Stanovení kontaminujících kvasinek v pekařském droždí metodou fázového kontrastu

JOSEF TOMÍŠEK, Spojené lihovary, n. p. Praha, závod Drožďárna Kolín

664.642
663.14

Stále se zvyšující požadavky na jakost pekařského droždí, vynucené hlavně automatizací v pekárnách, jsou předmětem mnohých diskusí. Jedním z hlavních bodů je zkracování doby kynutí a s tím souvisící obsah kontaminujících kvasinek, nesprávně nazývaných *nepravé.*

Jen zkušený pracovník poměrně dobře rozezná pod mikroskopem kontaminující kvasinky v obyčejném preparátu. Nesmí přitom zapomenout na časté diferenciace základního kmene vlivem životních a technologických podmínek, vyvolávajících změny tvaru buňky, strutkury plasmy atd. Z těchto důvodů bylo vypracováno několik metod pro stanovení kontaminujících kvasinek v pekařském droždí, aby se tak dostalo porovnatelných výsledků pro hodnocení jeho kvality. Jsou to metody:

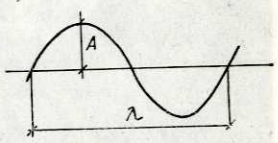
1. Pěstování na lysinové půdě (dl-lysin monochlorid)
2. Pěstování na glukóze
3. Pěstování na sladince

Všechny tyto metody jsou kultivační a k získání výsledků vyžadují 72 až 96 hodin. I když jsou tyto metody jinak dobré, pro drožďářskou praxi jsou časově neúnosné. Větším potížím při výrobě lze se vyhnout jen rychlým zjištěním a zásahem. A toto poskytuje metoda fázového kontrastu.

Fázový kontrast

Metoda fázového kontrastu [1], zavedená do mikroskopie Holanďanem *F. Zernikem,* je metoda mikroskopického pozorování, lišící se principálně od všech ostatních, dříve užívaných metod. Jejím objevem se značně rozšířilo pole mikroskopického bádání, neboť mnohé objekty lze touto mikroskopickou technikou pozorovat podstatně lépe než jinými metodami a v některých případech je tato metoda jediným vyhovujícím způsobem pozorování.

V mikroskopické technice jde vesměs o zobrazení osvětlených preparátů. Má-li být viditelný určitý detail preparátu, musí způsobit ve světle, které naň dopadá, nějakou změnu, odlišnou od změny, jež je vytvářená okolním prostředím, tj. musí odlišně změnit některou z veličin, charakterizujících příslušné světelné vlnění, tj. amplitudu (určující intenzitu světla), vlnovou délku (udávající barvu světla), fázi popř. polarizaci. Podle druhu změny rozlišujeme různé mikroskopické metody [2]. Velmi nesnadné je zobrazit struktury, které jsou bezbarvé a od svého okolí se liší jen indexem lomu. Příliš velký rozdíl v indexu lomu způsobuje silné černé orámování struktury, při malých rozdílech v něm splývá obraz s okolím. Nejvýraznější je obraz preparátu, zbarvený uměle či přirozeně. Struktury pohlcují část světla a propouštějí jen zbytek. Stejně tomu je i u nezbarvených preparátů, jejichž struktury různě zmenšují intenzitu světla (jako by byly obarveny v různých stupních šedi), o níž víme, že je určována amplitudou světelné vlny.



A — amplituda — intenzita světla je úměrná čtverci amplitudy příslušného vlnění; λ — vlnová délka — je vzdálenost dvou sousedních míst v témže pohybovém stavu

Obr. 1. Fáze (φ) charakterizuje pohybový stav vlnění v určitém místě, udává se ve stupních, přitom dva stavy, jejichž fáze se liší o 360°, jsou totožné

Nezbarvené objekty nemění však amplitudu světla, které jimi prochází, ale působí na stav světelného vlnění, posunují jeho fázi. Zatímco rozdíl v kmitočtu (tedy i v délce vlny) a amplitudě vlny naše oko zachytí jako rozdíl v barvě nebo intenzitě světla, změnu fáze nerozezná. Je tedy nutno přenést rozdíly fází na rozdíly v amplitudě a potom lze rozlišit i struktury, které způsobily změnu fáze.

