

# Poznámky k metodikám stanovení cizích kvasinek v pekařském droždí

(Návrh nové metodiky s použitím různých nedeficitních substrátů)

RADOVAN KUBÍČEK a ALENA HOUSKOVÁ, Severomoravské lihovary a konzervárny, n. p., Olomouc

653.12  
582.282.232

V současné době jsou v pekařském droždí většiny našich droždářů zastoupeny v určité míře vedle pravých pekařských kvasinek — druhu *Saccharomyces cerevisiae* i kvasinky jiné, označované jako „divoké“ nebo „nepravé“. Jsou vesměs mikroskopicky dosti dobře odlišitelné od sacharomycet. Podle zkušeností posledních let jde vesměs o zástupce rodu *Candida*, tedy nesporeující kvasinky s odlišnými biochemickými a pekařskými vlastnostmi, než mají pravé pekařské kvasinky. Jejich vliv na funkci droždí v těstě byl několikrát diskutován [1].

Nejčastěji byly nalézány v droždí kvasinky *Candida robusta* (utilis) a řidčeji *Candida tropicalis*. Přítomnost těchto cizích kvasinek v droždí lze prokázat kultivací na selektivních půdách, asimilovaných pouze těmito kvasinkami [2 a 3]. Kvantitativní zastoupení „nepravých“ kvasinek v pekařském droždí lze zjišťovat pomocí těchto selektivních půd srovnáním počtu kolonií s počtem vzrostlých kolonií na neselektivní půdě (melasovém nebo sladinkovém agaru), jež byla zaočkována stejným množstvím téže kvasničné suspenze. Pro zaočkování se nejlépe osvědčuje povrchový roztěr na ztuhlém agarové půdě. Rovněž je možné zjišťovat zastoupení cizích kvasinek ze vzrostlých kvasničných kolonií na melasovém nebo sladinkovém agaru, a to z různých vzhledu kolonií. Sacharomycety pravidelně tvoří podstatně bělejší a hutnější kolonie než nepravé kvasinky, a to je podkladem metodiky vhodné pro provozní účely. Tento způsob má výhodu i v tom, že je vyloučena chyba, vznikající z event. nestejněho odměření kvasničné suspenze na selektivní a neselektivní půdu. Má však své nedostatky. Zatímco kolonie *Candidy tropicalis* jsou vesměs naprosto typické, kolonie *Candida utilis* a sacharomycet jsou si v některých případech velmi podobné; obvyklé barevné rozdíly se stanou nepatrnými, takže odečítání je velmi nesnadné. Je to způsobeno různými vlivy — měnlivostí složení živné půdy (melasy, sladinky), pH a snad i fyziologickým stavem kvasinek ve zkoušeném droždí.

U selektivních půd našla největší uplatnění půda používající jako zdroje dusíku lysinu, nepřístupného sacharomycetám a naopak obvykle dobře asimilovatelného nepravými kvasinkami droždí. Zde se však často naráží na nedostupnost nebo na nedokonalou čistotu této aminokyseliny. Druhou méně často používanou metodou je kultivace na agarové půdě s 10 % glukózy, na níž sacharomycety prakticky nerostou, zatímco nepravé kvasinky utvářejí drobné kolonie, díky své schopnosti spokojit se s nízkým obsahem dusíkatých látek. U obou těchto metod je však nutná souběžná kultivace na neselektivní půdě, a to zvyšuje pracnost stanovení.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem jsme se pokusili vypracovat při stanovení cizích kvasinek v droždí takovou metodiku, jež by spojovala výhody selektivních půd s výhodami jediného očkovaní a

současně najít několik vhodných substrátů — zdrojů dusíku — pokud možno zcela běžných, jimiž by bylo možno nahradit deficitní lysin.

## Pokusná část

K pokusům se použilo jednak izolovaných droždářských sacharomycet (droždářny Hejčín, Pavlovičky) a izolovaných divokých kvasinek *Candida robusta* a *Candida tropicalis* (Pavlovičky), jednak droždí I., II., III. a IV. generace z droždářů Pavlovičky a Hejčín. Ke splnění prvního požadavku jsme se rozhodli použít limitovaného růstu kolonií sacharomycet, zatímco růst cizích kvasinek jsme neomezovali.

