

Kvantitatívna analýza vplyvu substrátu a teploty na rast kvasinky *Candida maltosa* YP1

DENISA LAUKOVÁ - LUBOMÍR VALÍK

SÚHRN. V práci je opísaná dynamika rastu oxidatívnej kvasinky *Candida maltosa* Komagata, Nakase et Katsuya v glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom, v trvanlivom mlieku (obsah tuku 1,5 %), v trvanlivej smotane (obsah tuku 30 %) a modelovej emulzii typu olej vo vode s obsahom tukovej fázy 60 % (w/w) v závislosti od teploty uchovávaní. Rast testovaného kmeňa kvasinky sa pozoroval aj pri teplote $6 \pm 0,5$ °C vo všetkých použitých substrátoch. So zvyšujúcou sa teplotou uchovávaní substrátov sa rastová rýchlosť kvasinky zvyšovala a trvanie lag-fázy *C. maltosa* YP1 sa skracovalo. Maximálna rastová rýchlosť kmeňa *Candida maltosa* YP1 $\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$, ekvivalentne minimálny generačný čas 47 min a minimálne trvanie lag-fázy $\lambda = 2,9 \text{ h}$ sa zaznamenali v glukózovom roztoku uchovávanom pri teplote 37 a 25 °C ($\pm 0,5$ °C). Zvyšovanie rastovej rýchlosti kvasinky *C. maltosa* YP1 so zvyšovaním teploty uchovávaní bolo možné v emulzných substrátoch opísať Ratkowského tzv. odmocninovým modelom a v glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom polynómom druhého poriadku. Skracovanie prirodzeného logaritmu dĺžky lag-fázy ($\ln \lambda$) *C. maltosa* YP1 v závislosti od stúpajúcej teploty sa následne charakterizoval lineárnymi korelačnými vzťahmi ($R_m^2 = 0,9499$; $R_s^2 = 0,9479$; $R_e^2 = 0,936$). Na základe týchto závislostí sa v práci prezentujú predpovede, kedy *C. maltosa* YP1 reprezentujúca kvasinkové kontaminanty v potravinách dosiahne počty $1 \cdot 10^6 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Candida maltosa*; matematické modelovanie rastu; prediktívna mikrobiológia

Mikrobiálne kazenie mlieka a mliečnych produktov je v prevažnej miere spájané s kontamináciou týchto produktov baktériami. Avšak vzhľadom na schopnosť kvasiniek rásť za podmienok nevyhovujúcich mnohým bakteriálnym druhom, môžu aj tieto zohrávať významnú úlohu v znehodnotení pasterizovaných mliečnych produktov, fermentovaných mliek, jogurtov a syrov [1-5]. Mnohé z nich sú schopné rásť pri teplotách chladenia (4–8 °C), fermentovať alebo asimilovať kyselinu mliečnu. Tolerujú i nízke hodnoty pH

Ing. Denisa LAUKOVÁ, Výskumný ústav potravinársky, Štefánikova 45, 900 01 Modra.
Doc. Ing. Lubomír VALÍK, PhD., Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.
Korešpondujúci autor: Doc. Ing. Lubomír VALÍK, PhD., e-mail: lubomir.valik@stuba.sk

v prostredí od 4,0 do 3,0. Vďaka týmto vlastnostiam, ako aj ich lipolytickej a proteolytickej aktivite, sa mnoho kvasiniek a kvasinkovitých organizmov podieľa na kazení mliečnych produktov [1, 6-8] sprevádzanom zmenami textúry, konzistencie, kvasničnou, ovocnou alebo horkou chuťou a nepríjemným zápachom [2, 9].

Candida maltosa patrí do taxonomickej skupiny anamorfných foriem askogénnych kvasiniek [10]. Bola izolovaná v Japonsku z prevádzky pri výrobe glutamátu sodného, keď sa hľadali kvasinky využívajúce uhľovodíky. Ako nový druh ju opísali v roku 1964 spolu s iným druhom *Candida cloacae*, ktorý sa v súčasnosti považuje za synonymum *C. maltosa* [11].

Kmeň *C. maltosa* je schopný využívať *n*-alkány ako zdroj uhlíka a energie, predovšetkým s počtom uhlíkov 10 a 14 [12]. Dobre známa je jej chemorezistencia. Látky typu chlórrezorcinol alebo 4-(1-nonyl)fenol využíva dokonca ako rastové substráty [13, 14]. Vyказuje rezistenciu voči antibiotiku cykloheximidu [15, 16], do značnej miery odolnosť voči zvýšeným teplotám [17] a tvorí mycocíny (ang. killer toxins), ktoré usmrcujú iné kvasinky a kvasinkovité organizmy [18]. KITAMURA a kol. opísali v roku 1990 chronické mastitídy kráv spôsobené premnožením *C. maltosa* [19].

Významnou vlastnosťou *C. maltosa* je jej schopnosť aktívne sa podieľať na tvorbe biofilmov na plochách technologických zariadení vďaka hydrofóbnej povahe vegetatívnych buniek [20, 21].

Cieľom práce bolo zistiť vplyv nutritívneho potenciálu glukózového bujónu, mlieka, smotany s obsahom tuku 33 % a emulzného systému s obsahom tuku 60 % na rast kvasinky *Candida maltosa* YP1. Zistenie, či nutritívny potenciál zvolených potravín má vplyv na rast mikroorganizmov môže poskytnúť odpoveď, do akej miery je možné zovšeobecňovať predikcie rastu mikroorganizmov vyslovené napríklad na základe experimentov vykonaných s podobnými alebo rôznymi substrátmi.

Materiál a metódy

Mikroorganizmus

Kmeň *C. maltosa* YP1 sa izoloval z povrchu znehodnoteného ovocného jogurtového krému. Jeho identifikáciu potvrdilo pracovisko Zbierky kvasinkových kultúr Chemického ústavu SAV v Bratislave. Morfológické a biochemické vlastnosti *C. maltosa* YP1 sú uvedené v prácach LAUKOVÁ a kol. [22, 23].

Príprava suspenzie a inokulácia

Kmeň *C. maltosa* YP1 sa v laboratóriu uchovával na agare s glukózou, tryptónom a kvasničným extraktom (GTK agar, Imuna, Šarišské Michaľany, SR) pri teplote 5 ± 1 °C. Na prípravu suspenzie vegetatívnych buniek *C. maltosa* YP1 sa použil sterilný fyziologický roztok [22, 23]. Suspenzie vyšetrovanej kvasinky používané na inokuláciu roztokov s glukózou (Mikrochem, Pezinok, SR) a kvasničným autolyzátom (Fluka, Buchs, Švajčiarsko), UHT mlieka (Rajo a. s.), UHT smotany (Rajo a. s.) a modelovej emulzie typu olej vo vode sa pripravili podľa prác LAUKOVÁ a kol. [22, 23].

