

Optimalizácia podmienok pre asimilačné testy kvasiniek

Ing. RENÁTA KOVAČOVSKÁ, Ing. ELENA SLÁVIKOVÁ, CSc., Chemický ústav SAV, Bratislava

663.12 663.131

Kľúčové slová: kvasinky, asimilačné testy, vplyvy, zdroj, uhlík, dusík

Úvod

V kvasnom priemysle sa vo veľkej miere používajú čisté kultúry kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. S tým súvisia problémy kontaminácie výroby inými kvasinkami, mutačné zmeny produkčných kultúr, znečistenie baktériami a pod. Preto je potrebné priebežne kontrolovať kultúry kvasiniek, ich fyziologické vlastnosti, hlavne schopnosť utilizovať rôzne zdroje uhlíka a dusíka. Dôkaz asimilácie je často spojený s problémami. Jedným z nich je časová náročnosť asimilačných testov, ktorá súvisí s množstvom testovaných zdrojov uhlíka. Napríklad *Lodderová et al* [1] odporúča na testovanie až 32 rôznych zlúčenín uhlíka. *Kocková-Kratochvílová et al.* [2] znížila množstvo testovaných látok na 11 (mal-tóza, sacharóza, laktóza, rafinóza, melezitóza, D-xylóza, L-arabinóza, inulín, trehalóza, celobióza, škrob). *Kreger-van Rij* [3] znížila počet testovaných zdrojov uhlíka na

18 až 27. Ďalší problém spočíva v tom, že asimilačné testy nie sú štandardizované. Niektorí pracovníci uprednostňujú prácu v kvapalnom kultivačnom prostredí [4, 5], iní na médiu spevnenom agarom [6, 7]. Vzhľadom k tomu, že štandardizácia nebola doteraz urobená, a teda neexistujú presne vypracované postupy, ktoré by sa odporúčali, bolo by potrebné preveriť podmienky, za akých testy prebiehajú. Vybrali sme k tomu kmene kvasiniek, ktoré sa líšili fyziologickými vlastnosťami [8]. Preskúšali sme vplyv rôznych faktorov, ako je pH prostredia, koncentrácia očkovacej suspenzie, vplyv vitamínov a pod. Výsledky týchto testov ukázali, že existuje celý rad faktorov, ktoré majú vplyv na výsledky. Ak tieto pracovné postupy nie sú dodržané, môžu sa výsledky značne odlišovať. Nie je preto zvláštne, že asimilácie zdrojov uhlíka a dusíka dokazuje jeden autor ako negatívne a druhý ako pozitívne. Cieľom práce je ukázať, ako treba postupovať pri identifikácii kvasiniek s použi-

tím asimilačných testov. Na základe našich výsledkov navrhujeme určitý štandardný postup, ktorý by mal byť dodržaný.

Návrh štandardného postupu pri testoch asimilácie zdrojov uhlíka a dusíka kvasinkami

Predovšetkým je potrebné preveriť čistotu používaných chemikálií a substrátov, ako sú sacharidy, polyóly, alkoholy, dusíkaté látky. Nesmú obsahovať zvyšky ľahko ušľachťovateľných látok, napr. glukózy, ktoré by skreslili výsledok. Asimilačným testom pri určovaní kvasiniek musia predchádzať niektoré iné testy:

1. Zistenie optimálnej teploty [9]. Použitím nevhodnej teploty, napr. pri kmeňoch psychrofilných príliš vysokej, môže dochádzať k spomaleniu, prípadne zamoreniu rastu a predĺženiu počiatočnej rastovej fázy. Zistenie optimálnej teploty a teplotného rozmedzia umožní vylúčiť inkubačnú teplotu ako faktor, ktorý môže podmieniť variabilitu výsledkov.

2. Je potrebné vopred zistiť potrebu vitamínov. Robí sa to jednoduchým testom, ktorý umožní zistiť, či daný mikroorganizmus rastie v prostredí bez vitamínov alebo nie [9].

V prípade, že kmeň vitamíny potrebuje, musia sa pridať do prostredia, alebo sa môžu pridať na krúžky z filtračného papiera aspoň tie najpotrebnejšie pre kvasinky, ako je biotín, pantotén, pyridoxín, inozitol, niacín a pod.

3. Jednoduché testy kvasenia môžu predchádzať testom asimilačným. V prípade kvasenia jednotlivých sacharidov v [9] ich už netreba testovať na asimiláciu, pretože sacharidy, ktoré sú skvasované, sú aj asimilované.

