmeny se zdají být poměrně vyrovnané v antigenní skladbě, až na několik výjimek, zato však kmeny cizozemského původu jeví podstatnější rozdíly. Už jednou jsme ukázali na vyrovnanost našich domácích kmenů, když jsme hodnotili jejich hloubku prokvašování podle chromatografických rozborů cukrů v mladínách a v pive [19].

Rozdíl v antigenní struktuře, který ukazuje kmen č. 48-19 upozorňuje na to, že při výběru kmene pro přípravu antiséra je zapotřebí postupovat velmi uvážene. Pro tento účel jsme provedli novou typizaci [14] našich kmenů, abychom z nich mohli vytržít opravdu kmen průměrných vlastností. Z nejprůměrnějších kmenů jsme vybrali takový, který se u nás pěstuje také v provozu. Jeho čistá kultura, udržovaná v naší sbírce, je tu vedena od jeho prvního zavedení v bratislavském závodě. Původně byl odvozen od násadních kvasnic, vedených v holešovickém závodě v Praze a má proto společný původ s kmenem č. 48-37. Patří k jednomu z nejrozšířenějších násadních kvasnic u nás. Z tohoto důvodu pokládáme za nejvhodnější pro hodnocení sérotypizace našich produkčních kmenů na závodech a pro důkaz divokých kvasinek, aby se používalo jednotného antiséra, připraveného centrálně. Tím by se také metoda velmi zjednodušila, neboť by se eliminovala poměrně složitá imunizace králíků a příprava antiséra a zaručila by se jeho standardnost. Zdá se, že metoda je tak citlivá, že může prokázat i změny ve funkčních vlastnostech kmenů. Všechny kmeny, které jsme při biochemické a morfologické typizaci [14] označili za nepoužitelné pro výrobu, ukázaly se také rozdílnými v antigenní struktuře a dokonce některé ani nedávaly aglutinační reakci.

Jak jsme se již dříve zmínili [20] při klasifikaci kmenů a velmi blízkých druhů *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, možno tento druh chápat ve smyslu užším (in sensu stricto) a ve smyslu širším (in sensu lato). V širším slova smyslu jsou dnes v systematikách [21] k němu přiřazovány některé



dříve samostatné druhy, jako např. *S. monacensis*, *S. validus* nebo kmen *Frohberg*. Biochemicky i morfologicky nejbližšími druhy jsou *S. logos* a *S. uvarum* [18, 21]. Podle antigenní struktury se jeví tyto druhy a kmeny sice velmi příbuznými, avšak přece jen odlišnými. Tak např. kmen *Frohberg* se více podobá *S. logos* nežli *S. carlsbergensis*. Mezi všemi těmito druhy a kmeny se jeví fylogenetický vztah velmi úzký a v jejich progresivním vývoji stojí *Saccharomyces carlsbergensis in sensu stricto* na nejvyšším stupni. Vysycováním jeho séra antigeny nejbližších druhů bude možno získat izolovaný precipitační pruh (jeden nebo více), který by sérologicky charakterizoval druh *Saccharomyces carlsbergensis in sensu stricto*.

Podobně jako u zástupců skupiny *Saccharomyces carlsbergensis in sensu lato* a nejpříbuznějších (nebo snad synonymních) druhů, také u ostatních zástupců rodu *Saccharomyces* II. kvasného typu, se jeví vzájemná příbuznost nejen po stránce biochemického metabolismu a tvarové variability, ale také po stránce antigenní struktury. Jak obr. 5–7 ukazují, mají tyto druhy některé antigeny společné, avšak celkově se liší jak od druhu *S. carlsbergensis*, tak i mezi sebou. Tuto rozdílnost v antigenní struktuře, jak se projevuje precipitační metodou, jsme právě využili k možnosti rozlišit divoké kvasinky od kulturních.

#### Literatura

- [1] Kocková-Kratochvílová A., Nečásek J.: Zur Frage der Bestimmung der Hefearten nach ihrer Zellgröße. Mikroskopie 7, 2 (1962).

#### СЫВОРОТОЧНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКИХ ДРОЖЖЕЙ

Авторы рассматривают возможность определять различия между культурными и дикими дрожжами с помощью сывороточного осадительного метода с двойной диффузией в агаровом геле. В статье обращается внимание на различия существующие между отдельными штаммами *Saccharomyces carlsbergensis in sensu stricto* а также между штаммами других видов ферментирующих как мальтозу, так и сахарозу. Описываемый метод может быть усовершенствован путем применения сывороток насыщенных родственными типами.

