

Selekčné metódy uplatnené pri výbere a vedení násadného droždí v trenčianskej droždiarni

VÁCLAV STUHLÍK

Výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, Bratislava

663.12/14

Odlíšne prevádzkové pomery v trenčianskej droždiarni, v ktorej k prevetrávaniu sladín sa už 24 rokov používa veľajemného keramického vetrania a kde zvýšené požiadavky na dokonalejšie využitie kapacity jestvujúceho výrobného zariadenia si vyžiadali i priekopnícke zmeny v technologickom postupe, potvrdili v súhlase s princípy materialistickej biologie, že každý zásah do životných podmienok používaného kvasničného mikroorganizmu odzrkadlí sa tiež v zmene priebehu metabolických procesov. Taktiež sa potvrdila veľká dôležitosť výberu a šľachtenia používanej kvasničnej rasy na priebeh a výsledok výrobného procesu. Ukázala sa potreba, aby používaný kvasničný kmeň získal pri zvláštnom spôsobe šľachtenia rýchlu prispôbovaciú schopnosť a odolnosť voči kyslejšej reakcii, vyššej teplote a i iným škodlivinám, ktorým sú kvasinky vystavené počas štvornásobného predĺženia vegetačného obdobia pri polokontinuítom vedení kvasenia v porovnaní s výrobným periodickým procesom. Kyslejšou reakciou chráni sa pri polokontinuítnej výrobe droždiarske kvasenie pred cudzorodou, najmä bakteriálnou infekciou bez toho, že by táto mala nepriaznivý vplyv na trvanlivosť a farbu finálneho výrobku. Zmenšený pohyb skvasovanej droždiarskej sladininy pri keramickom vetraní spôsobuje na začiatku kvasenia badateľné spomalenie pučenia kvasiniek. Pri odolnej násade dá sa však toto spomalenie eliminovať zvýšením začiatkovej teploty na 30—32 °C. Javila sa potreba vypestovať výberom a nepretržitým šľachtením taký kvasničný kmeň, ktorý je odolný i voči dráždivým účinkom škodlivých látok vznikajúcich pri predĺženom kvasnom procese, či už vplyvom zloženia základných i pomocných surovín, alebo metabolitov divokých kvasiniek, ktoré sa v droždiarských záparách niekedy rozmnožia i pri prísnom dodržiavaní biologickej čistoty a ktoré donúti neodolný kvasničný kmeň k predčasnej aglutinácii. Zistenie a eliminovanie príčin, najmä fyziologickej aglutinácie vyvolanej nepriaznivými vplyvmi kvasného prostredia, je jedným z najdôležitejších predpokladov pre ďalší rozvoj droždiarskej technológie zvlášť pri prechode na plno kontinuálny výrobný postup.

Skúsenosť z praxe ukázala, že i pri výskyte totálnej aglutinácii prejavujú niektoré kvasničné bunky odolnosť k aglutinácii. Tým sa súčasne ukazuje i cesta, ako by bolo možné vypestovať kvasničné kmene, ktoré by boli odolnejšie voči pôsobeniu škodlivých látok a tým i voči obávanej aglutinácii. Kým v droždiarskej praxi nebola zavedená práca s čistými kvasničnými kultúrami, sústreďil sa hlavný zreteľ na vypestovanie odolného násadného droždí s významnými technologickými vlastnosťami pomocou sladín účelného zloženia. Kvasinky sa pestovali za podmienok, ktoré umožňovali elimináciu infekcie a slabých kvasničných jedincov silným vykyselením a kvasením v koncentrovaných sladínach pri zvýšenej kyslosti. Som jedným z mála pamätníkov, ktorí násadné droždie určené na skvasovanie melasových droždiarských sladín pripravovali a rozmnožovali v prevádzkovom