Tuto podmínku splňuje metoda fázového kontrastu. V podstatě jde o posunutí fází, konkrétně posunutí nultého maxima o čtvrtinu vlnové délky. Tím vznikají rozdíly světla a tmy mezi objektem nebo strukturou a médiem. Vznikne tak kontrastní obraz, mnohdy i s pěkným barevným rozlišením.

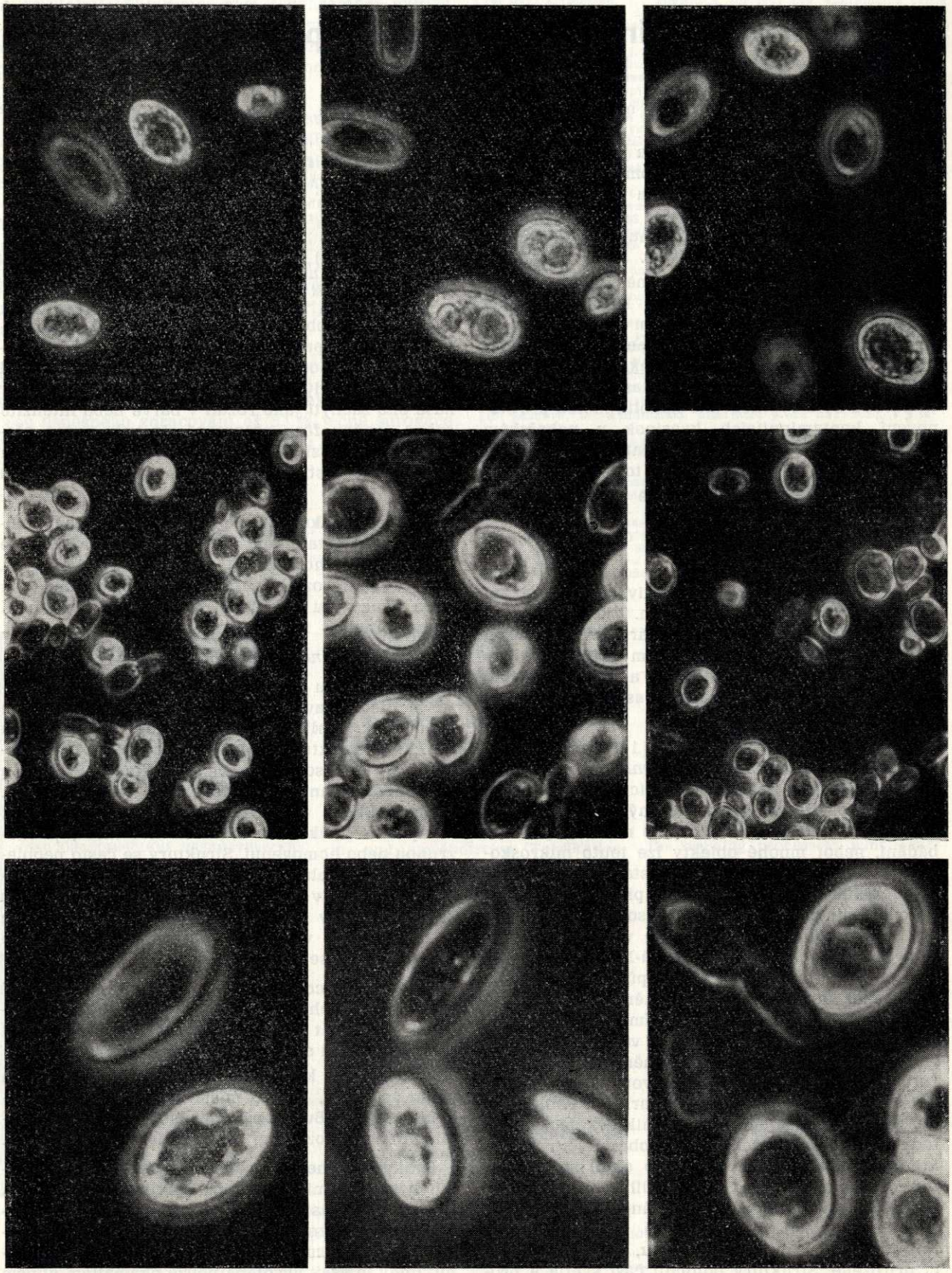
Rozlišení kvasinek pod mikroskopem

V mikroskopu jeví buňka kvasinek strukturu, která je dána hlavními součástmi buňky, jako jsou vakuoly, krystalky některých látek, kapičky tuku atd. Tyto strukturní jednotky mají své fyziologické úkoly a působí vždy ve vzájemném vztahu a v harmonii s funkčním potenciálem celé buňky [3]. Podle velikosti a množství strukturních jednotek má potom buňka strukturu hrubozrnnou, jemnozrnnou nebo homogenní. Struktury se často neobjevují dosti zřetelně nebo se jen slabě odlišují. Studium struktur v buňkách vyžaduje proto značnou zkušenost. Aby se některé látky, hromadící se v plasmě nebo v jejich strukturních prvcích lépe poznaly, musí se buňky barvit.

Od té doby, co mikroskopii doplňuje jednoduché zařízení fázového kontrastu a temného pole, můžeme pozorovat i živé buňky nebarvené, s velmi kontrastujícími strukturami.

Ve fázovém kontrastu hustá místa v buňkách velmi tmavnou, kdežto místa řidší zůstávají mnohem světlejší. Buňky přitom neusmrcujeme fixacemi ani nepoškozujeme toxickými roztoky barviv.

Buňky kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů bývají velmi rozmanité. Některé tvary buněk jsou charakteristické pro určité druhy. I tyto druhy mají však značnou měnlivost. Rozmanitost buněčných tvarů má někdy pravou genetickou povahu, jindy je však vyvolána pouze okamžitým vlivem prostředí. Tak např. se myslilo, že pseudomycelium vytváří jen zcela určitá skupina kvasinkovitých mikroorganismů, avšak později se ukázalo, že se vyskytuje v souvislosti s výživou a látkovou výměnou, že je to útvar vynucený životními podmínkami



Obr. 2. Vzorky z různých drožďáren