Substráty sa inokulovali suspenziou vegetatívnych buniek *C. maltosa* YP1 tak, aby sa štandardne dosiahla počiatočná denzita buniek $\leq 10^3$ KTJ.ml⁻¹, resp. 10^3 KTJ.g⁻¹.

Príprava modelovej emulzie typu olej vo vode s obsahom tuku 60 % (w/w)

Modelová emulzia typu olej vo vode s obsahom tuku 60 % sa pripravovala v poloprevádzkovom zariadení Stephan UM 5 (Karlsruhe, Nemecko) na Ústave technológie mlieka a tuků VŠCHT v Prahe. Do sterilnej Erlenmeyerovej banky sa za aseptických podmienok navážili sušené vaječné žĺtka (4 % w/w). K sušeným žĺtkom sa asepticky pridal sterilný glukózový roztok, celá zmes sa dôkladne premiešala a následne zahriala v emulgačnej nádobe zariadenia na teplotu 65 °C s výdržou 1 min [24]. Po teplotnom ošetrení sa vodná fáza následne schladila na teplotu 45 ± 2 °C. Teplota pasterizácie a chladenia sa udržiavala termostatom Haake C1 (Karlsruhe, Nemecko).

K teplotne ošetrenej vodnej fáze sa pod vákuom postupne dávkoval dezodorizovaný slnečnicový olej v množstve 60 % w/w (Setuza, Ústí nad Labem, ČR) navážený za aseptických podmienok do sterilnej Erlenmeyerovej banky a temperovaný v termostate na 45 až 50 °C. Zmes sa emulgovala v zariadení Stephan UM 5 miešadlom pri 3000 ot.min⁻¹ 12 až 13 minút pri teplote 45 až 47 °C za vákua. Pripravená emulzia sa následne schladila na teplotu 25 až 27 °C za neustáleho miešania (1500 ot.min⁻¹) a zároveň sa steny emulgačnej nádoby stierali, aby sa zabránilo nerovnomernému rozloženiu teploty.

Stanovenie celkového počtu C. maltosa YP1 v substrátoch

Celkové počty *C. maltosa* YP1 sa v paralelných rastových substrátoch stanovovali zriedovacou kultivačnou metódou podľa STN ISO 7954 ako kvasinky [25].

Matematické hodnotenie dynamiky rastu C. maltosa YP1

Obsah *C. maltosa* YP1 v modelových substrátoch inkubovaných pri teplotách 6; 8; 12; 16 (17); 25; 37 a 45 °C ($\pm 0,5$ °C) bol v závislosti od času inku-

bácie matematicky spracovaný podľa Baranyiho modelu [26]. Rastové rýchlosti *C. maltosa* YP1 získané z rastových čiar pre jednotlivé skladovacie teploty a typy substrátu sa podrobili matematickej analýze. Doplnkovo sa na základe experimentálnych výsledkov a neskôr prezentovaných závislostí vypočítali predpovede časov, po ktorých by *C. maltosa* YP1 dosiahla pri jednotlivých teplotách uchovávania v testovaných substrátoch denzitu 1.10^6 KTJ.ml⁻¹. Získané predpovede, ako aj rastové rýchlosti kvasinky, sa podrobili validácii podľa BARANYIHO a kol. [27].

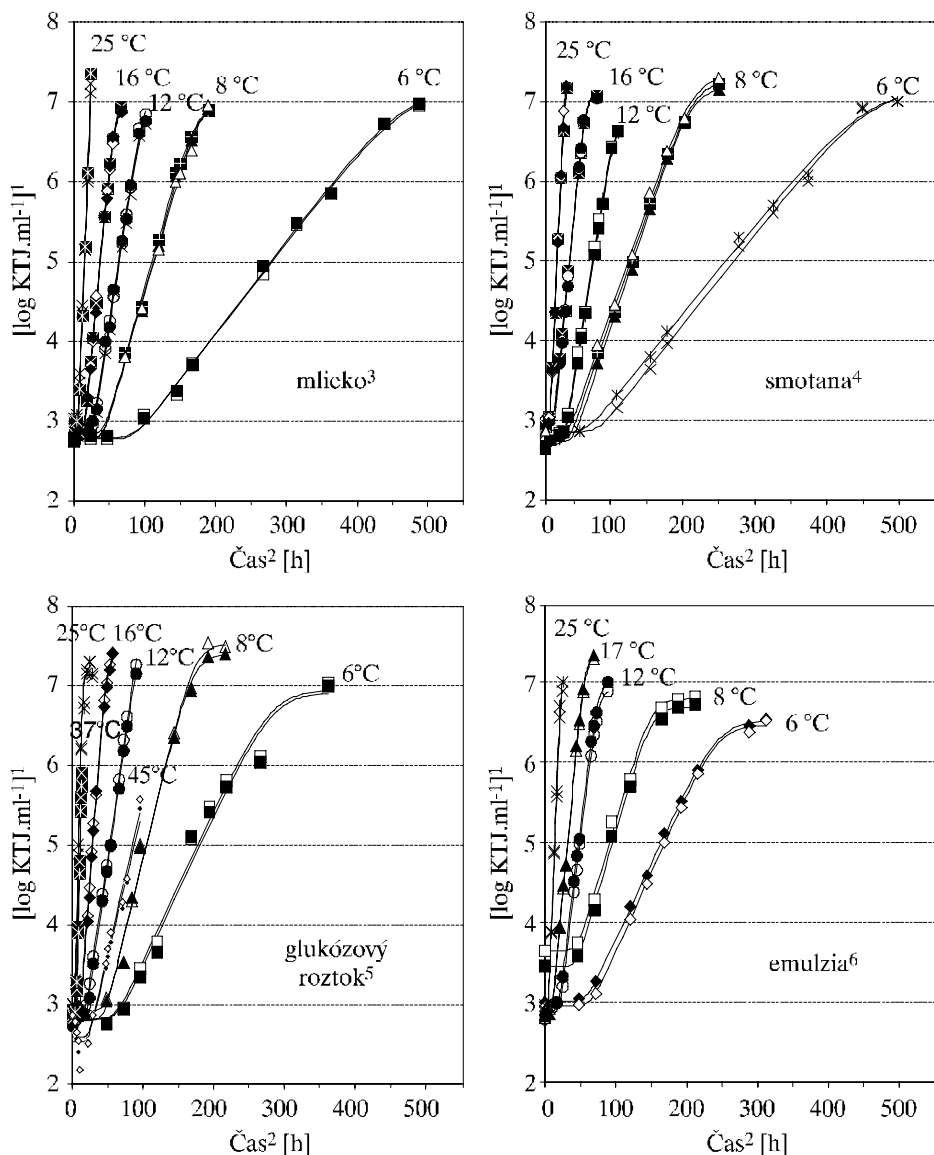
Výsledky a diskusia

Analýza rastu C. maltosa YP1 v zámerne inokulovaných substrátoch v závislosti od teploty ich uchovávania

