Úhyn Saccharomyces carlsbergensis v lineárním teplotním poli

663.12
582.282.232

Ing. JAN ŠAVEL, Ing. MARIE PROKOPOVÁ
Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

Úvod

V předešlém sdělení [1] jsme popsali přístroj na stanovení tepelné rezistence mikroorganismů. Agarová destička obsahující mikroorganismy se v kovovém pouzdru vloží do lineárního teplotního pole, čímž získají jednotlivá místa vzorku různou teplotu.

Po zvolené době ohřevu se destička ochladí a přenese na živnou půdu. Kultivací se stanoví počet kolonií v jednotlivých částech vzorku. Tento článek se zabývá měřením tepelné rezistence kvasinek *Sacch. carlsbergensis.*

Materiál a metody

Kvasničný kmen

Provozní kmen Sacch. carlsbergensis (č. 2 podle [2]) pocházel ze sbírky podnikové laboratoře.

Přístroj na stanovení tepelné rezistence

Přístroj na ohřev mikroorganismů v lineárním teplotním poli popisuje [1]. Čtvercová agarová destička měla rozměry 12 × 12 × 0,2 cm.

Stanovení tepelné rezistence

Kvasinky Sacch. carlsbergensis se zaočkovaly do sterilní mladiny a kultivovaly 48 h při 28 °C. Po spočítání kvasinek v Thomově komůrce se připravila v sterilní vodě suspenze koncentrace 2000—3000 buněk/ml. 5 ml této suspenze se rozmíchalo v 50 ml 1,5% agaru, roztaveného a ochlazeného pod 44 °C a směsí se ihned naplnilo pouzdro přístroje. Současně se 12,7 ml směsi mikroorganismů s agarem nalilo do Petriho misky (d = 9 cm), aby vznikla agarová vrstva stejné tloušťky jako v pouzdru přístroje.

Po ztuhnutí agaru se pouzdro vsunulo do vyhřátého bloku přístroje. Expoziční doba se volila dostatečně dlouhá (1 h), aby se eliminoval vliv postupného prohřívání vzorku na počátku ohřevu.

Po expozici se pouzdro vyjmulo, ochladilo tekoucí vodou a agarová destička asepticky přiložila na mladinový agar. Po čtyřech dnech inkubace se spočítaly kolonie v jednotlivých místech destičky. Stejným postupem se zpracoval kontrolní vzorek.

Experimentální část

Postup výpočtu

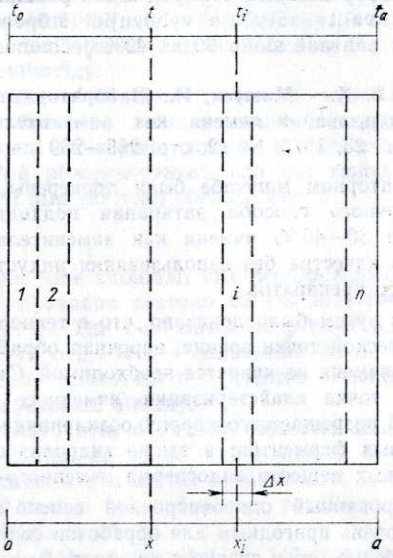
Čtvercová agarová destička o hraně a a malé tloušťce h se orientovala tak, aby teplota lineárně vzrůstala v kladném smyslu délkové souřadnice x; v místě x byla v celé šíři destičky konstantní teplota t. Hrana destičky nacházející se u studeného konce přístroje měla souřadnici $x = 0$, hrana u teplého konce $x = a$. Pro teplotu destičky v místě x platil vztah $t(x) = kx + q$, kde k, q jsou měřením stanovené konstanty.

Zaveďme plošnou koncentraci mikroorganismů m počtem mikroorganismů na jednotky plochy destičky. Mezi plošnou a objemovou koncentrací platí vztah

$$m = h\,c, \qquad (1)$$

kde m je plošná koncentrace mikroorganismů (počet/cm²),
h — tloušťka destičky (cm),
c — objemová koncentrace (počet/cm³).