meradle v obilných záparách, prípadne i mliečne kysnutých. Presvedčil som sa vtedy, že v prípade dôslednej práce, najmä pri zekukorňovaní a pasterizácii obilných sladín, získavalo sa násadné droždie, ktoré pred 30 rokmi, na začiatku rozvoja droždiarskeho priemyslu, zaručovalo výrobu konzumného droždí vyhovujúceho vtedajším požiadavkám, kladeným na trvanlivosť a kvasivosť. Práca s obilnými sladinami, ktorá mala pri správnom postupe nesporný vplyv na kvalitu melasového droždí, bola technologicky obtiažna a neehospodárna. Používanie obilných sladín sa preto neskôr postupne obmedzovalo na laboratórium a propagáciu. Pri obilných sladinkách sa dokázalo, že sú prirodzeným substrátom, ktorý obsahuje životne dôležité látky pre výživu kvasníc a na základe týchto skúseností získali svoje uplatnenie v laboratóriu, najmä pri zavádzaní čistých kvasničných kmeňov do droždiarskej praxe. I keď nové pracovné metódy umožnili výber kvasničných jedincov z priemyselného kvasenia, ktoré prebehlo s výborným výsledkom, mykologická praxe. I keď nové pracovné metódy umožnili výber odlišného technologického procesu, ako tomu bolo v Trenčíne, si vyžiadali ustavičné zlepšenie kvality používaného kvasničného kmeňa.

Stará zásada, že dobré násadné droždie je základom výroby, platí i teraz. Nové výskumy o významе vzrastových látok a mikroelementov pre výživu, vzrast, rozmnožovanie, látkovú výmenu a predčasnú degeneráciu kvasiniek boli aplikované mykologickým laboratóriom v droždiarni, kde sa študoval vplyv a uplatnenie týchto látok pri zostavení laboratórnych substrátov pre pestovanie, prechovávanie a rozmnožovanie kvasiniek s významnými vlastnosťami technologického upotrebenia. V trenčianskom laboratóriu sa využívali okrem uplatnenia všetkých poznatkov vedy i všetky skúsenosti z tých čias, kedy sa čisté kvasničné kmene odobierali iba občas, najmä vo forme „Rasy M“ berlinského „Gärungs-institutu“. Keďže toto násadné, čisté droždie došlo spravidla v stave viac menej nespôsobilom na okamžité zavedenie, bolo potrebné, aby sa toto droždie v zmysle vtedy uplatňovanej a vyskúšanej techniky najprv vyčistilo silným vykyselením a potom prekvasením v koncentrovaných silne okyselených sladínach od bakteriálnej infekcie. Vykyselenie sa prevádzalo v 1,5 % až 2 % kyseliny sírovej počas 1 hodiny bez toho, že by došlo týmto praním k usmrteniu alebo poškodeniu všetkých kvasničných buniek. Toto brutálne pranie prekonala vždy len čiastka odolných kvasiniek, ktoré pri ďalšom kvasení v koncentrovaných záparách s optimálnym zložením a vyššej acidite dávali násadné, spoľahlivo pracujúce droždie. Už vtedy sa uplatňovala ustavičná selekcia priamo v prevádzke, lebo určitý podiel vyrobeného násadného droždí z výborného kvasenia sa odkladal na určitú dobu pre opätne zavedenie do prevádzky. Dôkazom toho, že každé násadné droždie v droždiarskej praxi sa bez jeho adaptácie na miestne výrobné pomery nehodí, sú nevydarené pokusy so zavedením vyhláseného obilného „Delftského droždí“

do praxe v melasových droždiarňach. Požiadavky, ktoré sa museli pri práci v mykologickom laboratóriu droždiarne na kvasničnú rasu rešpektovať, môžeme zhrnúť do týchto bodov:

1. Dobrá množivosť v melasových sladidlách minerálne živých s dobrou kvasivosťou v ceste.

2. Uchovávanie rovnomerných, enzymaticky účinných a vyrovnaných jedincov v priemernej veľkosti. Z týchto kvasníc vyrobených násadným droždím sa v tomto prípade dostane do expedičného kvasenia pri rovnakej váhe väčší počet enzymaticky účinných jedincov o väčšom povrchu, čo nezostane prirodzene bez vplyvu na priebeh látkovej výmeny, rozmnožovanie a prípadne i na generačnú dobu.

3. Odolnosť voči nepriaznivým vplyvom zloženia živného prostredia a prípadne voči prechodným poruchám v zásobovaní sladín živinami i vzduchom, ktoré sa môžu pri polokontinuutnom spôsobe kvasenia vyskytnúť. Predovšetkým je dôležitá odolnosť voči fyziologickej aglutinácii.