Aby bylo možné odečítat naprosto bezpečně kolonie sacharomycet cizích kvasinek z jediné Petriho misky, musí být kolonie těchto mikroorganismů velikostí nebo typem tak odlišné, aby nemohla vzniknout záměna. Použili jsme proto jako základu lysinové selektivní půdy, vhodné pro výrazný růst cizích kvasinek (zaměřeno na *Candida robusta* a *Candida tropicalis*), k níž jsme přidávali malá definovatelná množství dusíkatých substrátů, asimilovatelnými sacharomycetami. Množství dusíkatých živin, nutných pro limitovaný růst sacharomycet, jsme určili výpočtem.

Zatímco kolonie *Candida robusta* dorůstají na lysinové půdě po 3denní kultivaci průměrů asi 4 až 6 mm, bylo možno připustit růst kolonií sacharomycet maximálně do průměru 1 až 2 mm. Za předpokladu, že kolonie sacharomycet mohou během třídní kultivace čerpat živné látky z agarové vrstvy 2,5 mm silné (při normálním zásevu asi 100 kolonií na misce průměru 10 cm) z terčíku o průměru asi 10 až 12 mm, nesmí být v tomto terčíku více sacharomycetami asimilovatelných dusíkatých živin, než postačí na růst kolonie do průměru 1,5 mm. Kolonie tohoto průměru má objem asi 0,7 mm<sup>3</sup>, a to odpovídá asi 0,14 mg sušiny s obsahem 5 % N, tj. 0,007 mg N. Z toho vyplývá, že vhodná koncentrace dusíku asimilovatelného sacharomycetami je asi 0,03 mg N v 1 ml půdy.

Na základě těchto propočtů byly připraveny půdy 1, 2, 3, uvedené v tabulce 1.

Na půdách s anoragickou dusíkatou složkou sacharomycety prakticky nerostly, zatímco na půdě s melasou rostly ve velmi dobře odečítatelných koloniích vypočtených rozměrů. Lépe se osvědčila půda s nižší dávkou melasy (3 g/1000 ml), jak je zřejmé ze srovnání obr. 1 a 2. Sacharomycety vyžadují přítomnost růstových látek z přirozených materiálů; ryze syntetické půdy nejsou vhodné. Melasu v půdě lze nahradit odpovídajícím množstvím sladového výtažku.

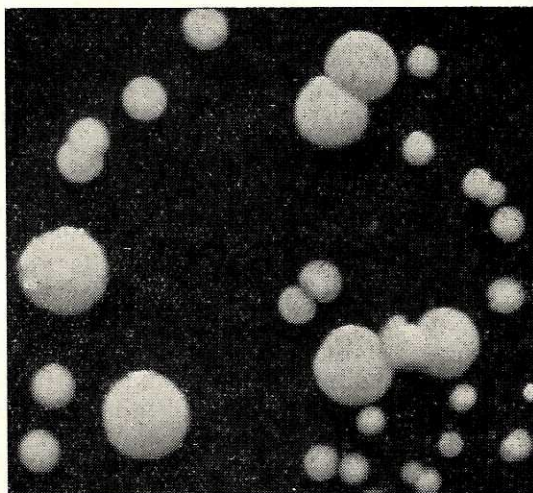
Rozlišování kolonií sacharomycet a *Candida robusta* na půdě 3 je velmi dobré a záměna skoro vyloučena. Rovněž kolonie *Candida tropicalis* rostou naprosto typicky, takže lze dokonale rozlišovat



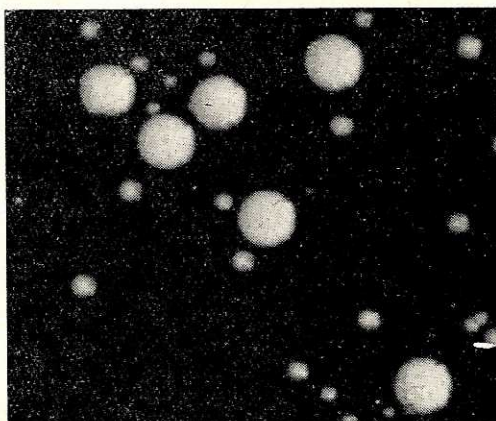
Tabulka 1

Na 1000 ml živné půdy použito		1	2	3	4	5	6	7	8	9
glukóza	g	50	50	50	50	50	50	50	50	50
lysin	g	5	5	5	—	—	—	—	—	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g	5	5	5	4	2	4	2	4	4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g	0,15	0,15	—	—	—	—	—	—	—
anilin	g	—	—	—	2	—	2	—	—	—
trietanolaminhydro- chlorid	g	—	—	—	—	2	—	2	—	—
melasa	g	—	—	3—6	—	—	3	3	3	2*)
agar	g	20	20	20	20	20	20	20	20	20