Před zahříváním předpokládáme rovnoměrné rozptýlení mikroorganismů v destičce s počáteční koncentrací m_o = konst. pro x z intervalu $< 0, a >$. Zahříváním se koncentrace v místě x změní z m_o na hodnotu $m(x)$.



Obr. 1. Dělení agarové destičky
x — délková souřadnice
t — teplota

Hodnoty $m(x)$ se pokusně stanovovaly jako střední koncentrace mikroorganismů $\overline{m(x_i)}$ v úsecích destičky šíře Δx. Destička s narostlými koloniemi se rozdělila na n proužků šířky $\Delta x = \frac{a}{n}$. Proužky se očíslovaly pořadovými čísly 1 až n, střed i-tého proužku měl souřadnici x_i *(obr. 1)*. Potom

$$\overline{m(x_i)} = \frac{N\left\{x_i - \frac{\Delta x}{2}, x_i + \frac{\Delta x}{2}\right\}}{a\,\Delta x} \qquad (2)$$

kde $\overline{m(x_i)}$ je střední plošná koncentrace mikroorganismů

$N\left\{x_i - \frac{\Delta x}{2}, x_i + \frac{\Delta x}{2}\right\}$

počet mikroorganismů v agarovém proužku i se středem v x_i

Δx šířka proužku

V těchto pokusech bylo $a = 12$ cm, $\Delta x = 1$ cm, $n = 12$.

Úhyn mikroorganismů se v malém rozmezí teplot řídí kinetikou prvého řádu

$$\frac{dN}{d\tau} = -kN \qquad k = Ke^{\beta t} \qquad (3)\ (4)$$

kde N je počet mikroorganismů,
τ — čas
K, β — specifické konstanty

Tvar vztahu (4) je v mikrobiologii obvyklejší než závislost (5), která je běžná v chemické kinetice

$$k = Ae^{\frac{-E}{RT}} \quad (5)$$

Nahradí-li se počet mikroorganismů plošnou koncentrací, přejde
(3) integrací na tvar

$$\ln\frac{m_o}{m(x)} = Ke^{\beta t}\Delta\tau \quad , \quad (6)$$

kde m_o je počáteční plošná koncentrace mikroorganismů. Rovnice (6) udává koncentraci mikroorganismů v místě x s teplotou t. Pro lineární teplotní pole platí

$$\ln\frac{m_o}{m(x)} = Ke^{\beta(kx+q)}\Delta\tau \quad (1)$$

Linearizací (6) se získá

$$\ln\ln\frac{m_o}{m(x)} = \ln K\Delta\tau + \beta t \quad (8)$$

podobně jako ze vztahu (7)

$$\ln\ln\frac{m_o}{m(x)} = \ln K\Delta\tau + \beta q + \beta kx \quad (9)$$

Protože se měřením získané hodnoty $\overline{m(x_i)}$ pokládají přibližně za hodnoty $m(x_i)$, lze proložit experimentální body x_i, $\overline{m(x_i)}$ přímkou podle (8) nebo (9).
Směrnicí přímky je konstanta β, popř. βk, úsekem na ose y $\ln K\Delta\tau$, popř. $\ln K\Delta\tau + \beta q$.

Měření

Ve třech nezávislých pokusech se stanovilo množství přežívajících mikroorganismů počtem kolonií v jednotlivých částech vzorku. Vynesením bodů x_i, $\ln\ln\overline{m(x_i)}$ do grafu se ověřila linearita závislosti a metodou nejmenších čtverců stanovily konstanty β, K. Nepřesností měření se v některých případech vyskytly hodnoty $\overline{m(x_i)} > m_o$, tyto hodnoty nebyly do výpočtu zahrnuty. Doba ohřevu se volila jednotná ($\Delta\tau = 60$ min), s různými hodnotami konstant k, q. Jako míra linearity vztahů (8) nebo (9) sloužil korelační koeficient sledované závislosti.