Ako modelové prostredie pre rast a rozmnožovanie kultúry *C. maltosa* YP1 sa zvolilo UHT mlieko, UHT smotana, emulzia typu olej vo vode s obsahom tuku 60 % (w/w) a glukózový roztok s kvasničným autolýzátom, ktoré sa uchovávali v termostate pri teplotách 6; 8; 12; 16 (17); 25; 37 a 45 °C ($\pm 0,5$ °C).

Grafické znázornenie rastových čiar *C. maltosa* YP1 (obr. 1) v jednotlivých rastových substrátoch a rovnako aj výsledky rastových parametrov zosumarizované v tab. 1 a 2 poukazujú na skutočnosť, že rastová rýchlosť kvasinky sa so zvyšujúcou sa teplotou uchovávania zvyšovala a trvanie lag-fázy sa analogicky skracovalo.

Maximálna dĺžka lag-fázy *C. maltosa* YP1 v bujóne bola prirodzene pozorovaná pri najnižšej teplote uchovávania (6 °C) a to v priemere 62,5 h a postupným zvyšovaním teploty sa skracovala na 3,0 až 2,7 h alebo na 5,3 až 5,0 h pri teplote 25 °C alebo 37 °C. Pri vyššej teplote 45 °C sa lag-fáza už predĺžila na 21,9 až 23,0 h. Tieto hodnoty naznačili, že optimálna teplota rastu vyšetrovanej kvasinky by sa mala pohybovať medzi 25 až 37 °C. Táto skutočnosť sa potvrdila tiež z pohľadu rastovej rýchlosti, nakoľko hodnoty rastovej rýchlosti boli najvyššie pri teplotách 25 °C a 37 °C. Rastové rýchlosti *C. maltosa* YP1 boli síce vyššie pri 37 °C ako pri 25 °C, ale v súlade s chybami kultivačnej metódy, ktorej výsledky sa použili na zostrojenie rastovej čiary, je to zanedbateľné. Z ďalších pokusov vykonaných pri vyššej teplote je vidieť, že kvasinka dokázala rásť aj pri 45 °C, ale jej lag-fáza sa predĺžila približne 4-krát a rastová rýchlosť sa znížila na 1/10 z rastovej rýchlosti zistenej pri 37 °C. Z výsledkov zosumarizovaných v tabulke 1 a 2 je tiež zreteľne vidieť, že *C. maltosa* YP1 tolerovala nižšie teploty lepšie ako teploty vyššie



OBR. 1. Rastové čiary *C. maltosa* YP1 v UHT mlieku, UHT smotane, glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom a v modelovej emulzii v závislosti od teploty uchovávaní.

FIG. 1. Growth curves of *C. maltosa* YP1 in ultra-pasteurized milk, ultra-pasteurized cream, glucose solution with yeast extract and in a model emulsion in relation to the storage temperature.

1 - $[\log CFU.ml^{-1}]$, 2 - time, 3 - milk, 4 - cream, 5 - glucose solution, 6 - emulsion.

TAB. 1. Rastové parametre *C. maltosa* v UHT mlieku, UHT smotane, modelovej emulzii a v glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom v závislosti od teploty uchovávaní.TAB. 1. Growth parameters of *C. maltosa* in UHT milk, UHT cream, model emulsion and in the glucose solution with yeast extract in relation to the storage temperature.

Teplota ¹ [°C]	Trvanie lag-fázy ² [h]			
	v mlieku ³	v smotane ⁴	v emulzii ⁵	v glukóz. roztoku ⁶
6	86,4 ⁺	64,8	62,2	62,5
8	41,4	34,5	44,9	45,9
12	26,0	26,5	19,8	17,8
16 (17)*	14,0	11,9	9,8	10,9
25	6,2	5,8	4,9	3,0
37	–	–	–	5,16
45	–	–	–	22,4

* - teplota uchovávaní inokulovanej emulzie, + - priemerné hodnoty z 2 alebo 3 paralelných meraní.

* - storage temperature of the inoculated emulsion, + - average values from 2 or 3 parallel measurements. 1 - temperature 2 - lag-phase duration, 3 - in milk, 4 - in cream, 5 - in emulsion, 6 - in glucose solution.

TAB. 2. Rastové parametre *C. maltosa* v UHT mlieku, UHT smotane, modelovej emulzii a v glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom v závislosti od teploty uchovávaní.TAB. 2. Growth parameters of *C. maltosa* in UHT milk, UHT cream, model emulsion and in the glucose solution with yeast extract in relation to the storage temperature.

Teplota ¹ [°C]	Rastová rýchlosť ² [h ⁻¹]			
	v mlieku ³	v smotane ⁴	v emulzii ⁵	v glukóz. roztoku ⁶
6	0,0115 ⁺	0,0113	0,0195	0,019
8	0,0315	0,0267	0,030	0,037
12	0,058	0,0577	0,0735	0,0625
16 (17)*	0,094	0,0951	0,096	0,12
25	0,23	0,205	0,235	0,36
37	–	–	–	0,38
45	–	–	–	0,0385

Teplota [°C]	Generačný čas ⁷ [h]			
	v mlieku	v smotane	v emulzii	v glukóz. roztoku
6	26,1	26,8	15,6	16,1
8	9,6	11,3	10,0	8,2
12	5,2	5,2	4,1	4,8
16 (17)*	3,2	3,2	3,1	2,5
25	1,3	1,5	1,3	0,8
37	–	–	–	0,79
45	–	–	–	7,8

* - teplota uchovávaní inokulovanej emulzie, + - priemerné hodnoty z 2 alebo 3 paralelných meraní.

