

Infekčné mikroorganizmy a aglutinácia pri výrobe pekárskeho droždia

A. GINTEROVÁ, E. MITTERHAUSZEROVÁ, O. JANOTKOVÁ, E. JEŽOVÁ,

Výskumný ústav liehovarského a konzervárenského priemyslu, Bratislava

663.14.038.5

Agglutinácia kvasníc v súvislosti s infekčnými mikroorganizmami sa spomína viac v staršej literatúre, kde sa aglutinačný vplyv pripisoval hlavne mikroorganizmu *Lactococcus agglutinans*. Špeciálne pekárskymi kvasnicami aj vo vzťahu k infekcii sa zaoberal Malkow (1934), ktorý zo svojich výsledkov okrem iného vyvodzuje, že prítomnosť produktov látkovej premeny „Flockenmilchsäurebakterien“ urýchľuje aglutináciu kvasníc. Väčšina starších prác zameraných na problém infekcie sa, pravda, týka pivovarských kvasníc. I keď sa v novšej literatúre vplyv infekčných mikroorganizmov nespomína, naše orientačné výsledky naznačili, že by bolo treba podrobnejšie preštudovať tento problém, pretože sa tu objavuje viac styčných bodov s aglutináciou.

Predovšetkým by si bolo treba jasne definovať, čo považovať v súvislosti s výrobou pekárskeho droždia (a pri fermentačných výrobách vôbec) za infekčné organizmy. Domnievame sa, že všetky živé organizmy, ktoré sa vyskytujú v preparáte kvasiniek a líšia sa od preparátu čistej kultúry či už tvarom, farbou a vzhľadom kolónií alebo biochemickými vlastnosťami, treba považovať za infekciu (bez ohľadu na to, či môže ísť o infekciu zvonku alebo o štiepenie základného materiálu). Všetky naše pokusy, ktoré sme robili vo vzťahu infekcie k aglutinácii sme hodnotili z tohto hľadiska, i keď sme v konečnom hodnotení rozlišovali, či ide o infekciu kvasinkovitými mikroorganizmami, baktériami a pod.

Experimentálna časť

Pretiahle formy kvasiniek

V droždiarňach sa za príčinu aglutinácie často považuje bunka veľkosťou podobná pekárskej kvasinke, pretiahnutá do dĺžky s jedným alebo dvoma ostro svetlo lámajúcimi telieskami, ktoré označujú ako torula. Skutočne, počas nášho štvorročného sledovania aglutinácie v prevádzkových podmienkach sa vždy v preparáte aglutinovaných kvasníc vyskytovali tieto pretiahle bunky. Treba ale poznamenať, že všetky naše pozorovania výroby sa vzťahujú na droždiareň v Trenčíne. V laboratórnych podmienkach sme často získali aglutinovanú kultúru kvasiniek, v ktorej se takéto pretiahle bunky nevyskytovali. Venovali sme týmto mikroorganizmom zvýšenú pozornosť a snažili sme sa ich z fermentačnej kvapaliny izolovať a v čistej forme preštudovať. Použili sme na to bežné izolačné metódy, rozotieranie na platne, mikroskopickú kontrolu a ďalšie rozotieranie čistých kultúr. Izolácie sme robili na sladínovom i melasovom agare. Zistili sme, že na sladínovom agare sa nám časom tieto formy strácajú a v preparátoch sa objavujú vždy viac a viac iba normálne pekárske kvasinky (*Saccharomyces cere-*

visiae) mierne oválneho tvaru. Po vyočkovaní tejto kultúry do tekutej melasovej pôdy a po viacnásobnom pomnožení sa v preparátoch znovu objavovali pretiahle formy. Na melasovom agare sa udržiavali lepšie ako na sladínovom, ale nikdy sa nám nepodarilo získať kolóniu z jednej bunky, čistú kultúru, v ktorej by na preparáte boli iba pretiahle formy. Na druhej strane i veľmi pečlivo pripravená čistá kultúra, dlhšie pasážovaná na sladínovom agare a v tekutej sladínovej pôde, po vyočkovaní do melasových pôd dávala kvasinky, v preparátoch ktorých sa objavovali pretiahle formy.

Naše výsledky v tomto smere veľmi dobre dopĺňajú zistenia Sedlárovej (1962), ktorá izolovala monokultúry mikromanipulačnou technikou a sledovala izoláty pri ďalšom množení. Ako ilustráciu uvádzame z jej výsledkov kvasinky na obr. 1, 2 a 3. Je to izolát z trenčianskej kultúry, pôvodne izolovaný z potomstva kvasinky rozmerov $12 \times 4,5 \mu$. Materská kvasinka na obrázkoch mala rozmery $14 \times 6 \mu$. Ako je vidieť na obrázkoch, z pretiahlej kvasinky vyrastali dcérske bunky guľaté i oválnejšie.