Změřené hodnoty i zpětně vypočtené koncentrace $m(x_i)$ podle vztahu (8) uvádí *tab. 1* pro jeden z pokusů. Ostatní měření jsou zpracována graficky *(obr. 2 až 4)*. Destičky po kultivaci jsou na *obr. 5 až 7*.

Souhrnné výsledky tří nezávislých měření uvádí *tab. 2*. Ze stejné suspenze *Sacch. carlsbergensis* ve vodě se každé stanovení opakovalo dvakrát (stanovení a, b).

Zpětný výpočet

Hodnota $m(x_i)$ se při výpočtech podle (8), (9) nahrazovala střední hodnotou $\overline{m(x_i)}$ v intervalu

$$< x_i - \frac{\Delta x}{2} \; , \; x_i + \frac{\Delta x}{2} > .$$

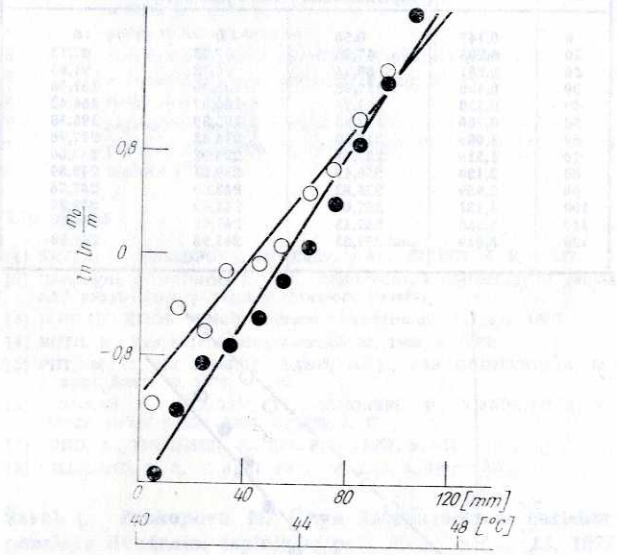
Bez tohoto zjednodušení lze počet kolonií v libovolném úseku vzorku vypočítat podle vztahu

$$N(x_\alpha, x_\beta) = m_o p \int_{x_\alpha}^{x_\beta} \exp\{-K\Delta\tau \exp[\beta(kx+q)]\}\,dx \quad (10)$$

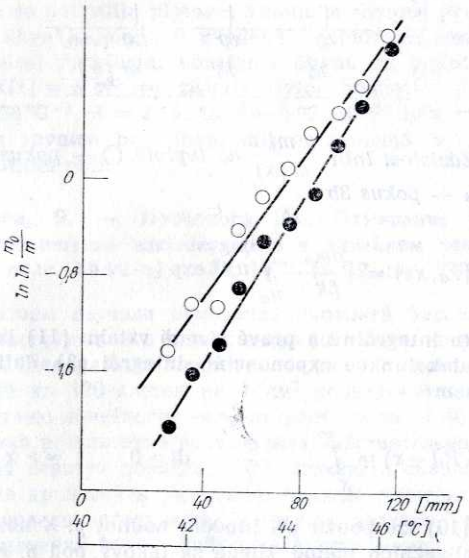
kde $N(x_\alpha, x_\beta)$ je počet kolonií v úseku vzorku ohraničeném délkovými souřadnicemi x_α, x_β a s šířkou p.
Substitucí $u = K\Delta\tau \exp[\beta(kx+q)]$ se získá

Tabulka 1. Záznam úhynu Sacch. carlsbergensis v lineárním teplotním poli (pokus 1b)

