

Aglutinácia kvasiniek

863.12/.14

A. GINTEROVÁ, Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, pobočka Bratislava

S kvasinkami ako dôležitými priemyselnými mikroorganizmami sa stretávame v rôznych priemyselných odvetviach, medzi ktorými hlavné miesto zastáva pivovarníctvo, liehovarníctvo, vinárstvo, droždiarstvo a v súčasnej dobe sa silne rozvíjajúca priemyselná výroba kvasničných krmív. Preto sú kvasinkovité mikroorganizmy častým predmetom výskumu. Jedna z ich vlastností, ktorá má v rôznych odvetviach rôzny význam je aglutinácia (flokulácia). Pod týmto pojmom rozumieme zhlukovanie jednotlivých buniek do klkov, vločiek rôznej veľkosti (najmenej po 3 bunky), ktoré potom vzhľadom na svoju veľkosť rýchlejšie vpadávajú zo suspenzie. Samotný problém aglutinácie je veľmi starý a popísal ho vlastne prvý raz v 2. polovici minulého storočia Pasteur. Vážnejším výskumom aglutinácie sa však začali zapodievať až na prelome 19. a 20. storočia nemeckí pivovarníci. Pretože sa aglutinácia v rôznych priemyselných odvetviach kvasinkovitých mikroorganizmov prejavuje rôzne, aj výskumy sa zameriavali na tento problém z rôznych hľadísk.

Najčastejšie sa s aglutináciou stretávame v pivovarníctve a tu tkvie i ťažisko výskumov a dosiahnutých výsledkov. Na konci každej normálnej fermentácie *S. carlsbergensis* dochádza k aglutinácii a vločky kvasníc alebo spadnú ku dnu, alebo vyplávajú na povrch. V prípade, že k aglutinácii nedôjde, alebo nie je dostatočne intenzívna, zostávajú bunky dlhší čas v mladine a výrobok sa znehodnotí. V pivovarníckom priemysle je teda aglutinácia normálnym javom a výskumníkom ide iba o to, aby sa odhalili príčiny tohto javu a aby aglutinácia mohla byť ovládateľná, pretože predčasné vyvločkovanie kvasiniek má za následok neprekvasené pivo, oneskorené veľmi prekvasené. Ide teda o reguláciu procesu.

Iné pomery sú v liehovarníctve a droždiarenstve. Kedysi sa v liehovaroch, ktoré pracovali s čistými záparami, dávala prednosť suspenzným, tzv. práškovitým kvasniciam, ale v závodoch, kde sa súčasne vyrábali lisované kvasnice, sa pred zavedením odstredovania doporučovala slabá aglutinácia pre snadnejšie oddelenie kvasníc. Odkedy v droždiarňach pracujú výkonné separátory, stala sa aglutinácia nevíťanou poruchou, pretože okrem toho, že vyvločkovanie kvasnice v zápore znižujú výkon odstrediviek a pochopiteľne, horšie sa prepierajú, majú obvykle zníženú trvanlivosť (okrem iného práve pre nedokonalé premývanie) a zníženú aktivitu v ceste, v dôsledku nedokonalého rozptýlenia sa a teda zníženia účinného styčného povrchu kvasiniek s cestom. Pri liberikovaní sú niekedy lámacé a znižujú výkony liberikovacích strojov.

Ako už bolo spomenuté, najviac prepracovaná je aglutinácia u pivovarských kvasiniek. V súvislosti s pekárskymi kvasnicami nachádzame v literatúre len veľmi málo špeciálne zameraných experimentálnych prác a poväčšine len zmienky o tomto jave

v rôznych droždiarenských technológiach. Táto situácia v štúdiu aglutinácie je okrem iného (napr. oveľa väčší význam aglutinácie pre pivovarníctvo ako pre droždiarstvo) spôsobená i hospodárskou situáciou, pretože veľké pivovary mali možnosť zriaďovať si výskumné laboratória, v ktorých sa tieto a iné problémy riešili.