* - storage temperature of the inoculated emulsion, + - average values from 2 or 3 parallel measurements. 1 - temperature, 2 - growth rate, 3 - in milk, 4 - in cream, 5 - in emulsion, 6 - in glucose solution, 7 - generation time.

vzhľadom na jej optimálnu teplotu pre rast. Tento poznatok má všeobecnú platnosť a s najväčšou pravdepodobnosťou súvisí s ireverzibilnou denaturáciou proteínov a tepelnou deštrukciou plazmatickej membrány vegetatívnych buniek pri teplotách vyšších, ako sú optimálne teploty rastu [28].

Pozoruhodné však bolo, že sledovaný kmeň kvasinky vykazoval rast aj pri 6 °C. Na základe tejto skutočnosti je možné považovať vyšetrovaný kmeň za psychrotrofný, aj napriek tomu, že jeho lag-fáza pri 6 °C trvala viac ako 2,5 d. Pri ďalšej chladiarensky významnej teplote 8 °C, ktorá by sa v praxi nemala prekročiť, napríklad pri transporte čerstvých potravín, sa však lag-fáza kvasinky *C. maltosa* YP1 skrátila približne o štvrtinu oproti jej lag-fáze pri 6 °C a rastová rýchlosť sa zvýšila až dvojnásobne.

Z experimentov znázornených na obr. 1 vidieť, že dynamika rastu *C. maltosa* YP1 bola vo všetkých vzorkách UHT mlieka a smotany uchovávaných pri príslušných teplotách veľmi podobná. Rastové čiary v UHT mlieku a v smotane vykazovali tiež obdobné zmeny vyvolané zvýšením teploty inkubácie. Pri najnižšej teplote uchovávania (6 °C) lag-fáza *C. maltosa* YP1 v UHT mlieku trvala priemerne 86,4 h a v UHT smotane 64,9 h. Zvýšením teploty o 2 °C došlo, napríklad, v mlieku ku skráteniu lag-fázy na 48 % a v smotane na 53 % z lag-fázy zistenej pri 6 °C.

Ďalšie zvýšenie teploty uchovávania UHT mliek a smotán na 12, 16 a 25 °C spôsobilo skrátenie trvania lag-fázy *C. maltosa* YP1 na 30, 16 a 7 % (UHT mlieko), resp. na 40, 18 a 9 % v prípade UHT smotán.

So zvyšovaním teploty dochádzalo aj k zvyšovaniu rastovej rýchlosti *C. maltosa* YP1 (obr. 1 a tab. 2). Najnižšia rastová rýchlosť *C. maltosa* YP1 v trvanlivej smotane sa pozorovala pri teplote $6 \pm 0,5$ °C, $\mu = 0,011 \text{ h}^{-1}$ (vo vzorke S₁ $\mu = 0,0111 \text{ h}^{-1}$; GT = 27,1 h a vo vzorke S₂ $\mu = 0,0114 \text{ h}^{-1}$; GT = 26,4 h). Postupným zvyšovaním teploty sa rast *C. maltosa* YP1 zintenzívnili o 57,9 % pri $8 \pm 0,5$ °C, 80,5 % pri $12 \pm 0,5$ °C a 90,5 % pri $16 \pm 0,5$ °C.

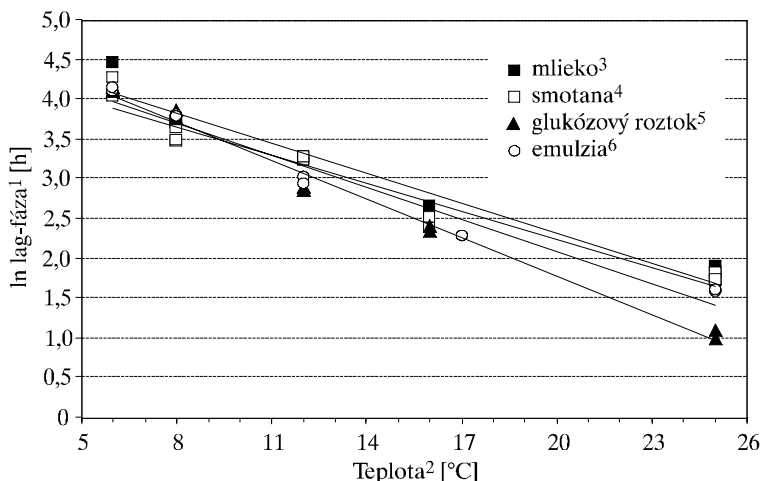
Podobne ako v modelovom glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom, UHT mlieku a UHT smotane, i v emulziách najdlhšie trvanie lag-fázy (58,6 h a 65,7 h), najdlhší generačný čas (15,8 h, resp. 15,0 h) a najnižšia rastová rýchlosť ($0,020 \text{ h}^{-1}$, resp. $0,019 \text{ h}^{-1}$) sa zaznamenala pri teplote $6 \pm 0,5$ °C ($R^2 = 0,981$ až $0,999$). Postupným zvyšovaním teploty zo $6 \pm 0,5$ °C na $25 \pm 0,5$ °C dochádzalo ku skracovaniu lag-fázy, ako aj k zintenzívneniu rastu kultúry kvasiniek *C. maltosa* YP1 počas exponenciálnej fázy, čo je možné pozorovať v podobe zvyšujúcej sa strmosti rastovej čiary v oblasti jej exponenciálnej fázy (obr. 1). Zvýšením teploty inkubácie na $8 \pm 0,5$ °C, čo je teplota uchovávania majonéz a tatárskych omáčok odporúčaná väčšinou výrobcov, sa rastová rýchlosť kvasinky zvýšila o 35 % na hodnotu $0,03 \text{ h}^{-1}$, pričom generačný čas bol 10 h.

Vplyv teploty a typu substrátu na lag-fázu *C. maltosa* YP1

Závislosť trvania lag-fázy *C. maltosa* YP1 v trvanlivom mlieku, trvanlivej smotane a modelovej emulzii o/v s obsahom tuku 60 % od teploty uchovávanania (obr. 2) analyzovaná v druhej fáze matematického modelovania bola lineárna a vysoko významná: $R_{\lambda m}^2 = 0,9499$; $R_{\lambda s}^2 = 0,9479$; $R_{\lambda e}^2 = 0,9360$. Rovnice popisujúce horeuvedenú závislosť lag-fázy od teploty a typu substrátu sú uvedené v tab. 3.

Ako vidieť z obr. 2 a tab. 3, vplyv substrátu na trvanie lag-fázy *C. maltosa* YP1 bol minimálny.