4. Zachovanie hlavných požiadaviek kvality, farby, trvanlivosti a kvasivosti finálneho produktu.

Kvasničný kmeň používaný v trenčianskej droždiarni bol v r. 1933 izolovaný z konzumného droždia pochádzajúceho z Anglicka. Je teda nepretržite 20 rokov v prevádzke, ovšem pri pravidelne prevádzkanej regenerácii a čistení pomocou kvapôčkovej kultúry. I keď sa pri mykologickej práci vždy pracovalo s prísnyim zachovávaním čistoty, prevádzkalo sa vždy i vykyselovanie čistej kultúry v sterilnom roztoku n/5 kys. sírovej. Po jednohodinovom pôsobení sa kvapka usadeniny preniesla z kvasničného sedimentu na dne freudenreichovky, po odliatí tekutiny do čerstvého živného roztoku. Takýmto spôsobom sa udržiaval v technologickej prevádzke používaný kvasničný kmeň v ustavičnej pohotovosti.

Prvá zásada uplatňovaná v prevádzke bola, aby sa udržiaval používaný kvasničný kmeň v pohotovosti výhradne v sladidlách bez akéhokoľvek pasážovania cez tuhé substráty. Robilo sa tak podľa zásad, ktoré hlásal prof. Dr. J. Šatava. Pri izolácii nových kvasiniek z výborného kvasenia sme zásadne vylučovali prečisťovanie na Petriho miskách a izoláciu sme prevádzali Lindnerovou metódou po predchádzajúcom hodinovom vykyselení. Používanie tekutého živného prostredia zaručovalo kvasinám všetky optimálne životné podmienky. Súčasne sa úpravou acidity a teploty umožňoval vplyv na rast takým smerom, aby sa v kvapôčke pod mikroskopickou kontrolou množili iba jedinci skutočne odolní. Pri tomto pracovnom postupe bola teda uplatňovaná na prvom mieste otázka výživy. Pravidelné mikroskopické sledovanie vzrastu umožnilo včasné prevedenie kvasiniek ešte pred vyčerpaním substrátu v kvapôčke do celkom malého množstva živnej sladinky, v ktorom sa rýchle zachytil i malý počet kvasiniek. S úspechom sa tiež k príprave kvapôčkovej kultúry používali sladinky, ktoré sa silne okyselili a sterilovali iba filtráciou. Fínkové práce, ktoré sa zaoberali charakterizovaním stavu kvasničných buniek, farebnou skúškou s metylénovou modrou a najmä konštatovaním, že istý podiel kvasničných buniek (asi 2 %) veľmi dobre odoláva otrave metylénovou modrou a zostáva pri živote, priviedli nás na myšlienku, či tieto odolné kvasničné bunky neodolávajú tiež dlhšiemu pôsobeniu prania kyselinami.

Tento predpoklad sa potvrdil, keď sa náhodou zabudlo pri pravidelnom 1hodinovom praní kvasničnej

kultúry vo freudenreichovke dodržať túto dobu a kvasinky zostali v kyslom kúpeli asi 5 hodín. Po inokulovaní časti kvasničného sedimentu do čerstvej sladinky sa ukázalo, že kvasinky, prípadne ich určitá časť zostali pri živote. Tejto skúsenosti sme využili a začali sme s pravidelným vykyselovaním čistej kvasničnej kultúry v roztoku n/5 kyseliny sírovej, pričom sme dobu prania predĺžili postupne až na 6 dní. Po vypraní sme kvasničnou usadeninou inokulovali živný roztok, u ktorého sme úmyselne udržiavali pH pri nízkych hodnotách (3,9–4,2). Tento striedavý postup sme nepretržite prevádzali u rovnakého kvasničného kmeňa po 2 roky. Po tejto dobe sme týmto spôsobom na odolnosť ku kyseléj reakcii adaptovaný kvasničný kmeň uviedli do praktickej prevádzky. Výsledky, ktoré sa dosiahli s týmto kmeňom na začiatku boli horšie, ako u kontrolného, neadaptovaného kvasničného kmeňa. Pri ďalšom vedení v prevádzke sa výsledky dosiahnuté adaptovaným kmeňom vyrovnali kontrolnému a ako sme sa presvedčili, zostala mu zachovaná odolnosť voči zvýšenej acidite. Prejavilo sa to tiež i vo zvýšenej trvanlivosti droždia vyrábaného adaptovaným kmeňom. Okrem zvýšenia spoľahlivosti droždiarskej prevádzky sa tento adaptovaný kvasničný kmeň veľmi úspešne uplatnil ako násadné droždie pri kvasení v poľnohospodárskych liehovarech, čo potvrdil vo svojom posudku Dr Ing. J. Malcher, na základe podrobných skúšok a výsledkov v praxi. Záver posudku znie takto: „Násadné droždie Trenčín, prechádza behom 12-ich hodín do búrlivého kvasenia, znáša vyššiu aciditu, nedegeneruje a pomáha veľmi eliminovať vplyv zlej prevádzkovej vody na prevasy. Priemerne zvyšuje na 100 kg škrobu vyťažnosť o 1–4 hl⁰, čo je odvislé často od celkového usporiadania v poľnohospodárskych liehovaroch“.