Uvediem prehľad názorov na aglutináciu, ako sa ony objavovali v literatúre od začiatku tohto storočia. Už prví experimentátori v tejto oblasti vybadali, že aglutinácia bude spôsobená určitými vzťahmi medzi kvasinkami a sladinou, v ktorej rástli a príčiny vyvločkovania videli hlavne v zložení živného prostredia. Skoro súčasne sa však objavuje aj iný názor, ktorý sa aplikoval hlavne na aglutináciu vrchných kvasníc, a to pôsobenie mikroorganizmu *Leuconostoc aglutinans* (neskôr premenovaný na *Lactococcus aglutinans*). Predpokladalo sa, že kvasničná bunka, pestovaná za prevzdušňovania, sa obaluje slizovitým produktom týchto baktérií, v dôsledku čoho dochádza k aglutinácii. Experimentálne bolo dokázané, že ak bola potlačená tvorba slizu týmito baktériami, bola i aglutinácia nižšia. Samozrejme tento názor nemohol vysvetliť príčinu aglutinácie v kultúrach, ktoré neboli infikované.

Zaujímavú teóriu aglutinácie podal Lange (1907), ktorý experimentoval s lisovanými kvasnicami. Podľa nej je aglutinácia zapríčinená vrstvou proteínu adsorbovaného na bunkovej stene. U neaglutinovaných kvasníc je táto vrstva proteínu rozpúšťaná bunkou vylučovaným enzýmom peptázou. Aglutinované kvasnice nevylučujú dostatočné množstvo peptázy a proteínová vrstva sa nestačí rozkladať, preto dochádza k vzájomnému „zlepovaniu“ buniek. Langeho teória sa zakladá na stanoveniach pôsobenia proteolytických enzýmov kvasníc. Novšie výskumy však túto teóriu nepotvrdili.

Celý rad autorov skúmal vplyv najrozličnejších solí na aglutináciu. U väčšiny z nich bol aglutinačný vplyv skutočne dokázaný. Predovšetkým to platilo pre vápenaté a horečnaté soli, soli kyseliny boritej, hlinité a železité soli. Napriek tomu sa nepodarilo vplyvom solí vysvetliť aglutináciu. Je to jednak tým, že v mnohých prípadoch na vyvolanie aglutinácie boli potrebné značné množstvá solí, ktoré sa ani teoreticky nedali v prirodzených substrátoch predpokladať ani analyticky dokázať, jednak tým, že akonáhle sa skúmala každá jednotlivá soľ v destilovanej vode, bola situácia prehľadná, ale keď sa uvažoval vplyv mnohých solí v zmesi, bolo ťažko robiť nejaké závery. Naviac tu existovala iná stránka tej istej veci — pH. Vplyv pH roztokov bol u niektorých autorov považovaný za hlavnú príčinu aglutinácie (Malkow a spoluprac. 1933). Až novšie výskumy vniesli do týchto pokusov viac svetla.

Začiatkom tridsiatich rokov sa v literatúre aglutinácia začína uvažovať ako koloidne chemický jav. Lüers poukazuje na vzájomné pôsobenie medzi zlú-

čeninami, prítomnými na bunkovej stene a zlučeniami v sladine. Zaoberal sa tiež elektrickým nábojom bunkovej steny. Podal teoreticky veľmi pochopiteľný predpoklad, že maximum aglutinácie sa kryje s izoelektrickým bodom bunkových proteínov (Lüers a Heuse 1921), ktorý sa však podľa údajov v literatúre nepodarilo experimentálne dokázať. Lüersov pohľad na aglutináciu bol však nový a priniesol nové možnosti experimentovania. Začali sa zostrojovať rôzne mikroeletroforetické aparátúry, v ktorých sa priamo pod mikroskopom pozoroval pohyb buniek v elektrickom poli. Prvé výsledky však boli zatažené značnými metodickými chybami a je ich ťažko uvažovať. Zároveň sa v tejto dobe začína venovať viac pozornosti pH prostredia.