\*) Zahuštěné melasové výpalky



Obr. 1. Suspenze směsi sacharomycet a *Candida robusta*, kultivovaná 3 dny na půdě 3 (s 6 g melasy na 1 litr)  
*Candida robusta* — velké kolonie; *Sacharomycety* — malé kolonie

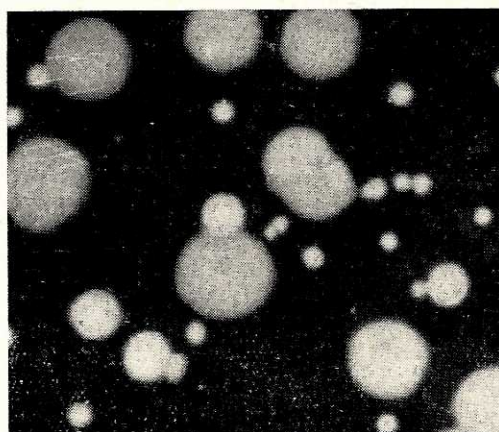


Obr. 2. Suspenze směsi sacharomycet a *Candida robusta*, kultivovaná 2 dny na půdě 3 (s 3 g melasy na 1 litr)  
*Candida robusta* — velké kolonie; *Sacharomycety* — malé kolonie

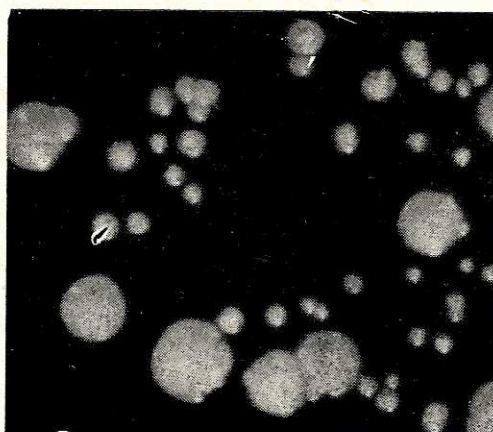
a odečítat všechny tři typy kvasinek z jedinéisky.

V další fázi jsme se pokusili nahradit lysin jinými zdroji dusíku neasimilovatelného sacharomycetami. Postupovali jsme empiricky a vyšli z předpokladu širokého asimilačního spektra kvasinek rodu *Candida*. Očekávali jsme, že mohou eventuálně asimilovat dusík některých organických aminů, ať primárních či výše substituovaných. Kladli jsme důraz na snadnou dostupnost a možnost přípravy

v čistém stavu. Vyzkoušeli jsme tak anilin a trietanolaminhydrochlorid. S použitím těchto látek jsme připravili půdu 4 a 5 (tabulka 1), u nichž jsme však volili nižší koncentraci dusíkatého substrátu vzhledem k možnému inhibičnímu účinku. Na obou těchto půdách rostly zkoušené kvasinky rodu *Candida* dosti dobře, sice pomaleji než na lysinové půdě, avšak podstatně lépe než na čistě glukózové půdě.



Obr. 3. Suspenze směsi sacharomycet a *Candida robusta*, kultivovaná 3 dny na půdě 7 (trietanolaminový agar)  
*Candida robusta* — velké kolonie; *Sacharomycety* — malé kolonie



Obr. 4. Suspenze směsi sacharomycet a *Candida robusta*, kultivovaná 3 dny na půdě 6 (anilinový agar)  
*Candida robusta* — velké kolonie; *Sacharomycety* — drobné a střední kolonie

Růst na trietanolaminové půdě byl rychlejší než na anilinové. *Sacharomycety* na těchto půdách nerostly, avšak bylo-li k nim přidáno po třech gramech melasy na litr, narůstaly i sacharomycetové

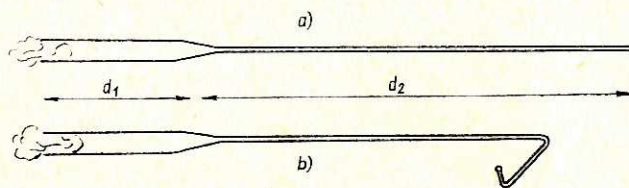


kolonie ve velmi dobře odečitatelné formě (půdy 6, 7, v tabulce 1). Rovněž růst kolonií sacharomycet je poněkud tlumen anilinem ve srovnání s trietanolaminem (obr. 3 a 4). Půdy nejsou nijak náročné na přesnost dozování použitých složek. U anilínové půdy (4, resp. 6) je třeba dbát na výsledné pH, jež se má pohybovat mezi 5 až 5,5. (Trietanolaminhydrochloridu i anilinu se použilo v čisté formě, předčištěných rekrystalizací, resp. destilací.)