Pri preverovaní asimilácie zdrojov uhlíka a dusíka treba dodržať určitý postup:

a) Pri testovaní asimilácie na pevných pôdach v Petriho miskách je potrebné také množstvo agaru, aby počas inkubácie nevysychal a tak neobmedzoval rozmnožovanie kvasiniek. Podľa výsledkov v tab. 1 možno odporučiť hrúbku agarovej vrstvy 4 až 5 mm.

Tab. 1. Závislosť vlastností agaru a kvality zón od hrúbky agaru

Hrúbka agarovej vrstvy mm	Vlastnosti agaru	Kvalita zón
1	agar vyschol už po 3 až 4 dňoch	slabo viditeľné
3	vlastnosti agaru sa nemenili počas 7 dní	dobré viditeľné veľké zóny
6	vlastnosti agaru sa nemenili počas 8 dní	slabšie viditeľné v dôsledku hrubšej agarovej vrstvy

Tab. 2. Závislosť kvality rastových zón od koncentrácie buniek v ml inokula

Konc. buniek v ml inokula	Kvalita rastových zón
10 ⁴	zóny neboli viditeľné
10 ⁶	zóny slabo viditeľné aj po niekoľkodňovej inkubácii
10 ⁷	už po 24 h veľké, dobre viditeľné zóny
10 ⁹	po 24 h boli zóny slabo viditeľné, po dvoch dňoch bola celá miska prerastená, zóny neboli vôbec viditeľné

Tab. 3. Závislosť veľkosti zón od koncentrácie sacharidov na agarom spevnenom médiu

Konc. sacharidov [g.l ⁻¹]	Priemer zóny [mm]	
	maltóza	sacharóza
20	15	22
100	29	30
200	29	32
kryštálík pevnej látky	30	32

b) Je dôležitý fyziologický stav kultúry. Kultúra má byť pripravená tak, aby nebola staršia ako 24 až 72 h.

c) Pri zaočkovaní pevného prostredia treba používať vhodnú koncentráciu očkovacej suspenzie, približne 10⁷ buniek v 1 ml (tab. 2). Pri použití nižšej koncentrácie suspenzie buniek sa výsledky môžu skresliť tak, že môžu byť hodnotené ako negatívne, naproti tomu vyššie koncentrácie umožnia nárast z vlastných zdrojov, t. j. z autolyzovaných alebo inak poškodených buniek, takže výsledok sa prejaví rovnomerným porastom na miske.

d) Treba dodržiavať optimálnu koncentráciu testovaných zdrojov uhlíka. Z tab. 3 vyplýva, že koncentrácia 100 g.l⁻¹ je najvhodnejšia. Nižšia koncentrácia môže rastovú zónu veľmi zúžiť a pri zle rastúcich kmeňoch sa môžu ľahko odčítať negatívne výsledky. Vyššie koncentrácie, prípadne kryštálky testovanej látky môžu spôsobiť, že široké nárastové zóny splývajú.

e) Závislosť asimilácie sacharidov od pH (pH agarom spevneného prostredia bolo upravované kyselinou sírovou s konc. 1 mol.l⁻¹). Pri štúdiu asimilácie druhu *Hansenula fabianii* kmeň CCY 38-20-1 sme zistili, že daný kmeň asimiluje aj rafinózu pri pH 4,8 a 5,1, zatiaľ čo pri vyššom pH sa asimilácia neprejavila. Vzhľadom k tomu, že aktivity rôznych enzýmov sa prejavuje v určitom rozmedzí pH, odporúčame zakladať dve paralelné misky, kde v jednej je pH upravené na 4 až 5 a v druhej na 6.

Tab. 4. Závislosť asimilácie sacharidov od pH na agarom spevnenom médiu s vitamínmi pre druh *Hansenula fabianii* kmeň CCY 38-20-1.

Asimilácia sacharidov					
pH	Mal	Sac	Lac	Raf	Mlz
4,8	+	+	—	slabo	+
5,1	+	+	—	slabo	+
5,6	+	+	—	—	+
6,1	+	+	—	—	+
6,6	+	+	—	—	+
6,9	+	+	—	—	+
pH	Xyl	Ara	Inl	Cel	Tre
4,8	+	—	—	+	+
5,1	+	—	—	+	+
5,6	+	—	—	+	+
6,1	+	—	—	+	+
6,6	+	—	—	+	+
6,9	+	—	—	+	+

Vysvetlivky:

Mal	maltóza	Xyl	D-xylóza
Sac	sacharóza	Ara	L-arabitolóza
Lac	laktóza	Inl	inulín
Raf	rafinóza	Cel	celobióza
Mlz	mlezitóza	Tre	trehalóza

f) Pri testovaní asimilácie dusíkatých látok na agarom spevnenom médiu odporúčame robiť aj paralelný test v kvapalnom prostredí, založený na redukcii dusičnanov na dusitany. Dusitany vytvoria s α -naftylamínom v prostredí kyseliny sulfanilovej červený azokomplex [10]. V prípade, že je test na agarom spevnenom médiu pozitívny a v kvapalnom prostredí negatívny, treba preveriť aj asimiláciu dusitanov.