Na jav aglutinácie sa aplikujú nové metodiky a nové poznatky z odboru koloidnej chémie. Vývojom názorov i metodických postupov sa podrobne zaoberá v súbornom referáte Silbereisen (1960), ktorý v tomto smere publikoval početné práce. Možno konštatovať, že názory na aglutináciu boli značne roztrieštené, práve tak, ako i výsledky experimentálnych prác. Na vysvetlenie by bolo možné uviesť, že sa pracovalo s rôznym kvasinkovitým materiálom a teda sa ani teoreticky nedá očakávať jednota vo výsledkoch pokusov. Cenné je, že sa vypracovali metodiky, s ktorými sa mohlo aspoň približne kvantitatívne pracovať.

Z metód, ktoré boli vypracované pre stanovenie samotnej aglutinácie sa najviac ujala metóda Burnsova (1937), ktorá bola značne jednoduchá a nenáročná. Merala sa výška sedimentu v kalibrovaných skúmavkách za určitý časový interval. Na podobnom princípe, ale technicky náročnejšiu metódu vypracoval súčasne Nielsen (1937), kde sa na aglutináciu usudzovalo v rozdielov sušín suspenzie homogénnej a čiastočne sedimentovanej, ktorej určitý objem sa po danom čase vypúšťal z byrety.

Jansen (1958) vo svojej súbornej stati konštatuje, že do roku 1940 sa výskumy aglutinácie sústredili hlavne na spodne fermentujúce kvasinky. Z faktorov, ktoré vplyvajú na aglutináciu bol do určitej miery preštudovaný vplyv elektrolytov (ako sa neskôr začal uvažovať vplyv solí). Zistila sa tiež závislosť aglutinácie na rase študovaných kvasiniek, ale nerobili sa nijaké genetické výskumy. Všeobecne sa stanovila komplexná povaha javu aglutinácie kvasníc.

Bohatým zdrojom údajov o aglutinácii za ďalšie desaťročie sú materiály Európskeho pivovarského kongresu v Brightone v r. 1951, ktorý mal ako základnú tému rokovania práve aglutináciu. Tu nájdeme výsledky podrobného genetického rozboru aglutinácie, ku ktorým pristúpili vo svojich pokusoch Gilliland (1951) a Thorne (1951). Skúmali aglutináciu vrchne fermentujúcich kvasníc. Obaja zistili, že aglutinácia je vo svojich špeciálnych prípadoch dedične charakteristická a teda pod genetickou kontrolou. Gilliland robil genetické pokusy na dvoch typoch divokých kvasiniek (*S. cerevisiae*), pretože pivovarské kvasinky ťažko sporulujú. Z pokusov vyvodil, že aglutinácia je ovládaná jediným génom. Thorne bol metodicky úspešnejší a získal spóry z pivovarských kvasníc. Zistil, že hybridy získané

krížením aglutinujúceho a neaglutinujúceho kmeňa boli aglutinujúce, zatiaľčo dva neaglutinujúce kmeňe produkovali neaglutinujúci hybrid. Podrobný rozbor Thorneových prác by presahoval rámec tohto článku. Je však zaujímavé, že tento autor dokázal, že za aglutináciu sú zodpovedné najmenej tri páry génov. Pritom samozrejme aj Gilliland aj Thorne, hoci stoja na stanovisku dedičnej podstaty aglutinácie priznávajú, že treba brať do úvahy i faktory prostredia.