Vzdálenost i-tého intervalu x_i (mm)	Teplota v bodu x_i t_i (°C)	Střední koncentrace kolonií $\overline{m}(x_i)$ (kolonie cm^{-2})	$\ln\ln \frac{m_o}{\overline{m}(x_i)}$	zpětně vypočtené m (x_i)
5	40,23	45,58	— 1,7906	47,23
15	40,88	42,17	— 1,2463	44,09
25	41,53	37,33	— 0,8929	40,04
35	42,18	34,67	— 0,7269	35,01
45	42,83	30,50	— 0,4918	29,02
55	43,48	25,33	— 0,2265	19,03
65	44,13	20,00	0,0330	15,50
75	44,78	12,91	0,3861	9,31
85	45,43	5,33	0,8569	4,57
95	46,08	1,25	1,3366	1,69
105	46,73	0,08	1,8802	0,43
115	47,38	pod 0,08	—	0,06



Obr. 2. Závislost $\ln\ln\frac{m_0}{m(x)}$ *na teplotě.* ○ *— pokus 1a,* ● *— pokus 1b*



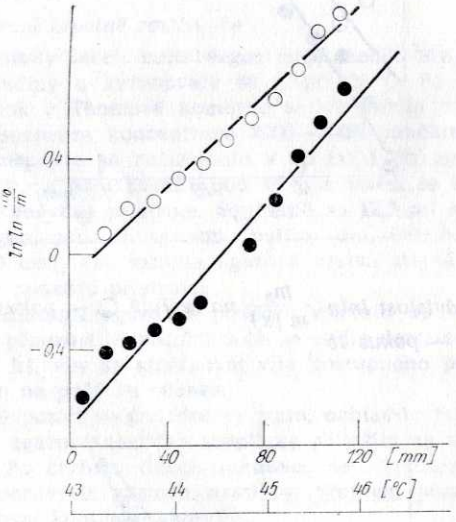
Obr. 3. Závislost $\ln\ln\frac{m_0}{m(x)}$ *na teplotě.* ○ *— pokus 2a,* ● *— pokus 2b*

Tabulka 2. Vyhodnocení úhynu Sacch. carlsbergensis v lineárním teplotním poli (doba ohřevu $\Delta\tau$ = 60 min)

Pokus č.	Konstanty teplotního pole k (mm^{-1})	g (°C)	Počáteční koncentrace m_0 (kolonie cm^{-3})	Korelační koeficient	Konstanty tepelného úhynu β (°C^{-1})	K (min^{-1})
1a	0,0658	39,78	51,78	0,9792	0,39	$9{,}42.10^{-10}$
1b	0,0650	39,90	56,22	0,9888	0,51	$3{,}15.10^{-12}$
2a	0,0500	40,30	51,44	0,9924	0,58	$1{,}51.10^{-13}$
2b	0,0500	40,30	36,22	0,9950	0,68	$9{,}63.10^{-16}$
3a	0,0253	42,92	118,00	0,9929	0,38	$2{,}16.10^{-9}$
3b	0,0267	42,83	114,89	0,9753	0,42	$1{,}15.10^{-10}$

Tabulka 3. Hodnoty funkce $N(O, x_\beta)$ pro měření 1b

$x\beta$ (mm)	u	Počet kolonií v úseku $\langle 0, x_\beta \rangle$ nalezený experimentálně	stanovený podle tab. 1 jako $m(xi)$	$N(0, x_\beta)$ podle (10)
0	0,147	0,58	0	0
10	0,205	47,58	47,23	47,13
20	0,287	89,75	91,32	91,63
30	0,400	127,08	131,36	131,48
40	0,558	161,75	166,37	166,42
50	0,780	192,23	195,39	195,58
60	1,089	217,58	214,42	217,98
70	1,519	237,58	229,92	233,60
80	2,120	250,49	239,23	242,89
90	2,959	255,82	243,80	247,56
100	4,131	257,07	245,49	249,35
110	5,766	257,15	245,92	249,79
120	8,049	pod 257,23	245,98	249,88