Následne sa porovnávala dĺžka lag-fázy kvasinky *C. maltosa* YP1, ktorá sa pozorovala počas uchovávanania zámerne inokulovaných substrátov, s lag-fázou zaznamenanou v glukózových roztokoch s kvasničným autolyzátom pri teplotách 6 až 25 °C. Najkratšie trvanie lag-fázy *C. maltosa* YP1 sa pozorovalo v glukózových roztokoch s kvasničným autolyzátom, pričom so stúpajúcou teplotou sa rozdiely v dĺžke lag-fázy *C. maltosa* YP1 zvyšovali. Závislosť trvania lag-fázy od teploty má strmší priebeh v modelovom nutričnom médiu ako v trvanlivých mliečnych produktoch a emulziách, z čoho vyplýva, že stúpajúca teplota mala na skracovanie lag-fázy v médiu výraznejší vplyv.



OBR. 2. Závislosť lag-fázy rastu *C. maltosa* YP1 ($\ln \lambda$) inokulovanej do trvanlivého mlieka, trvanlivej smotany, modelovej emulzie so zvýšeným obsahom tuku a glukózového roztoku s kvasničným autolyzátom od teploty uchovávanania.

FIG. 2. Dependence of lag-phase duration of *C. maltosa* YP1 ($\ln \lambda$) inoculated into ultra-pasteurized milk, ultra-pasteurized cream, model emulsion and glucose solution with yeast extract on the storage temperature.

1 - \ln lag-phase duration, 2 - temperature, 3 - milk, 4 - cream, 5 - emulsion, 6 - glucose solutions.

TAB. 3. Matematické rovnice pre závislosť prirodzeného logaritmu trvania lag-fázy *C. maltosa* YP1 od teploty v UHT mlieku, UHT smotane, modelovej emulzii o/v a v glukózovom roztoku s kvasničným autolyzátom.

TAB. 3. Mathematical equations for the dependence of lag-phase duration of *C. maltosa* YP1 on temperature in UHT milk, UHT cream, model emulsion o/w and in the glucose solution with yeast extract.

Substrát ¹	Závislosť $\ln \lambda$ od teploty uchovávaní pre jednotlivé prostredia ²	R ²
UHT mlieko ³	$\ln \lambda = -0,1263T + 4,8525$	0,9499
UHT smotana ⁴	$\ln \lambda = -0,119T + 4,6204$	0,9479
emulzia ⁵ o/v	$\ln \lambda = -0,1258T + 4,5866$	0,9360
glukózový roztok ⁶	$\ln \lambda = 0,0064T^2 - 0,36T + 6,2369$	0,9787

T - teplota uchovávaní, R - korelačný koeficient.

T - storage temperature, R - coefficient of correlation. 1 - substrate, 2 - dependance of $\ln \lambda$ on storage temperature, 3 - UHT milk, 4 - UHT cream, 5 - emulsion, 6 - glucose solution.

Rozdiely pozorované v dynamike rastu *C. maltosa* YP1 v UHT mlieku, UHT smotane a živnom médiu môžu súvisieť so zastúpením laktózy v prostredí, ktorú kvasinka *C. maltosa* YP1 nedokáže fermentatívne ani oxidatívne metabolizovať, ako aj so štruktúrou použitých modelových prostredí. Najdlhšie trvanie lag-fázy *C. maltosa* YP1 sa stanovilo v mlieku, v ktorom sa obsah laktózy zväčša pohybuje od 4,2 do 5,0 % [29]. V smotane s 30 % tuku je zastúpenie laktózy približne 3 % [30]. V tomto živnom prostredí, v ktorom sa zistilo najkratšie trvanie lag-fázy pri jednotlivých teplotách uchovávaní, ako aj najvyššie rastové rýchlosti, laktóza nebola prítomná. Rozdiely v trvaní fázy prispôsobenia sa kvasinkovej kultúry novým podmienkam v glukózovom roztoku s kvasničným autolyzátom a v emulziách mohli byť čiastočne zapríčinené zvýšeným obsahom tuku, teda odlišnou mikroštruktúrou oboch použitých živných substrátov, čo BROCKLEHURST a WILSON a WILSON a kol. demonštrovali na príklade majonéz [31, 32].

Vplyv teploty a typu substrátu na rastovú rýchlosť C. maltosa YP1

So zvyšovaním teploty dochádzalo aj k zvyšovaniu rastovej rýchlosti *C. maltosa* YP1 v UHT mlieku, UHT smotane a modelovej emulzii so zvýšeným obsahom tuku, čo bolo možné popísať lineárnymi rovnicami sumarizovanými v tab. 4.

Podobne ako v prípade lag-fázy, aj závislosť druhej odmocniny rastovej rýchlosti od teploty uchovávaní (obr. 3) bola vo všetkých troch analyzovaných substrátoch štatisticky veľmi významná ($R_{\mu m}^2 = 0,9914$; $R_{\mu s}^2 = 0,9924$; $R_{\mu e}^2 = 0,9828$).

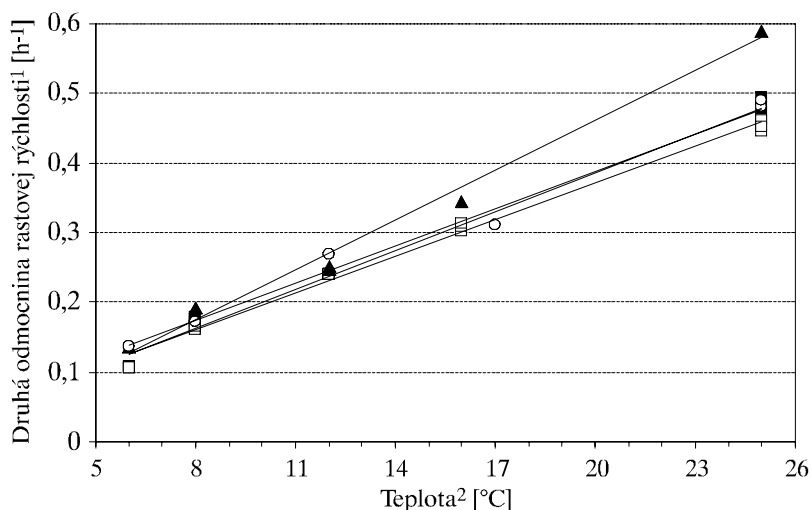
TAB. 4. Matematické rovnice pre závislosť rastovej rýchlosti *C. maltosa* YP1 od teploty v UHT mlieku, UHT smotane, modelovej emulzii o/v a glukózovom roztoku s kvasničným autolyzátom.

TAB. 4. Mathematical equations for the dependence of growth rate of *C. maltosa* YP1 on temperature in UHT milk, UHT cream, model emulsion o/w and glucose solution with yeast extract.