Ako už bolo spomenuté, z hľadiska nábojovej teórie sa v starších prácach nedosiahla jednota názorov. Boli práce, v ktorých sa tvrdilo, že v priebehu fermentácie získavajú kvasinky kladný náboj, hoci na začiatku mali záporný. Wiles (1951) a Jansen a Mendlik (1951) vyvrátili tieto názory a zistili, že kvasinky počas fermentácie nikdy nestrácajú svoj negatívny náboj. Wiles našiel dva kmeňe kvasiniek, ktoré podľa jeho výsledkov nemajú náboj a ďalej zistil, že premývaním v acetátovom pufri sa negatívny náboj buniek zvyšuje, čo vysvetľuje odstránením bielkovinných a iných častíc ulpelých na povrchu buniek. Pri skúmaní vplyvu číridiel zistil, že napr. želatína vyvoláva kladný náboj buniek a tiež aglutináciu. Tento kladný náboj sa dal premývaním odstrániť. Jansen a Mendlik stanovili izoelektrický bod a teda bod zvratu náboja kvasiniek na pH 2,3, čo sa vo fermentáciách prakticky nemôže vyskytnúť. Podľa Hartonga (1951) to však nemusí byť práve izoelektrický bod, pretože kvasinky pod určitou hladinou elektrického náboja sú náchylné tvoriť zhluky. Naproti tomu sa však Jansen a Mendlik domnievajú, že aglutinovateľnosť kvasníc nie je priamo závislá na jednotlivých hladinách náboja buniek.

Ďalší z názorov tejto doby na aglutináciu je názor Trollea (1950), že náboj má len sekundárnu úlohu a že aglutinácia je dôsledok poklesu fermentačnej sily — produkcie CO₂. Podľa neho bublinky CO₂ udržiavajú bunky v pohybe a bránia sedimentácii. Tento názor je však zrejme značne zjednodušený a v novších prácach sa už neobjavuje.

Znova sa objavuje a vo svetle nových zistení interpretuje vplyv elektrolytov, hlavne vplyv solí s dvoja- a trojmocnými kationmi. Potvrdilo sa v rade prác, že aglutinované kvasnice možno premytím zbaviť aglutinácie a pridaním napr. vápenatých, železitých alebo cémentových iónov znova vyvločkovat. Takéto kvasnice možno premytím znova zbaviť aglutinácie. Jav je teda reverzibilný. Samozrejme spotreba rôznych elektrolytov na aglutináciu rôznych kvasníc nie je rovnaká, čo súvisí s nerovnakou povahou povrchových skupín na bunkovej stene a z toho vyplývajúcim nerovnakým nábojom buniek. Tieto skutočnosti by z druhej strany dopĺňali zistenia (Jansen a Mendlik 1953), že povrchovo aktívne látky organického pôvodu (niektoré alkylsulfonáty) sa adsorbujú na povrch buniek a ovplyvňujú ich svojím vlastným nábojom. Dalo by sa síce očakávať, že negatívne nabitý povrch buniek bude odpudzovať negatívne nabitú anionaktívnu látku, zdá sa však, že adsorpčné sily tu prevažujú a adsorbciu možno okrem vzrastu negatívneho náboja buniek dokázať

i úbytkom aktívnej látky z prostredia. U takýchto kvasníc bola pozorovaná znížená aglutinovateľnosť.

Ešte názornejšie pokusy, ktoré svedčia o neobyčajne dôležitej úlohe povrchových skupín a teda náboja buniek boli robené s ľudským fibrinogénom a dialyzovanou želatinou. Ak boli kvasnice „obalené“ fibrinogénom a izoelektrickým bodom pri pH 5,5 ukazovali rovnaké vlastnosti, či šlo o kvasnice aglutinované, alebo neaglutinované. Všetky mali ten istý izoelektrický bod 5,5. Mali negatívny náboj v acetátovom pufre nad pH 5,55 a pridaním malého množstva viacmocného kationu aglutinovali. Pri pH pod 5,5 náboj buniek prechádzal na pozitívny a mohol sa neutralizovať prídavkom polyvalentného anionu (Alexander a McMullen 1949, cit. z Jansen 1958).

Tieto výsledky jasne ukazujú, že základné vlastnosti kvasníc vo vzťahu k aglutinácii sa môžu maskovať obalmi rôznych bielkovín, čo dokazuje, že extrémne podmienky vonkajšieho prostredia môžu prevládať nad charakteristickými vlastnosťami, riadenými genotypom. Ďalej tieto výsledky ukazujú na dôležitosť zmeny náboja pri aglutinácii, i keď pravda nič nehovorí o primárnych príčinach zmeny náboja. Z hľadiska týchto výsledkov sa potom dajú ľahšie pochopiť i v literatúre často spomínané preventívne alebo stimulačné vplyvy mnohých látok na aglutináciu.