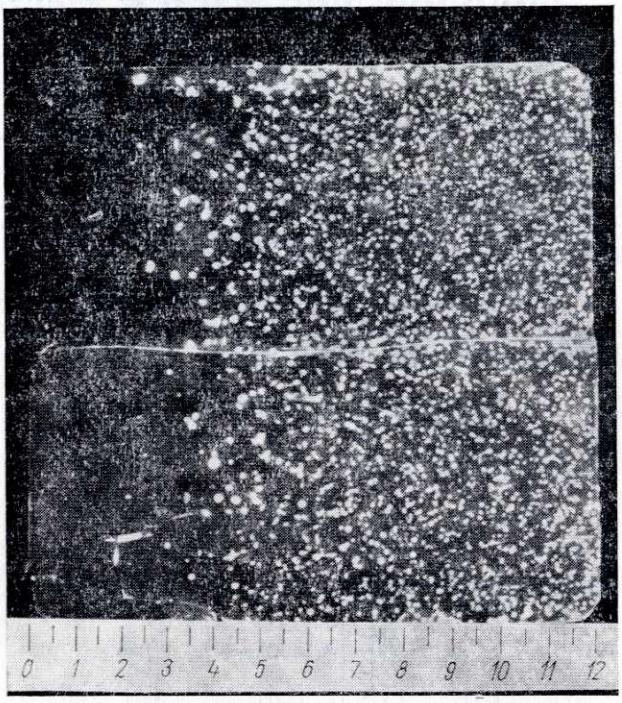
Obr. 4. Závislost $\ln\ln \frac{m_0}{m(x)}$ na teplotě. ○ — pokus 3a, ● — pokus 3b

$$(11)\quad N(x_\alpha, x_\beta) = \frac{pm_o}{\beta k} \int_{u_\alpha}^{u_\beta} u^{-1} \exp(-u)\, du$$

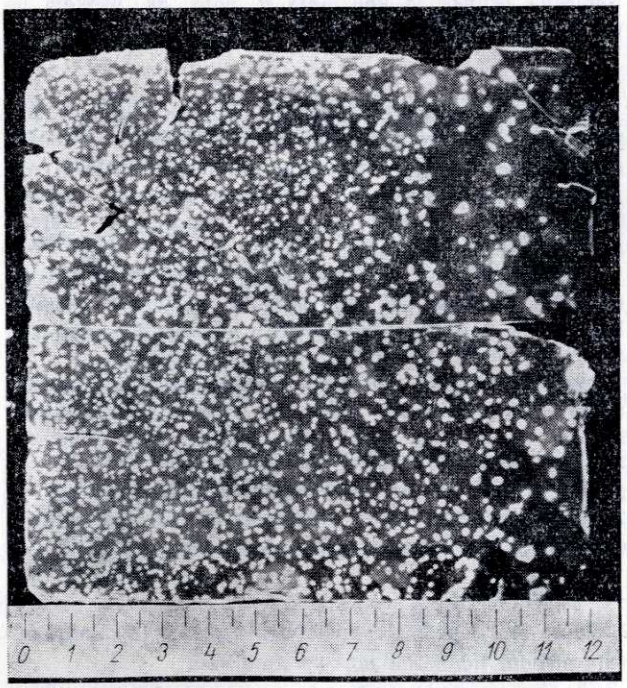
K výpočtu integrálu na pravé straně vztahu (11) lze použít tabulek funkce exponenciál—integrál (3), definované vztahem

$$(12)\quad -E_i(-x) = \int_x^\infty \frac{e^t}{t}\, dt > 0 \qquad \infty > x > 0$$

Vztahu (10) lze použít při hledání hodnot β, K některou z optimalizačních metod. Hledá se takový bod β, K, pro který vypočtená funkce $\left\{x_i + \frac{\Delta x}{2}, N\left(0, x_i + \frac{\Delta x}{2}\right)\right\}$ nejlépe souhlasí s experimentálně zjištěnými hodnotami.