Substrát ¹	Závislosť $\sqrt{\mu}$ od teploty uchovávania pre jednotlivé prostredia ²	R ²
UHT mlieko ³	$\sqrt{\mu} = 0,0186T + 0,0139$	0,9914
UHT smotana ⁴	$\sqrt{\mu} = 0,0176T + 0,0193$	0,9924
emulzia ⁵ o/v	$\sqrt{\mu} = 0,0178T + 0,0335$	0,9828
glukózový roztok ⁶	$\ln \mu = -0,0067T^2 + 0,3731T - 6,0803$	0,9276

T - teplota uchovávania, R - korelačný koeficient.

T - storage temperature, R - coefficient of correlation. 1 - substrate, 2 - dependence of $\sqrt{\mu}$ on storage temperature for individual environments, 3 - UHT milk, 4 - UHT cream, 5 - emulsion, 6 - glucose solution.



OBR. 3. Závislosť rastovej rýchlosti *C. maltosa* YP1 ($\sqrt{\mu}$) zámerne inokulovanej do trvanlivého mlieka, trvanlivej smotany, modelovej emulzie so zvýšeným obsahom tuku a glukózového roztoku s kvasničným autolyzátom od teploty uchovávania.

Fig. 3. Dependence of the growth rate of *C. maltosa* YP1 ($\sqrt{\mu}$) intentionally inoculated into ultra-pasteurized milk, ultra-pasteurized cream, model emulsion with an increased fat content and glucose solution with yeast extract on storage temperature.

1 - square root of growth rate, 2 - temperature, 3 - milk, 4 - cream, 5 - emulsion, 6 - glucose solution.

Dynamika rastu čistej kultúry kvasiniek v exponenciálnej fáze rastu bola najvyššia v modelovom glukózovom roztoku v porovnaní s intenzitou rastu *C. maltosa* YP1 stanovenou v trvanlivom mlieku a smotane a modelových emulziách, pričom podobne ako pri lag-fáze, i v prípade rastovej rýchlosti sa rozdiely v dynamike rastu *C. maltosa* YP1 v mliečnych substrátoch, emulziách a glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom zväčšovali so stúpajúcou teplotou. Závislosť rastovej rýchlosti od teploty má strmší priebeh v glukózovom roztoku ako v smotane, mlieku i emulziách v modelovom nutričnom médiu ako v emulziách typu olej vo vode so zníženým a zvýšeným obsahom tuku. Rozdiely medzi rastovými rýchlosťami kvasinky pri všetkých analyzovaných teplotách boli v jednotlivých substrátoch minimálne a z hľadiska použitých metód štatisticky nevýznamné. Túto skutočnosť tiež potvrdzujú prakticky rovnaké hodnoty smernice týchto závislostí (tab. 4).

Mlieko aj smotana sú považované za emulzie typu olej vo vode so zníženým obsahom tuku. Vodná fáza emulzií je osídlená mikroorganizmami a práve jej tzv. „mikro-architektúra“ ovplyvňuje rast mikrobiálnej populácie [33]. V mnohých štúdiách bolo zistené, že dynamika rastu mikroorganizmov v živných médiach bola totožná s dynamikou rastu stanovenou v reálnych požívatinách. Avšak existujú aj prípady, keď dynamika rastu mikrobiálnej populácie v emulzných systémoch bola pomalšia v porovnaní s modelovými živnými pôdami pozostávajúcimi z jednej fázy, a to vodnej [32].

Horeuvedené lineárne vzťahy bolo možné využiť pre výpočet času, pri ktorom by *C. maltosa* YP1, ak by sa v príslušných požívatinách nachádzala v počiatočnej koncentrácii 1 KTJ.ml^{-1} , dosiahla počet $1.10^6 \text{ KTJ.ml}^{-1}$. Výsledky takto postavenej predikcie sú sumarizované v tab. 5.

TAB. 5. Predpovede časov [d], kedy by *C. maltosa* YP1 dosiahla počet $1.10^6 \text{ KTJ.ml}^{-1}$ v UHT mlieku, UHT smotane a modelovej emulzii v závislosti od teploty uchovávania.
TAB. 5. Prediction of time [d] for *C. maltosa* YP1 to reach $1.10^6 \text{ CFU.ml}^{-1}$ in UHT milk, UHT cream and model emulsion in relation to the storage temperature.

Teplota ¹ [°C]	Čas potrebný pre dosiahnutie $1.10^6 \text{ KTJ.ml}^{-1}$ [d] ²		
	v mlieku ³	v smotane ⁴	v emulzii ⁵
6	18,4	18,1	14,6
8	11,4	11,4	9,6
12	5,6	5,7	5,0
16 (17)*	3,3	3,4	2,7
25	1,3	1,4	1,3

Počiatočná koncentrácia *C. maltosa* YP1 $N_0 = 1 \text{ KTJ.ml}^{-1}$. * - teplota uchovávania inokulovanej emulzie.
Initial density of *C. maltosa* YP1 $N_0 = 1 \text{ CFU.ml}^{-1}$. * - storage temperature of the inoculated emulsion.
1 - temperature, 2 - time to reach $1.10^6 \text{ CFU.ml}^{-1}$ [d].

Validácia predikcie rastu C. maltosa YP1

Vypočítané predikcie času, ako aj rastové rýchlosti kvasinky, sa podrobili validácii podľa Baranyiho, Pinovej a Rossa [27]. Z validačných faktorov sa vybral tzv. faktor presnosti (angl. accuracy factor) a z neho odvodený faktor nezhody vyjadrený v percentách (ang. discrepancy) [27]. Pri ich výpočte sa použili nasledovné vzťahy:

$$A_f = \exp \left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^k) - \ln \mu^k)}{n}} \right)$$

$$\% D_f = (A_f - 1) \cdot 100$$

v ktorých μ je rastová rýchlosť z rastovej krivky, $f(x^k)$ je μ z funkcie, ktorou sa popisujú experimentálne získané hodnoty, n - počet meraní a $\% D_f$ - diskrépancia (nesúlad s predikciou).

Validácia kvantitatívnej analýzy rastu *C. maltosa* YP1, ako aj uvedených predpovedí, bola urobená na základe porovnania rozdielov medzi rastovými rýchlosťami vypočítanými z rastových čiar a rastovými rýchlosťami vyplývajúcimi zo závislosti znázornenej na obr. 3. Ako je vidieť z tab. 6, nepresnosť medzi rastovými rýchlosťami vypočítanými z lineárnych vzťahov prezentovaných v tab. 4 a hodnotami experimentálnymi sa pohybovala v jednotlivých analyzovaných substrátoch od 11,9 % (modelová emulzia) do 15,6 % (UHT mlieko). Nezhody medzi predpoveďami času potrebného pre dosiah-

TAB. 6. Parametre validácie pre závislosť rastovej rýchlosti *C. maltosa* YP1 inokulovanej do UHT mlieka, UHT smotany a emulzie od teploty uchovávaní.