Iného charakteru pravdepodobne bude ochranný vplyv cukrov voči aglutinácii, ktorý sa v literatúre často spomína. Eddy (1955) potvrdil staršie práce, že vplyv cukrov postupuje v rade maltóza—sacharóza—glukóza. Tu by sa dalo uvažovať i o Trolleovej teórii aglutinácie, pretože preventívny účinok majú cukry, ktoré kvasinky dobre skvasujú. Zdá sa však, že tento vplyv bude hlbší ako mechanické dispergovanie suspenzie vytvorenými bublinkami CO₂. Navyše ešte treba zdôrazniť, že aglutinácia súvisí s vekom kvasiniek (Helm a spoluprac. 1953) a rôzne vplyvy, ktoré tu boli spomínané, ale predovšetkým inhibícia aglutinácie cukrami s týmto vekom kvasiniek súvisia.

Vo veľkej väčšine prác uvádzaných v literatúre sa pri probléme aglutinácie uvažuje o vzájomnom vzťahu kvasiniek a prostredia, kde oba faktory, aj kvasinky aj prostredie sa zúčastňujú aktívne. Sú však i iné práce, v ktorých sa autori pokúšali nájsť špecificky účinnú látku, ktorá by samotná bola za aglutináciu zodpovedná. Sem by sme mohli zaradiť povrchovo aktívne látky z chmeľa, alebo Kudom spomínaný treberín, získaný horúcou vodnou extrakciou z jačmeňa (Kudo 1954). Za podobne účinné látky považoval Kijima (1954) humínové kyseliny. Pokusmi so želatinou obalenými kvasinkami a sledovaním korelácie medzi aglutináciou a obsahom bielkovín v mladine ukázal, že humínové kyseliny mladiny spôsobujú silnú aglutináciu a bielkoviny, obsažené v mladine, pôsobia proti tomuto vplyvu humínových kyselín.

Nedávno na II. medzinárodnom sympóziu o kontinuálnych fermentáciách v Prahe hovoril o aglutinácii Kaľužnyj (1962). Uvádzal svoje pozorovania, že v aglutinovaných kvasniciach je v porovnaní

s práškovitými znížený obsah voľnej, osmoticky pohyblivej vody a zvýšený obsah vody viazanej. Zároveň uvádza, že pôsobenie stimulátorov rastu kvasiniek sa prejaví zvýšeným obsahom voľnej vody a opačný účinok má pôsobenie inhibitorov. Kaľužnyj považuje preto prítomnosť vodných obalov buniek a obsah ich pohyblivej vody za rozhodujúci pre jav aglutinácie.

Z uvedeného stručného prehľadu je zrejmé, že v probléme aglutinácie zatiaľ nie je jasno. Je síce nahromadený už značný experimentálny materiál (v tomto prehľade sa omeďujeme na citovanie prác súborných okrem niektorých závažných a nových prác), ale ešte stále je ťažko rozlíšiť čo sú primárne príčiny a čo sekundárne následky. Možno s istotou potvrdiť iba to, že ide o jav komplexný. Veľmi pravdepodobne nebude aglutinácia u pivovarských kvasníc identická so sporadicky sa vyskytujúcou aglutináciou v droždiarňach. Dedičné faktory boli dokázané zreteľne, ale bolo tiež konštantované, že podmienky okolitého prostredia môžu typické vlastnosti kvasiniek maskovať, pretože sa súčasne môžu v prostredí vyskytovať rôzne alkoholy, bielkoviny, pentózy a pod., ktoré aglutináciu podporujú, ale i iné bielkoviny, cukry a rôzne látky, ktoré pôsobia proti aglutinácii a ovplyvňujú manan-fosfolipid-proteinový komplex na povrchu kvasničnej bunky.