Povzbudení týmito úspechmi šľachtenia pokúsili sme sa vyzislovať kvapôčkovú kultúrou zo silne aglutinovaného droždia jedincov, ktoré nepodľahli aglutinácii. Pred prevedením kvapôčkovej kultúry podrobili sme kvasnice 1 hodinovému praniu v n/5 kyseliny sírovej, ktoré nemalo žiadny badateľný vplyv na rozrazenie aglutinácie. Týmto spôsobom sa nám podarilo vypestovať násadné droždie, ktoré pri prevádzaní kvasenia polokontinuutným spôsobom bolo odolnejšie voči aglutinácii.

V technologickej a droždiarskej praxi nie je vítaná nerovnomernosť v morfológickom tvare a najmä vo veľkosti kvasničných buniek. Pretiahle i drobné bunky spôsobujú ťažkosti nielen pri separovaní, ale prechádzajú i filtračným plátnom pri lisovaní. Ako sme už vyššie spomenuli, najvýhodnejšie sú tvary oválne, strednej veľkosti. Pri ďalšom spôsobe laboratórnej selekcie kvasničného kmeňa sme predpokládali, že odolnosť k menlivému zloženiu prostredia obmedzí menlivosť morfológickú. Predchádzajúcich skúseností s pravidelným práním prevádzkovej kvasničnej kultúry v kyseline, sme využili i k ovplyvneniu, prípadne tvarovému vyrovnaniu kvasničných buniek. Dr Beran vo svojom referáte v časopise „Průmysl potravin“ 4 (1953) č. 11 „Šlechtění kvasinky *Torulopsis* var. major“, použil k nahromadeniu veľkých plazmaticky bohatých buniek, metódy neúplného odstraďovania, pričom odstraňoval slabé, malé bunky. Už dávno predtým vypracovali sme v trenčianskej droždiarni pre výber droždiarských kvasiniek sedimentačnú metódu, ktorá je snadno prevediteľná bez nebezpečia sekundárnej infekcie. Selekcia sa prevádza v sterilnom 2%-om roztoku kyseliny mliečnej týmto spôsobom:

a) na kvasničný sediment na dne freudenreichovky, po odliatí vykvasenej sladiny, naleje sa do rovnakej výšky ako bola pôvodná sladinka 2 % sterilný roztok kyseliny mliečnej z freudenreichovky a dobre sa rozmieša.

b) Za $\frac{1}{2}$ až $\frac{3}{4}$ hod sa usadí na dne fľaštičky malý podiel kvasiniek pozostávajúci z väčších, ťažších buniek. Tieto sú spravidla v droždiarskom kvasení lenivé. Kvasničná suspenzia nad touto usadeninou sa opatrne zleje do freudenreichovky, v ktorej bol pôvodný sterilný roztok kyseliny mliečnej tak, aby kvasničný sediment ťažších buniek zostal na dne.

c) Odliata kvasničná suspenzia sa vo freudenreichovke dobre rozmieša a ponechá sedimentovať. Za 2—4 hod sa obsah freudenreichovky asi z poloviny vyčerí, pričom sa na dne vytvorí usadenina z kvasníc. V tomto okamihu nad usadeninou sa nachádzajúca tekutina, ktorá v zakalenom podiele obsahuje drobné a ľahké kvasničné bunky, sa odleje a na dne ostávajúci kvasničný sediment sa použije k ďalšiemu rozmnožovaniu. Obsahuje bunky strednej veľkosti. Časť opakovaním tohto postupu dosiahne sa tvarového vyrovnania kvasničných buniek.