Srovnání nálezů obsahu „nepravých“ kvasinek v droždí pomocí uvedených selektivních půd (lysínové, trietanolaminové a anilínové), dotovaných limitovaným množstvím melasy, dávalo na vzorcích pekařského expedičního i generačního droždí výsledky velmi dobré, jak vyplývá např. z tabulky 2. Je to plně pochopitelné, poněvadž jde pouze o obměnu téže metodiky.

Vesmíš jsme používali kultivace při teplotě 28 až 30 °C. Třeba upozornit, že při opakovaném rozehrívání anilínového agaru v autoklávu postupně ubývá tuhosti agarového gelu. Je proto vhodné připravovat tuto půdu do zásoby v menších lahvičkách po asi 150 až 200 g a rozehrívát ve vroucí vodní lázni.

Další možné zjednodušení přípravy půd pro odlišování „nepravých“ kvasinek a Sacharomycet představuje půda 8 (tabulka 1), v níž byly vypuštěny mimomelasyové dusíkaté zdroje pro zástupce rodu *Candida*. V melase, jak známo, je obsažen jako jedna z hlavních dusíkatých složek betain, který jsou schopny „divoké“ kvasinky asimilovat, zatímco sacharomycety nikoli. Při průměrném obsahu 1,5 % dusíku v melase připadá přibližně 0,3 % dusíku na dusík sacharomycetami asimilovatelný a 0,5 až 0,6 % na dusík betainový. Tyto „divoké“ kvasinky mají tedy k dispozici podstatně větší množství asimilovatelného dusíku než sacharomycety, i při nepatrném dávkování melasy do půdy, jak je tomu v popsané metodě limitovaného růstu sacharomycet. Je pravděpodobné, že i další dusíkaté složky melasy jsou zčásti „divokými“ kvasinkami zužitkovávány. Při praktických zkouškách půdy 8 bylo rovněž dosaženo velmi příznivých výsledků z hlediska možnosti odděleného odečítání sacharomycet a nepravých kvasinek. Ze stejného hlediska se jeví jako výhodný další přirozený dusíkatý substrát, jímž lze nahradit melasu, a to zahuštěné lihovarské výpalky. Vzhledem k poměrně většímu obsahu betainového dusíku, vzhledem k dusíku asimilovatelnému sacharomycetami a celkovému zkoncentrování dusíkatých živin, se vystačí s dávkou 1 až 2 g zahuštěných výpalků do 1 litru půdy. K praktickému vyzkoušení byla připravena půda 9, obdobná půdě 8, v níž byla melasa nahrazena dvěma gra-



Obr. 5. Modifikovaná Pasteurova pipeta

a) kapilára k očkování; d<sub>1</sub> — asi 40 mm; d<sub>2</sub> — asi 220 mm; b) kapilára s kličkou k roztěru

my výpalků. Zahuštěné výpalky je možno k přípravě půd pohodlně mechanicky vyčerpat zředěním vodou 1 : 3 a odstředěním, takže lze tímto způsobem připravit půdu zcela čistou. Přidavek výpalků je možno podle praktických výsledků v jednotlivých provozech podle potřeby měnit. Na základě dosažených zkušeností považujeme půdu 9 za nejvýhodnější modifikaci pro provozní i kontrolní účely, poněvadž se na ní dosahuje sice limitovaného, avšak velmi zřetelného růstu kolonií sacharomycet, značně odlišných od velikých kolonií „nepravých“ kvasinek, a současně jsou vyloučeny veškeré deficitní látky. Vzhledem k malé dávce výpalků je možné, aby si každá laboratoř uchovávala zásobu odzkoušených výpalků po dlouhou dobu.

Při vlastním očkování, vzhledem ke způsobu odečítání kolonií, není třeba takové péče při přípravě a odměřování kvasničné suspenze jako při stanovení ze 2 misek (na selektivní a neselektivní půdě). Je třeba dbát pouze o to, aby zásev na plotně činil asi 50 až 250 kolonií.