Poznanie podstaty aglutinácie, ktoré nebude jednoduchým problémom umožní bližšie osvetlenie vzťahu medzi bunkou a jej okolím. Ide nakoniec o možnosť regulácie tohto javu. Jeho odstránenie bude zároveň odstránením jednej z vážnych prekážok zavedenia kontinuálnych procesov do rôznych oblastí fermentačných výrob. Na druhej strane možnosť jeho vyvolania by našla hojné uplatnenie pri úspore separátorov hlavne v malých výrobniciach kvasničných krmív.

Literatura

- [1] Alexander A. E., McMullen A. I., 1949, Research (London), Suppl. Surface Chemistry (cit. z Jansen H. E., kap. 13 z knihy The Chemistry and Biology of Yeast, New York 1958).
- [2] Burns J. A.: J. Inst. Brew. **43**, 31 (1937).
- [3] Eddy A. A.: J. Inst. Brew. **61**, 307 (1955).
- [4] Gilliland R. B.: Proc. Europ. Brew. Congr. Brighton, str. 35, 1951.
- [5] Hartong D. B.: tamtiež str. 110, 1951.
- [6] Helm E., Nohr B., Thorne R. S. W.: Wallerstein Lab. Commun., **16**, 315 (1953).
- [7] Jansen H. E.: Flocculation of yeast, v knihe The Chemistry and Biology of Yeast, New York 1958, str. 635.
- [8] Jansen H. E., Mendlik F.: Proc. Europ. Brew. Congr., Brighton, str. 59, 1951.
- [9] Jansen H. E., Mendlik F.: Proc. Europ. Brew. Congr., Nice, 1953 (cit. z Jansen 1958).
- [10] Kalyuzhny M. Ya.: Yeast flocculation and sorption in continuous sulphite waste liquors fermentation, materiály II. International symposium on continuous culture of microorganism, Praha jan. 18.—23. 1962.
- [11] Kijima M.: J. Inst. Brew., **60**, 223 (1954).
- [12] Kudo S.: Brauerei **8**, 345 (1954).
- [13] Lange H.: Wochenschr. Brau. **24**, 445 (1907), [cit. z Jansen 1958].
- [14] Lüers H., Heusz R.: Z. ges. Brauw. **44**, 18 (1921).
- [15] Malkov A. M., Petina A., Tzvatkova N.: Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. **83**, 193 (1933).
- [16] Nielsen N.: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, sér. physiol. **22**, 61 (1937).
- [17] Thorne R. S. W.: Proc. Europ. Brew. Congr., Brighton, str. 21 (1951).
- [18] Trolle B.: J. Inst. Brew. **56**, 364 (1950).
- [19] Wiles A. E.: Proc. Europ. Brew. Congr., Brighton, str. 84, 1951.

Došlo do redakcie 22. 8. 1962.

АГЛУТИНАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ

В статье рассматриваются производственные неполадки на дрожжевом заводе, выпускающем хлебопекарные дрожжи, причиной которых была аглутинация дрожжей. В статье подчеркивается важное значение решения проблемы аглутинации с точки зрения перехода на непрерывные методы производства. На основании имеющихся в настоящее время результатов научно-исследовательских работ не является возможным объяснить вполне надежно причины аглутинации хлебопекарных дрожжей и нельзя поэтому предложить эффективные профилактические меры.

AGGLUTINATION DER HEFEN

In dem Artikel werden die durch Hefeagglutination hervorgerufenen Betriebsstörungen bei der Backhefeerzeugung behandelt und es wird die Bedeutung der Lösung des Agglutinationsproblems für den Übergang zu den kontinuierlichen Herstellungsverfahren erörtert. Aufgrund der heutigen Kenntnisse kann man die Ursachen der Hefeagglutination nicht erklären und auch keine wirksame preventive Maßnahmen vorschlagen.

FLOCCULATION OF YEAST

The article deals with troubles caused by flocculation at factories producing baker's yeast. The problems of flocculation are extremely important and must be duly understood prior to changing existing batch technology to continuous one. The knowledge of the nature of processes taking place is at present not deep enough to explain the reasons of flocculation, let alone to suggest effective countermeasures.