Tento spôsob selekcie sa s úspechom využil i pri izolácii kvasiniek kvapôčkovou kultúrou podľa Lindnera. Normálne sa postupuje tak, že po rozmnožení vybraných kvapôčiek vo väčšom množstve živného roztoku sa ďalší výber prevádza výhradne na základe výsledkov mikroskopickej prehliadky. My sme sa však s týmto postupom neuspokojili a pred konečným vyradením najvhodnejšieho kvasničného kmeňa prevádzame počas asi 14-denného vedenia vybranej kultúry pri 25 °C ešte niekoľkokrát selekciu dekantáciou popísaným spôsobom. Týmto postupom sa podarí u vybraného kmeňa dosiahnuť tvarové vyrovnanie buniek, ktoré sa spravidla zachováva i pri ďalšom množení v prevádzke. I počas vedenia prevádzkového kmeňa pomáha občasná selekcia dekantácnou metódou udržať používané kvasinky dlho v dobrom stave. K zamedzeniu predčasnej degenerácie je potrebné, aby živná sladinka mala po stránke účinnosti vyrovnané zloženie. Zistili sme, že tejto požiadavke vyhovujú živné roztoky zostavované kombináciou rôznych prirodzených substrátov, lebo tým sa prakticky zaručuje prítomnosť rôznych druhov dôležitých aminokyselín, ktoré pridávané v zmesi sú pre výživu kvasiniek oveľa prospešnejšie ako jednotlivé aminokyseliny. Výťažky z rôznych prirodzených substrátov, ktoré sa používajú ako zložky pre živné roztoky, je výhodné pripravovať pomocou mliečneho kyselenia, ktoré má priaznivý vplyv na výťažnosť stravitelného dusíka a kyseliny fosforečnej a ktoré súčasne zvyšuje i množstvo vzrastových faktorov hotových vý-

ťažkov. Striedavé vedenie kvasničných kultúr v živných roztokoch rozličného zloženia má priaznivý vplyv na fyziologický stav kvasiniek a zamedzuje ich predčasnú degeneráciu.

Súhrn

V predloženom referáte sú popísané všetky okolnosti, ktoré vyplývajú z vývoja technológie výroby droždia za posledných 20—30 rokov. Trenčiansky závod dosiahol pri tom zvláštneho postavenia medzi droždiarňami. Uplatnenie veľajemného keramického vetrania droždiarských sladín a zavedenie polokontinuítnej výroby si vyžiadalo, aby používaný kvasničný kmeň mal prispôsobovaciu schopnosť a odolnosť voči kyslejšej reakcii, vyššej teplote a iným škodlivým látkam, ktorým sa kvasinky vystavujú počas predĺženého vegetačného obdobia polokontinuitným vedením kvasenia a prevetrávaním sladín keramickými sviečkami. Popisujú sa všetky vývojové fázy pri výbere, vedení a šľachtení prevádzkového kvasničného kmeňa. Tento sa udržuje v pohotovosti už 20 rokov výlučne v sladinkách bez pasažovania cez tuhé substráty. Jeho prečisťovanie na Petriho miskách sa zásadne vylučuje i pri pravidelnej prevádzanom výbere a izolácii z výborného priemyselného kvasenia. Ďalším vývojovým postupom šľachtenia prevádzkového kvasničného kmeňa bola jeho adaptácia na odolnosť voči vyššej acidite. Toto opatrenie si pri keramickom prevetrávaní vyžiadalo väčšie nebezpečie infekcie a adaptovaný kvasničný kmeň sa svojimi zvláštnymi vlastnosťami úspešne uplatnil, okrem vyriešenia spoľahlivosti v droždiarskej prevádzke i v poľnohospodárskych liehovaroch ako násadné droždie. Vôbec pri droždiarskej výrobe a zvlášť pri výrobe polokontinuítnej sa občas vyskytujúca aglutinácia vyžiadala, aby sa ďalším šľachtením vypestoval odolnejší kmeň voči aglutinácii. Požiadavka droždiarskej praxe, aby kvasničné bunky boli pokiaľ možno tvarovo vyrovnané a strednej veľkosti, viedli k vypracovaniu sedimentačnej výberovej metódy, ktorá je v referáte podrobne popísaná. Všetky zákroky a selekčné spôsoby by však nespĺnili svoju úlohu, keby prevádzkový kvasničný kmeň sa nevedel a nemnožil v živných tekutinách optimálneho a vyrovnaného zloženia. Výťažky z rôznych prirodzených substrátov pripravené biologickým kyselením dobre poslúžia ako zložky laboratórnych sladín, lebo tieto potom obsahujú nielen zmesi rôznych druhov aminokyselín, ale i mikroelementy a iné vzrastové faktory. Striedavé vedenie kvasničných kultúr v živných sladinkách rozličného a menlivého zloženia zabraňuje ich predčasnej degenerácii.