Jako velmi vhodná se nám osvědčila tato technika očkování s použitím tenké skleněné kapiláry:

Kvasničnou suspenzi nasajeme do sterilní kapilárky (obr. 5a), vneseme do misky dotekem na povrch agarové plochy 1 až 2 kapky (celkem asi 0,05 ml), kapilárku nad plamenem lihového kahanu zatavíme a ohneme vlastní vahou skla do kličky tvaru, zřejmého z obr. 5b. Tím vznikne z kapiláry velmi vhodný nástroj k roztírání kapky suspenze, který vzhledem k pružnosti tenké kapiláry naprosto neporuší hladkou plochu agaru. Kapku suspenze pečlivě rozetřeme po celé ploše. Na takto upravené kapiláře ulpí jen velmi malé množství suspenze. Celý roztěr lze provést asi za 1 min.

Uvedené skleněné kapiláry zhotovujeme do zásoby z asi 10 cm dlouhých trubek z měkkého skla, vnějšího průměru 4 až 6 mm vytažením po nahuštění skloviny na potřebnou délku a kapiláru rozpůlíme. Sterilujeme a uchováme v plechovém válci potřebné délky.

Při uvedené technice očkování se nám osvědčila nejlépe tato příprava suspenze: Asi 1 g droždí se

Tabulka 2

Půda	Droždí pekařské Pavlovičky			Droždí pek. Pavlovičky		Droždí pek. Pavlovičky		Droždí pek. Hejčín		Droždí pek. Hejčín		Droždí pek. Hejčín	
	S %	KR %	KT %	S %	KR %	S %	KR %	S %	KR %	S %	KR %	S %	KR %
3 (lysínová)	84,2	15,0	0,8	82,5	17,5	83,0	17,0	55,0	45,0	43,4	56,6	84,7	15,3
7 (trietanol.)	79,1	20,3	0,6	81,2	18,8	—	—	—	—	—	—	—	—
5 (anilin.)	83,4	16,3	0,3	—	—	85,0	15,0	58,0	42,0	43,5	56,5	83,7	16,4

Poznámka: S — sacharomycety; KR — *Candida robusta*; KT — *Candida tropicalis*



rozptýlí tyčinkou ve 2 až 3 ml pitné vody, suspenze se rozmíchá ve 250 ml pitné vody, 0,5 ml této suspenze se vnese do 100 ml sterilní vody a po rozmíchání se konečně zředí 0,5 ml suspenze 100 ml sterilní vody. Touto konečnou suspenzí kvasinek očkujeme povrch agaru na misce množstvím 0,05, maximálně 0,1 ml. To odpovídá přibližně 100 až 200 zárokům při průměrné hmotě 1 kvasinky  $5 \times 10^{-5}$  gama.

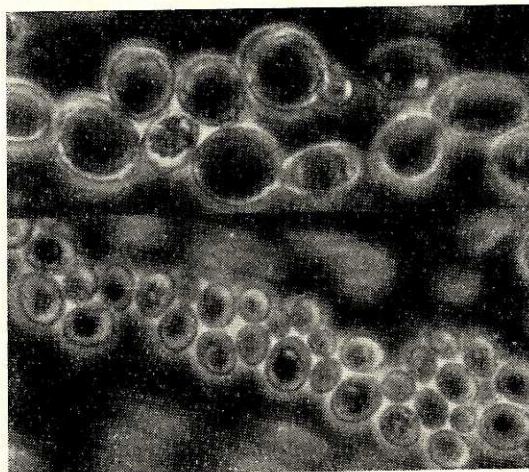
#### Diskuse

Při praktických zkouškách droždí popsanými metodami jsme pozorovali v některých případech, že kolonie sacharomycet mohou nabývat např. 2 odlišných velikostí (obr. 3), i když odhlédneme od skutečnosti, že kolonie mohou vzhledem k omezovanému množství asimilovatelných živin narůstat v místech řidšího zásevu do větší velikosti než v místech hustého zásevu. Stávalo se to tehdy, použilo-li se v provozu droždárny směsných kultur sacharomycet, jež se lišily vzájemně asimilační šíří vzhledem k dusíkatým složkám melasy. Identifikace sacharomycet odlišných kolonií byla provedena mikroskopicky i kultivačně.

S možností, že sacharomycety mohou tvořit různé velikosti kolonií, je třeba počítat zvláště při zavádění některých nových hybridních kmenů do provozu v jednotlivých droždárnách a pracovníci si musí při zavádění metody ověřit mikroorganismy mikroskopicky i kultivačně. Velikosti kolonií sacharomycet se však zásadně odlišují od velikosti kolonií *Candida*, takže záměny jsou skoro vyloučeny. Je třeba dále doporučit, aby si pracovníci v jednotlivých droždárnách vyzkoušeli vhodnou modifikaci, nejlépe srovnáním s výsledky na předepsané lysinové půdě.