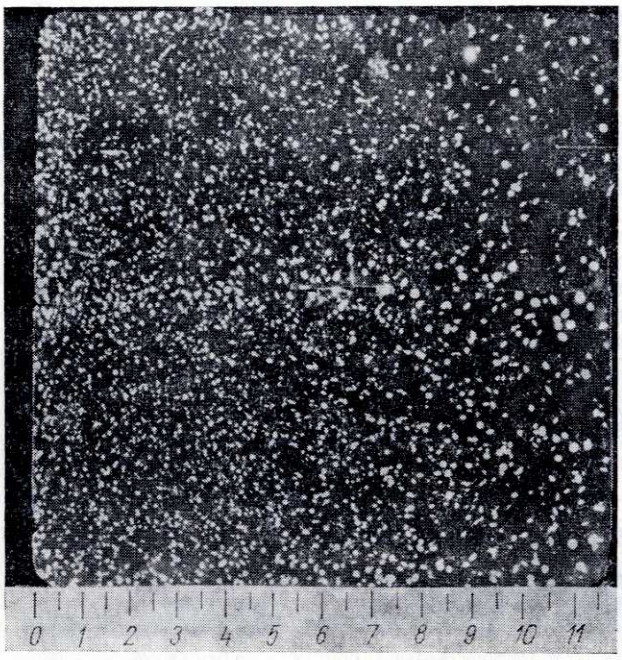
Obr. 5. Agarová destička s koloniemi Sacch. carlsbergensis — pokus 1b



Obr. 6. Agarová destička s koloniemi Sacch. carlsbergensis — pokus 2a

V *tabulce 3* jsou porovnány počty kolonií v proužku vzorku jednotkové šířky v různých vzdálenostech od okraje vzorku zjištěné experimentálně, vypočtené ze zpětně stanovených hodnot $m(x_i)$ v *tab. 1* jako $\Sigma m(x_i)$ i podle (10).

K výpočtu se použilo hodnot z měření 1b: m_o = 56,22 [kol. cm^{-2}], k = 0,0650 [°C mm^{-1}], q = 39,90 °C, p = 1 cm, $\Delta\tau$ = 60 min. Za konstanty β, K



Obr. 7. Agarová destička s koloniemi Sacch. carlsbergensis — pokus 3a

jsme dosadili hodnoty z *tab. 2*, $\beta = 0{,}513\ °C^{-1}$ a $K = 3{,}15 . 10^{-12}\ min^{-1}$, neboť jsme neměli možnost použít výpočetní techniky k jejich přesnějšímu stanovení. K vyhledávání hodnot $E_i(-x)$ se použilo tabulek [3].

Diskuse

Metoda popsaná v tomto článku se odlišuje od dosud používaných metod stanovení tepelné rezistence mikroorganismů. Na suspenzi kvasinek nízké koncentrace v agaru se působilo teplem po relativně dlouhou dobu (1 h) v porovnání s klasickými metodami.

Při zpracování výsledků se předpokládala platnost kinetické rovnice prvého řádu. Podle údajů literatury se úhyn kvasinek tímto vztahem neřídí [4, 5], ačkoliv existují i opačná zjištění [6]. Podle získaných výsledků kinetická rovnice pro úhyn Sacch. carlsbergensis v rozmezí 40—46 °C v podstatě platila. Drobné odchylky pokládáme za experimentální chybu.

U tří nezávislých pokusů se získaly různé hodnoty konstant charakterizující tepelnou rezistenci Sacch. carlsbergensis. Je zajímavé, že opakovaná měření z jedné vodné suspenze Sacch. carlsbergensis (asi po 2 h) poskytly vždy vyšší hodnotu konstanty β, udávající závislost změny tepelné odolnosti na teplotě. Z literatury je známé, že se tepelná rezistence mění se stářím buněk, změny v tak krátkém časovém rozmezí nebyly u kvasinek zaznamenány.