v živném prostředí. Proto je zapotřebí dobře znát kvasinky v praxi, umět je správně ošetřit a správně chápat každou změnu tvaru jako biochemický, funkční odraz změn vnějších podmínek. Musí se

uvažovat o tvarové proměnlivosti přirozené i druhmotně vyvolané, geneticky podložené i vývojově funkční.

Všechny tyto změny (hlavně tvarové) vedly k tomu, že např. protáhlé buňky byly mnohdy pokládány za kontaminující kvasinky (dříve označované jako mykoderma a torula). Při běžném mikroskopickém pozorování, hlavně probíhajících kvasných procesů, stával se často posudek sporný nebo neprůkazný a tak málo užitečný.

Při pozorování obyčejného preparátu fázovým kontrastem se jeví kontaminující kvasinky tmavé, barevně odlišené a tudíž na první pohled nápadné. Takový obraz je potom zřejmý i pro méně zkušeného pozorovatele. I po stránce bakteriální infekce je mikroskopický obraz výraznější, neboť bakteriální buňky se jeví sytě červené. Rozlišení kontaminujících kvasinek bylo ověřeno na větší sérii vzorků pekařského droždí, pocházejícího ze všech našich drožďáren, dodaných pod krycími čísly Státní inspekcí jakosti*) v Praze, která stanovila kontaminující kvasinky u stejných vzorků na lysinové půdě, na glukóze a na sladince.

Shoda výsledků získaných metodou fázového kontrastu s výsledky druhých metod je velmi dobrá. Přitom nutno zdůraznit, že výsledky metodou fázového kontrastu byly získány pozorováním, trvajícím jen 1 až 2 minuty. Pro urychlení a zpřesnění práce je nutné, aby zorné pole mikroskopu mělo stejnou hustotu co do počtu buněk (např. 50 nebo 100). Tím se dosáhne zjednodušení, neboť při spočítání kontaminujících buněk se získá výsledek přímo v procentech.

Postup prací

Naváží se 2 g zkoušeného droždí do 50 ml vody a z připravené suspenze se zhotoví preparát pod mikroskop. V zorném poli je tak vždy asi 100 buněk (při 800násobném zvětšení). Při posuzování aglutinovaného droždí je nutné při přípravě suspense vodu patřičně okyselit kyselinou sírovou, řádně protřepat aby se rozplynuly shluky.