TAB. 6. Validation parameters for the dependence of the growth rate of *C. maltosa* YP1 inoculated in UHT milk, UHT cream and in an emulsion on the storage temperature.

Faktor ¹	Indexy validácie rastovej rýchlosti <i>C. maltosa</i> YP1 ²		
	v mlieku ³	v smotane ⁴	v emulzii ⁵
A_f	1,16	1,11	1,12
$\% D_f$	15,6	10,9	11,8

A_f - faktor presnosti, $\% D_f$ - faktor nezhody v %.

A_f - accuracy factor, $\% D_f$ - percent of discrepancy. 1 - factor, 2 - validation indices for the growth rate of *C. maltosa* YP1, 3 - in milk, 4 - in cream, 5 - in an emulsion.

nutie denzity *C. maltosa* YP1 1.10^6 KTJ.ml⁻¹ vypočítanými pomocou experimentálnych a predikovaných rastových parametrov sa vo vyšetrovaných substrátoch pohybovali v intervale medzi 4,5 % (glukózový roztok) a 17,1 % (UHT mlieko). Všetky vypočítané údaje sú v súlade s opakovateľnosťou mikrobiologických zriedovacích metód, ktorá môže byť ± 12 až 37 %, pričom reprodukovateľnosť v praxi býva ešte aj vyššia [34].

Záver

V práci sa matematicky analyzoval rast oxidatívnej kvasinky *C. maltosa* YP1 v glukózovom roztoku s kvasničným autolýzátom, trvanlivom mlieku, v trvanlivej smotane a v modelovej emulzii so zvýšeným obsahom tuku v závislosti od teploty uchovávaní. Rozdiely medzi hodnotami rastových rýchlostí kvasinky v oboch mliečnych produktoch a modelovej emulzii neboli významné pri všetkých aplikovaných teplotách. Významnejšie rozdiely boli pozorované medzi intenzitou metabolizmu *C. maltosa* YP1 v reálnych potravinárskych produktoch a modelovom glukózovom roztoku, predovšetkým pri optimálnej teplote rastu. Podobne aj rozdiely v dĺžke lag-fázy sa prejavili až pri vyšších teplotách uchovávaní s najvýraznejšou odchýlkou pri optimálnej teplote rastu kvasinky. Kým v modelovej emulzii bol zrejme inhibičným faktorom rastu kvasinky zvýšený obsah tuku a s tým spojené sférické zábrany v rozmnožovaní a raste kvasinkovej populácie, v mliečnych produktoch s obsahom tuku 1,5 % (UHT mlieko) a 30 % (UHT smotana) sa na spomalení intenzity rastu podieľala pravdepodobne laktóza, keďže sférické prekážky boli v porovnaní s emulziou neporovnateľne menšie.

Ako je z konkrétnych výsledkov vidieť, emulzné i mliečne produkty sú vhodným substrátom pre rast a rozmnožovanie acidotolerantného [22,23] a termorezistentného [35] kmeňa kvasinky *C. maltosa* YP1. Predpokladáme, že nami izolovaný kmeň *C. maltosa*, ktorý je navyše aj psychrotrofný, je v prostredí potravinárskych prevádzok rozšírený natolko, že pri nedostatočne uplatňovaných zásadách správnej výroby, hygienickej a sanitačnej praxe môže pôsobiť ako vzdušný alebo kontaktný kontaminant. Môže vytvárať pomerne stabilné biofilmy na povrchoch technologických zariadení a niekedy aj trvalejšie kontaminovať potravinárske produkty [35, 36]. Predurčujú ju k tomu zvýšená rezistencia voči vysokým teplotám [17], kyseline mliečnej [22, 23], kyseline benzoovej a jej sodnej soli (nepublikované výsledky), ako aj jej rast kvantifikovaný v tejto práci.

Podakovanie

Autori ďakujú za umožnenie sledovania dynamiky rastu kvasinky *Candida maltosa* YP1 v emulziách typu olej vo vode s obsahom tuku 60 % (w/w), snímanie preparátov použitým mikroskopu Leica s analógovou kamerou a polarizátorom, ako aj rady a pripomienky všetkým pracovníkom Ústavu technológie mlieka a tuků, Fakulty biochemickej a potravinárskej technológie VŠCHT v Prahe.

Literatúra

1. JAKOBSEN, M. - NARVHUS, J.: Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 1996, s. 755-768.
2. VILJOEN, B. C. - GREYLING, T.: Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 1995, s. 79-88.
3. ROOSTITA, R. - FLEET, G. H.: Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1996, s. 205-219.
4. GADAGA, T. H. - MUTUKUMIRA, A. N. - NARVHUS, J. A.: Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *International Dairy Journal*, 10, 2000, s. 459-466.
5. CONSENTINO, S. - FADDA, M. E. - DEPLANO, M. - MULARGIA, A. F. - PALMAS, F.: Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 2001, s. 53-58.
6. RICHTER, R. L. - LEDFORD, R. A. - MURPHY, S. C.: Milk and milk products. In.: VANDERZANT, C. - SPLITTSTOESSER, D. F.: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. vyd. Washington : American Public Health Association, 1992, s. 837-856.
7. BETTS, G. D. - LINTON, P. - BETTERIDGE, R. J.: Food spoilage yeasts: Effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control*, 10, 1999, s. 27-33.
8. ROSSI, J. - GOBBETTI, M. - BUZZINI, P. - CORSETTI, A. - SMACCHI, E. - DE ANGELIS, M.: Yeasts in dairy. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 47, 1997, s. 169-183.
9. CORBO, M. R. - LANCIOTTI, R. - ALBENZIO, M. - SINIGAGLIA, M.: Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 2001, s. 147-152.
10. KASÜSKE, A. - WEDLER, H. - SCHULZE, S. - BECHER, D.: Efficient electropulse transformation of intact *Candida maltosa* cells by different homologous vector plasmids. *Yeast*, 8, 1992, s. 691-697.
11. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava : ALFA, 1990. 750 s.
12. SCHMITZ, C. - GOEBEL, I. - WAGNER, S. - VOMBERG, A. - KLINNER, U.: Competition between *n*-alkane-assimilating yeasts and bacteria during colonization of sandy soil microcosms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 2000, s. 126-132.
13. CORTI, A. - FRASSINETTI, S. - VALLINI, G. - ANTONE, S.D. - FICHI, C. - SOLARO, R.: Biodegradation of nonionic surfactants. I. Biotransformation of 4-(1-nonyl)phenol by a *Candida maltosa* isolate. *Environmental Pollution*, 90, 1995, s. 83-87.
14. KURTZ, A. M. - CROW, S. A.: Transformation of chlororesorcinol by the hydrocarbonoclastic yeasts *Candida maltosa*, *Candida tropicalis* and *Trichosporon oivide*. *Current Microbiology*, 35, 1997, s. 165-168.