Získané výsledky lze jen obtížně porovnat s literaturou, neboť prací zabývajících se úhynem kvasinek při relativně nízkých teplotách je velmi málo. Podle všeobecných údajů je tepelná odolnost pivovarských kvasinek 0,4 až 1,0 pasteračních jednotek, což odpovídá např. kombinacím 11 až 27 min/50 °C pro „husté" suspenze, tj. asi 10^4—10^6 buněk/ml [4] udává kombinaci 32,5 min/50 °C, (1) 20 min/50 °C a (8) 10 min/53 °C.

Výpočtem ze dvou mezních hodnot konstant měření ($\beta = 0{,}38$, $K = 2{,}16 . 10^{-9}$ a $\beta = 0{,}68$, $K = 9{,}63 . 10^{-16}$) se získají pro snížení počtu kvasinek z 10^5 na 10^0 hodnoty času pro 50 °C 30 a 20,5 min, což vcelku odpovídá uvedeným literárním údajům.

Seznam symbolů

x	délková souřadnice vzorku (délka)
t	teplota (°C)
τ	čas (čas)
$\Delta\tau$	časový interval (čas)
k	konstanta lineární teplotní závislosti $t = kx + g$ (°C délka^{-1})
q	konstanta lineární teplotní závislosti $t = kx + g$ (°C)
a	hrana agarové destičky (délka)
h	tloušťka agarové destičky (délka)
c	objemová koncentrace mikroorganismů (počet . délka^{-3})
m	plošná koncentrace mikroorganismů (počet . délka^{-2})
$m(x)$	plošná koncetrace mikroorganismů v místě x
$\overline{m(x_i)}$	střední plošná koncentrace mikroorganismů v úseku x
i	pořadové číslo dílu agarové destičky
x_i	souřadnice středu agarového dílu i
Δx	šíře dílu agarové destičky
n	počet dílů agarové destičky
m_o	počáteční plošná koncentrace mikroorganismů
$N(x_\alpha, x_\beta)$	počet kolonií v úseku ohraničeném souřadnicemi x_α, x_β o šířce p
N	počet mikroorganismů
K	konstanta teplotní závislosti $K \exp(\beta t)$ (čas^{-1})
β	konstanta teplotní závislosti $K \exp(\beta t)$ (°C^{-1})
A	frekvenční faktor
E	aktivační energie (J mol^{-1})
R	plynová konstanta (8,3143 J K^{-1} mol^{-1})
T	teplota (°K)

Literatura

[1] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. **23**, 1977, č. 6, s. 127.
[2] Catalogue of cultures 2. vyd., Czechoslovak collection of yeasts and yeast-like organismus (brewers yeasts).
[3] JAHNKE - EMDE: Tafeln höherer Funktionen. Leipzig 1952.
[4] ROTH, K.: Das Erfrischungsgetränk **22**, 1969, s. 1079.
[5] PUT, M. C., DE JONG, J., SAND, M. J., VAN GRINSVEN, A. M.: J. appl. Bact. **40**, 1976, s. 135.
[6] CLAVEAU, J., SCRIBAN, R., STROBBEL, B., CARPENTIER, Y.: Intern. Brew. J. **104**, 1968, č. 1236, s. 47.
[7] LUND, A., THYGESEN, P.: EBC Proc. 1957, s. 241.
[8] GILLILAND, R. B.: J. appl. Bact. **18**, 1955, s. 161.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Úhyn Saccharomyces carlsbergensis v lineárním teplotním poli. Kvas. prům. **23,** 1977, č. 12, s. 270—274.