Na velikost i rychlost růstu sacharomycetové kolonie má vedle uvedených okolností vliv i fyziologický stav a vnitřní bohatství výchozí buňky živinami. Pozorovali jsme např., že sacharomycety II. generace a zvláště I. generace rostou rychleji a tvoří poněkud větší kolonie než sacharomycety expedičního droždí, které jsou podstatně chudší z hlediska obsahu zásobních i růstových látek.

Zajímavou otázkou je chování sacharomycet při



Obr. 6. *Saccharomycety* z kolonie na půdě s lysinem a melasou (3 se 3 g melasy na liter)

Na polovině obrázku jsou droždářské sacharomycety stejně zvětšené

limitovaném růstu. Morfologicky jsme sledovali na lysinové půdě s melasou i na půdách s anilinem a trietanolaminem růst kvasničných buněk a zjistili jsme, že na půdě s lysinem buňky sacharomycet dosahují mimořádné velikosti, zatímco na druhých půdách mají velikost pouze normální. Na anilinové půdě jsou kvasinky poměrně značně vyzrnné, což přikládáme jedovatosti anilinu. Zvláště velký růst kvasničných buněk (obr. 6) na lysinové půdě přičítáme celkem příznivému prostředí pro vývoj kvasinek, omezený pouze nedostatkem asimilovatelného dusíku. Kvasinky mohou dorůstat maximální velikosti, avšak vzhledem k vyčerpání deficitních látek se nemohou úměrně množit. Zajímavé by bylo zjištění obsahu lysinu v bílkovinách těchto kvasinek ve vztahu ke kvasinkám vypěstovaným v normálním prostředí

#### Literatura

- [1] Kubíček, R. — Housková, A.: Vliv nepravých kvasinek na pekařské vlastnosti droždí. = „Kvasný průmysl“, 11, 1965: 103.
- [2] Bartl, V. — Muzikář, V.: Sledování ukazatelů jakosti u pekařského droždí. = „Průmysl potravin“, 15, 1964: 582.
- [3] Syhorová, V.: Rychlé stanovení kontaminujících mikroorganismů v pekařském droždí. = „Průmysl potravin“, 15, 1964: 585.

Došlo do redakce 16. 11. 1965.

#### ЗАМЕТКИ К МЕТОДАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ДРОЖЖЕЙ В ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖАХ

Для определения в производственных условиях посторонних дрожжей, заражающих хлебопекарные дрожжи, предлагается метод, основанный на принципе культивации. Дрожжи выращиваются на агар-агаре, содержащем глюкозу, анилин (или хлористоводородный триэтанол-амин,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и меласу или солодовый экстракт. Эта среда создает нужные условия для размножения колоний посторонних дрожжей (напр. *Candida utilis*, *Candida tropicalis*) и дрожжей истинных (*Sacch. cerevisiae*). Колонии разных дрожжей легко различаются по величине и идентифицируются.

#### BEMERKUNGEN ZUR METHODIK DER FREMDHEFENBESTIMMUNG IN BACKHEFE

Für die betriebliche Bestimmung kontaminierender Hefen in Backhefe wird eine geeignete Kultivationsmethode vorgeschlagen. Der angewandte Agarboden, der Glukose, Anilin bzw. Trietanolamin-Hydrochlorid,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und Melasse, bzw. Malzextrakt enthält, ermöglicht das Wachstum nicht nur der Betriebshefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sondern auch der kontaminierenden Hefen (*Candida utilis*, *Candida tropicalis*). Die Kolonien des Betriebsstammes und der kontaminierenden Stämme sind aufgrund ihrer ungleichen Größe leicht unterschiedbar.

#### REMARKS TO METHODS USED FOR THE DETERMINATION OF CONTAMINATING YEAST IN BAKERY YEAST

The article deals with the methods applied for the determination of contaminating yeast in bakery yeast, of which one, based upon cultivation, can be recommended for routine inspections at plants. The substrate is agar containing glucose, aniline or hydrochloric triethanolamine,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and molasses or malt extract. This substrate accelerates the growth of colonies of contaminating families (*Candida utilis*, *Candida tropicalis*) and true yeast (*Sacch. cerevisiae*). The colonies can be easily distinguished by their different sizes.