Metoda poskytuje rychle výsledky a je tím velmi užitečná pro mikroskopickou kontrolu výroby. Nutno však podotknout, že touto metodou byly určovány na fázovém zařízení zn. Meopta Praha kontaminující kvasinky, vyskytující se běžně v pekařském droždí tuzemské výroby.

Na mikrofotografiích na *obr. 2* i v černobílém provedení je zřejmý rozdíl mezi buňkami *Saccharomyces cerevisiae* (světlé) a kontaminujícími kvasinkami (tmavé) při různém zvětšení. Preparát pod fázovým kontrastem je pěkně barevný a rozdíly jsou ve skutečnosti ještě zřetelnější.

Tabulka 1

Porovnání výsledků při stanovení kontaminujících kvasinek různými metodami a metodou fázového kontrastu v %

Číslo vzorku	Metoda fázového kontrastu v %	Kontrolní metody		
		sladina %	lysin %	glukóza %
1721	18	11	13	14
1729	45	42	44	45
1629	8	9	8	9
1640	26	30	32	33
1722	30	28	31	32
1893	16	18	20	21
1670	5	3	2	3
1720	8	12	13	10
1692	14	16	14	17
1695	26	26	28	25
1723	16	18	14	20
1628	20	20	23	24
1730	24	22	25	23
1724	45	40	46	50
1694	22	18	21	20
1719	45	50	48	53

Závěr

Stanovení kontaminujících kvasinek v pekařském droždí, bylo dosud prováděno kultivačními metodami, tj. metodami časově náročnými.

K rozlišení kontaminujících kvasinek od *Saccharomycet* bylo použito metody fázového kontrastu. Tímto způsobem se provede stanovení z obyčejného nativního preparátu pouze mikroskopickou prohlídkou. *Saccharomycety* jsou světlé a kontaminující kvasinky (běžně se vyskytující v droždí) jsou tmavé.

Byly porovnány výsledky *(tabulka 1)* získané touto metodou s výsledky získanými kultivačními metodami Státní inspekcí jakosti v Praze. Shoda je velmi dobrá, i když stanovení kontaminujících kvasinek v pekařském droždí trvá jen 1 až 2 minuty. Pro svou jednoduchost a rychlost je to metoda velmi užitečná pro kontrolu technologického procesu.

Obr. 2 dokazuje, že rozlišení kvasinek je zřetelné a jasné. Ve skutečnosti mikroskopický obraz získaný metodou fázového kontrastu je pěkně barevný a ještě lépe zachycuje vzniklé rozdíly než černobílá fotografie.

Literatura

[1] Zařízení pro fázový kontrast — prospekt Meopta.
[2] Pazourek, J.: Pracujeme s mikroskopem.
[3] Kocková-Kratochvílová A. - Kutková, M.: Atlas kvasinek.

*) Stanovení provedl PhMr. V .Muzikář, SIJ Praha.

Došlo do redakce 27. 10. 1966

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ФАЗОВОГО КОНТРАСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ, ЗАРАЖАЮЩХ ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ ДРОЖЖИ

В статье рассматривается возможность применения метода фазового контраста для определения присутствия и определения в хлебопекарных дрожжах заражающих, вредных дрожжей. Метод обеспечивает точное различение истинных дрожжей, т. е. сахаромицетов от дрожжей, заражающих, заводские хлебопекарные дрожжи.

BESTIMMUNG DER KONTAMINIERENDEN HEFEN IN BACKHEFE MITTELS PHASENKONTRASTMETHODE

Für die Bestimmung der kontaminierenden Hefen in Backhefe wird eine Methode mit Anwendung des Phasenkontrastes vorgeschlagen, die eine deutliche Unterscheidung der Betriebsstämme der Hefen Saccharomyces cerevisiae von den kontaminierenden Hefen ermöglicht.

APPLICATION OF THE PHASE CONTRAST METHOD FOR THE DETERMINATION OF CONTAMINATING YEAST PRESENT IN BAKER'S YEAST

The article deals with the application of a microscopic method based upon the phase contrast for the determination of contaminating yeast present in the plant bakery yeast. The method permits to discriminate very reliably plant bakery yeast, i. e. Saccharomyces cerevisiae, from contaminating yeast.