Článek se zabývá tepelným úhynem Sacch. carlsbergensis v lineárním teplotním poli. Kvasinky v čtvercové agarové destičce s počáteční plošnou koncentrací 40 až 120 kvasinek/cm² se vystavily 1 h působení lineárního teplotního pole v rozmezí 40 až 46 °C. Vyhodnocením pokusu se potvrdila platnost kinetické rovnice prvého řádu pro úhyn kvasinek v uvedeném teplotním rozmezí. Pro závislost rychlostní konstanty úhynu na teplotě ve tvaru $k(t) = K e^{\beta t}$ se získaly tyto hodnoty: $\beta = 0{,}38$ — $0{,}68\ °C^{-1}$, $K = 2{,}16 . 10^{-9}$ — $9{,}63 . 10^{-16}\ min^{-1}$. Uvádějí se rovnice pro úhyn mikroorganismů v lineárním teplotním poli.

Шавел, Я. — Прокопова, М.: Отмирание дрожжей Saccharomyces carlsbergensis в линейном температурном поле. Квас. прум. 23, 1977, № 12, стр. 270—274.

Авторы изучали отмирание дрожжей Saccharomyces carlsbergensis под вдиянием линейного температурного поля. Квадратные пластинки из агара с концентрацией от 40 до 120 клеток на 1 см² подвергались один час действию линейного температурного поля от 40 до 46 °С. Оценка результатов подтвердила действительность уравнения первого порядка, показывающего скорость отмирания дрожжей в указанном пределе температур. Были определены следующие значения величин, входящих в уравнение $k(t) = Ke^{\beta t}$ зависимости между скоростью отмирания и температурной: $\beta = 0{,}38 \div 0{,}68\ °C^{-1}$, $K = 2{,}16 . 10^{-9} \div 9{,}63 . 10^{-16}\ мин^{-1}$. Приведены уравнения для расчета скорости отмирания микроорганизмов в линейном температурном поле.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Killing of Saccharomyces carlsbergensis in Linear Temperature Field
Kvas. prům. **23**, 1977, No. 12, pp. 270—274.

The article deals with the atrophy of Saccharomyces carlsbergensis in a linear temperature field. Yeast in a square agar plate with initial concentration of 40 to 120 cells per 1 cm^2 was exposed for 1 hour to a linear temperature field as high as 40—46 °C. The results of experiments confirm the validity of the first-order kinetic equation of yeast death in the mentioned temperature range. For the quantities in the equation $k(t) = Ke^{\beta t}$ expressing the letal rate against temperature the following values have been ascertained: $\beta = 0{,}38$ to $0{,}68\ °C^{-1}$; $K = 2{,}16 \cdot 10^{-9} - 9{,}63 \cdot 10^{-16}\ min^{-1}$. The authors present formulae for calculating the letal rate of microorganisms in linear temperature fields.

Šavel J. - Prokopová M.: Der Lethaleffekt des linearen Wärmefeldes auf Saccharomyces carlsbergensis. Kvas. prům. **23**, 1977, No. 12, S. 270—274.

In dem Artikel wird die Abtötung des Sacch. carlsbergensis in dem linearen Wärmefeld behandelt. Die Hefen in einer Quadrat-Agarplatte mit einer Anfangsflächenkonzentration von 40 bis 120 Hefen/cm^2 wurden 1 Stunde der Einwirkung des linearen Wärmefeldes im Intervall 40 bis 46 °C ausgesetzt. Die Auswertung der Versuche bestätigte die Gültigkeit der kinetischen Gleichung der ersten Ordnung für das Absterben der Hefen in dem angeführten Temperaturintervall. Für die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante des Absterbens von der Temperatur in der Form $k(t) = Ke^{\beta t}$ wurden die folgenden Werte ermittelt: $\beta = 0{,}38$ bis $0{,}68\ °C^{-1}$, $K = 2{,}16 \cdot 10^{-9} - 9{,}63 \cdot 10^{-16}\ min^{-1}$. Es werden die Gleichungen für das Absterben der Mikroorganismen in dem linearen Wärmefeld angeführt.