Testy asimilácie treba doplniť aj preskúmaním morfológických vlastností, ako sú tvary buniek, tvorba pseudomycélia, prípadne tvorba askospór. Všetky tieto testy môžu byť dobrým vodítkom na potvrdenie správnosti výsledkov asimilačných testov.

Literatúra

- [1] LODGER, J. et al.: Yeast, a taxonomic study, North — Holland Publishing Company — Amsterdam, London 1970
- [2] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., SLÁVIKOVÁ, E.: Základy klasifikácie kvasinkovitých druhov. Biológia, 1984 — v tlači
- [3] KREGER - VAN RIJ, N. J. W.: Yeast, a taxonomic study North — Holland Publishing Company — Amsterdam, London, 1984
- [4] WICKERHAM, L. J., BURTON, K. A.: J. Bacteriol. **56**, 1948, s. 397
- [5] EARNETT, J. A., INGRAM, M. J. App. Bacteriol. **18**, 1955, s. 131
- [6] SAITO, K., Japan J. Botany, **1**, 1922, s. 1
- [7] SHRIFFINE, M., PHRAFF, H. J., DEMIAN, A. L.: J. Bacteriol., **68**, 1954, s. 28

- [8] KOVAČOVSKÁ, R.: Diplomová práca, SVŠT-CHTF, Bratislava 1984
[9] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., et al.: Katalóg kultúr kvasiniek, VEDA, Bratislava, 1977
[10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., TOMÁSEK, K., ONDŘÍŠKOVÁ, M.: Biologická a kontrola výroby piva a nealkoholických nápojov, ALFA/SNTL, Praha, 1980

Kovačovská, R. - Sláviková, E.: Optimalizácia podmienok pre asimilačné testy kvasiniek. Kvas. prům., 31, 1985, č. 9, s. 204—206.

Schopnosť asimilovať uhlíkaté a dusíkaté zdroje kvasinkami a kvasinkovými mikroorganizmami je dôležitým faktorom pri určovaní druhov. Článok sa zaoberá rôznymi faktormi, ako je pH, teplota, koncentrácia očkovačej suspenzie, koncentrácia látok používaných na asimiláciu. Zároveň je navrhnutý štandardný postup, ktorý by mal byť dodržaný.

Ковачовска, Р., Славикова, Е.: Оптимизация условий для испытания ассимиляции дрожжей. Квас. прум. 31, 1985, № 9, стр. 204—206.

Способность усваивания углеродо-и азотосодержащих источников дрожжами и дрожжевыми микроорганизмами является важным фактором при определении из типов. Статья занимается разными факторами, как pH, температура, концентрация инокулирующей взвеси, концентрация веществ, применяемых для ассимиляции.

Одновременно предлагается стандартный метод, который следовало бы соблюдать.

Kovačovská, R. - Sláviková, E.: Optimization of Conditions for Assimilation Tests of Yeasts. Kvas. prům. 31, 1985, No. 9, pp. 204—206.

The significant factor for the determination of yeast species is the ability to assimilate carbon and nitrogen sources by yeasts and yeast-like microorganisms. The effects of pH, temperature, a concentration of the inoculated suspension and that of substrates used for an assimilation were tested. The standard procedure for the determination of the yeast species is described.

Kovačovská, R. - Sláviková, E.: Optimalisierung der Bedingungen für die Assimilationsteste der Hefen. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 9, S. 204—206.

Die Fähigkeit der Hefen und hefeartigen Mikroorganismen, Kohlenstoff- und Stickstoffhaltige Quellen zu assimilieren, stellt einen wichtigen Faktor bei der Bestimmung der Arten dar. Der Artikel behandelt die verschiedenen Faktoren wie pH, Temperatur, Konzentration der Impfungssuspension, Konzentration der zur Assimilation verwendeter Substanzen. Es wird weiter ein Standardverfahren empfohlen, daß bei den Assimilationstesten eingehalten werden sollte.