#### SEROLOGISCHE METHODE FÜR DEN NACHWEIS DER KULTURHEFEN UND DER WILDEN HEFEN

Die Autoren behandeln die Möglichkeit der Ermittlung der Unterschiede zwischen wilden Hefen und Kulturhefen mittels einer serologischen Präzipitationsmethode, die mit doppelter Diffusion in Agargel arbeitet. Es wird auch auf die Unterschiede zwischen den Spezies des zweiten Gärtyps (Maltose- sowie auch Saccharosevergärend) hingewiesen, weiter auch auf die Unterschiede zwischen den Stämmen *Saccharomyces carlsbergensis in sensu stricto*. Die Methode könnte noch verbessert werden bei Verwendung von Sera, die mit verwandten Arten gesättigt wären.

#### SEROLOGICAL METHOD OF DISTINGUISHING CULTURE AND WILD YEASTS

The authors describe practical application of a serological precipitation method based on a two-stage diffusion in agar-agar gel for ascertaining the differences between culture and wild yeasts. Some specific features characterizing various strains of *Saccharomyces carlsbergensis in sensu stricto* as well as strains of stems fermenting both maltose and saccharose are discussed in detail. The suggested method can be further perfected by employing sera saturated with affine sorts.

- [2] Windisch S.: Über den Nachweis wilder Hefen durch Kultur in weinsaurer Würze. Brauerei, wiss. Beilage 9, 3–5 (1956).
- [3] Windisch S.: Detection of wild yeasts by tartaric acid-wort culture. Proc. Eur. Brew. Conv. Baden-Baden, 69–83, 1955. Ref. v J. Inst. Brew. 62, 192 (1956).
- [4] Møller-Christensen G.: Anwendung von Natriumazetat bei Wildhefeuntersuchungen, Brygmesteren 12, 305–312 (1955), Ref. v kartotece Schweiz. Brauerei Rundschau č. 5663.
- [5] Brady B. L.: Wild yeast in pitching yeast. J. inst. Brew. 64, 304 (1958).
- [6] Morris O. E., Eddy A. A.: Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. J. Inst. Brew. 63, 34 (1957).
- [7] Lund A., Thygesen P.: Detection of sporeforming wild yeasts. Proc. Eur. Brew. Conv. Copenhagen, 241–248 (1957), Ref. v J. Inst. Brew. 64, 438 (1958).
- [8] Delisle A., Phaff J. H.: Release of Nitrogenous Products by Brewer's yeast. Brewers' Digest Jan. 1961, 35–38. Ref. v J. Inst. Brew. 67 284 (1961).
- [9] Kunz C., Klaushofer H.: New method for detection of wild yeasts in culture yeasts. Mitt. Versuchsst. Gärungsgew. Wien 13, 51 (1959), Ref. v J. Inst. Brew. 65 519 (1959).
- [10] Kunz C., Klaushofer H.: Purity control of the production of baker's yeast employing fluorescent antiserum. Appl. Microbiol. 9, 469 (1961).
- [11] Haurowitz F.: Chemistry and Biology of proteins. 1950, ruský překlad: Izdatel'stvo Inostrannoj literatury, Moskva 1953.
- [12] Tsuchiya T.: Serological classification of the genus *Saccharomyces*. Internat. Soc. f. Hum. and Anim. Mycology 4, 16 (1959).
- [13] Seeliger H. P. R.: Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie. 11. Heft, Mykologische Serodiagnostik, Leipzig, 1958.
- [14] Kocková-Kratochvílová A.: Die Typisierung untergäriger Brauereihefe. Brauwissenschaft 15, 390–396 (1962).
- [15] Kocková-Kratochvílová A.: Die Bedeutung der Gärungstypen bei der Betsimmung der Hefen und hefeartigen Mikroorganismen. Brauwissenschaft 14, 210 (1961).
- [16] Kocková-Kratochvílová A., Vavruková A., Nováková D.: Význam správného pěstování technických mikroorganismů. Průmysl potravin 2, 305 (1951).
- [17] Kocková-Kratochvílová A.: Kvasinky. SVTL, Bratislava 1957.
- [18] Lodder J., Kreger van Rij, R. N. W.: The yeast a taxonomic study. Amsterdam 1952.
- [19] Kocková-Kratochvílová A., Vlček J.: Die Zucker im Brauprozess. Brauwissenschaft 11, 2 (1958).
- [20] Kocková-Kratochvílová A.: Typizácia pivovarských a viných kvasiniek. Kvasný průmysl 9, 193–195 (1962).
- [21] Kudrjavcev V. I.: Sistematika drožžej. Izdatel'stvo akademii nauk SSSR, Moskva 1954.

Došlo do redakce 23. 3. 1963.