15. MUTOH, E. - OHTA, A. - TAKAGI, M.: Studies on cycloheximide-sensitive and cycloheximide-resistant ribosomes in the yeast *Candida maltosa*. *Gene*, 224, 1998, s. 9-15.
16. DELNERI, D. - TOMLIN, G. C. - WIXON, J. L. - HUTTER, A. - SEFTON, M. - LOUIS, E. J. - OLIVER, S. G.: Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene*, 252, 2000, s. 127-135.
17. LAUKOVÁ, D. - VALÍK, L. - GÖRNER, F. - SCHMIDT, Š.: Termorezistencia vegetatívnych buniek kvasinky *Candida maltosa*. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002, s. 169-178.
18. BUZZINI, P. - MARTINI, A.: Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 2000, s. 607-611.
19. KITAMURA, H. - ANRI, A. - FUSE, K. - SEO, M. - ITAKURA, C.: Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. *Veterinary Pathology*, 27, 1990, s. 465-466.
20. KOTRBA, D. - SIGLOVÁ, M. - MASÁK, J. - ČEJKOVÁ, A. - JIRKŮ, V.: Vliv podmínek prostředí na adhezi a tvorbu biofilmu. In: Abstrakty z 22. Kongresu Československé společnosti mikrobiologické. Košice : Československá spoločnosť mikrobiologická, 2001, s. 355.
21. JIRKŮ, V. - MASÁK, J. - ČEJKOVÁ, A.: Significance of physical attachment of fungi for biotreatment of water. *Microbiological Research*, 156, 2001, s. 383-386.
22. LAUKOVÁ, D. - VALÍK, L. - GÖRNER, F. - SCHMIDT, Š.: Vplyv kyseliny mliečnej na rast kvasinky *Candida maltosa*. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002, s. 131-143.
23. LAUKOVÁ, D. - VALÍK, L. - GÖRNER, F.: Effect of lactic acid on the growth dynamics of *Candida maltosa* YP1. *Czech Journal of Food Sciences*, 21, 2003, s. 43-49.
24. SNYDER, O. P.: Assuring safety of egg yolk-based sauces and salad dressings. St. Paul, Minnesota, USA : Hospitality Institute of Hospitality and Management, 2002. 13 s. <http://www.hi-tm.com/Documents/Mayonnaise.html>
25. STN ISO 7954. Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu kvasiniek a plesní. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 25 °C. 1998.
26. BARANYI, J. - ROBERTS, T. A. - MCCLURE, P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 1993, s. 43-59.
27. BARANYI, J. - PIN, C. - ROSS, T.: Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 1999, s. 159-166.
28. ADAMS, M. R. - MOSS, V.: *Food Microbiology*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 1995. 398 s.
29. VARNAN, A. H. - SUTHERLAND, J. P.: *Milk and milk products*. London : Chapman and Hall, 1994. 451 s.
30. PIJANOWSKI, E.: *Základy chémie a technológie mliekárstva*. II. Bratislava : Príroda, 1978. 623 s.
31. BROCKLEHURST, T. - WILSON, P. D. G.: The role of lipids in controlling microbial growth. *International Journal of Fats and Oils*, 51, 2000, s. 66-73.
32. WILSON, P. D. G. - BROCKLEHURST, T. F. - ARINO, S. - THUAULT, D. - JAKOBSEN, M. - LANGE, M. - FARKAS, J. - WIMPENNY, J. W. T. - VAN IMPE, J. F.: Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 2002, s. 275-289.
33. BROCKLEHURST, T. - PARKER, M. - GUNNING, P. - ROBINS, M.: Microbiology of food emulsions: physicochemical aspects. *Lipid Technology*, 5, 1993, s. 83-88.
34. STN ISO 4833. Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C. 1997.
35. MACGILLIVRAY, A. R. - SHIARIS, M. P.: Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1993, s. 1613-1618.

36. SLÁVIKOVÁ, E. - VADKERTIOVÁ, R.: Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72, 1997, s. 77-80.

Do redakcie došlo 17.10.2003.

**Quantitative analysis of the influence of the substrate and temperature
on the growth of the yeast *Candida maltosa* YP1**

LAUKOVÁ, D. - VALÍK, L.: *Bull. potrav. Výsk.*, 42, 2003, p. 239-254.

SUMMARY. Growth dynamics of an oxidative yeast *Candida maltosa* Komagata, Nakase et Katsuya in ultra-pasteurized milk (1.5 % fat content), ultra-pasteurized cream (30 % fat content) and model oil-in-water emulsion (60 % fat content) was determined in relation to storage temperature. In all substrates studied, growth of the yeast was observed at 6 ± 0.5 °C. With increasing the storage temperature, growth rates were increased and lag-phase shortened for *C. maltosa* YP1. Maximal growth rate of the strain *C. maltosa* YP1, $\mu = 0.38 \text{ h}^{-1}$, equivalently, the minimal generation time, $GT = 47 \text{ min}$, and minimal lag-phase duration, $\lambda = 2.9 \text{ h}$, were determined in the glucose solution kept at 37 and 25 °C (± 0.5 °C). The increase of growth rate of the yeast *C. maltosa* YP1 in response to the increasing storage temperature could be, in emulsion substrates, described by the Ratkowsky so called root model and in glucose solution with yeast extract by second-order polynomic equation. The decrease in the natural logarithm of the lag-phase ($\ln \lambda$) of *C. maltosa* YP1 in relation to the increasing storage temperature was subsequently characterized by linear correlations ($R_m^2 = 0.9499$; $R_s^2 = 0.9479$; $R_e^2 = 0.936$). Based on these correlations, predictions on when *C. maltosa* YP1, as a representative of yeast food contaminants, will reach the density of $1.10^6 \text{ CFU.ml}^{-1}$ are presented.

KEYWORDS: *Candida maltosa*; mathematical modelling of microbial growth; predictive microbiology