Na základe získaných výsledkov sme konštatovali, že pretiahly kvasinkovitý mikroorganizmus, tzv. torula je dôsledkom nestálosti alebo nečistoty kmeňového materiálu kvasiniek, s ktorými sme pracovali. Nakoľko sme v laboratórnych podmienkach často získavali aglutinované kultúry, v ktorých sa pretiahle formy kvasiniek nevyskytovali, nedomnievame sa, že by tieto formy priamo súviseli s aglutináciou, hlavne že by ju vyvolávali. Pravdepodobnejšie bude, že častejší výskyt kvasiniek pretiahleho typu budú vyvolávať približne také vonkajšie podmienky, aké vedú k aglutinácii a preto je ich výskyt v aglutinovaných záparách častejší.

Percento infekcie a aglutinácia

Stanovovaním percenta infekcie bežnou platňovou metódou a počítaním kolónií sme sledovali, nakoľko môže súvisieť infekcia droždia pri výrobe s jeho aglutinovanosťou.

Sledovali sme expedičné trenčianske droždie a pre porovnanie niekoľko vzoriek z výroby Olomouc. Aby sme vylúčili sekundárnu infekciu, odoberali sme materiál priamo od lisov. Len olomoucké droždie sme dostali liberkované. Trenčianske kvasnice sme rozdelili na tri skupiny: neaglutinované, stredne aglutinované a silne aglutinované. Olomoucké boli neaglutinované.

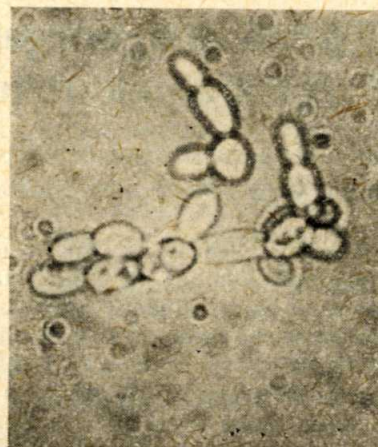
Vzorky droždia sa suspendovali v sterilnej destilovanej vode a rozotierali vždy na 6 paralelných Petriho miskách. Misky sa nechávali v termostate pri 28°C a po 48 hodinách sa počítali vyrastené kolónie pomocou počítača kolónií. Potom sa misky



Obr. 1. Izolát pretiahlej kvasinky z trenčianskeho droždia. Dcérske bunky majú tvar normálnych trenčianskych kvasiniek. 3,5 h stará kultúra



Obr. 2. Tá istá kultúra ako na obr. 1, stará 5,5 h



Obr. 3. Tá istá kultúra ako na obr. 1 a 2, stará 7,5 h. Na obrázku je zreteľná tvarová nevyrovnanosť potomstva pretiahlej materskej bunky

otvorili a z jednotlivých typov kolónií sa robili preparáty pre lepšiu charakteristiku mikroorganizmov, ktoré ich tvorili. Z každého typu kolónií sme získali izolát v čistom stave. Vyčistené infekčné mikroorganizmy boli potom vyočkované na šikmý sladivový agar a po vyrastení zalievané parafínovým olejom. Takto sme získali zbierku infekčných mikroorganizmov, s ktorými sme potom robili ďalšie pokusy v súvislosti s aglutináciou.

Najčastejší typ infekcie, s akým sme sa stretli asi v 75 % prípadoch, bola infekcia kvasinkovitými mikroorganizmami. Zostávajúcich 25 % bola infekcia bakteriálna.

Vyhodnotenie percenta infekčných mikroorganizmov v expedičných kvasniciach podľa vyššie spomínaných skupín je uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Vyhodnotenie percenta infekčných mikroorganizmov

Skupina kvasníc	% infekcie	s _x
Trenč. neaglutinované	36,4	4,5
Trenč. stred. aglutinované	41,4	3,9
Trenč. silno aglutinované	59,7	5,0
Trenč. aglut. (obe predchádzajúce skupiny)	43,5	3,7
Olomoucké (neaglut.)	20,0	2,9

Ako vidieť z údajov v tabuľke 1 najmenej infekčných organizmov malo olomoucké droždie, hoci sme ho dostávali až po liberikovaní. I štatisticky testovaná preukaznosť rozdielov voči všetkým ostatným súborom je veľmi presvedčivá, P je zväčša nižšie ako 0,001 (okrem olomoucké proti trenč. stredne aglutinovanému, kde P je o niečo vyššie ako 0,01). Nепreukazné sú rozdiely medzi trenč. neaglutinovanými a silne aglutinovanými a trenč. silne aglutinovanými a stredne aglutinovanými. Nakoniec stredné chyby priemerov ukazujú, že súbory boli značne nehomogenné so širokým variačným rozpätím.

Ako sme už spomínali, najčastejšou formou infekcie boli rôzne kvasinkovité mikroorganizmy, ktoré sa tvarom buniek pod mikroskopom alebo tvarom

kolónií a ich vzhľadom líšili od základného kmeňového materiálu. Zväčša išlo o pretiahle formy kvasiniek, ktoré tvorili naružovelé alebo priesvitné rozliate kolónie. Vzhľadom na to, čo bolo vyššie povedané, nemuseli všetky typy infekčných organizmov, ktoré sme za takéto považovali byť skutočne infekciou zvonku. Sme naopak presvedčení, že mnohé z týchto organizmov sa objavili v zápore štepením značne nevyrovnaného a nestabilného základného kmeňového materiálu. Pretože sme sa špeciálne jeho analýzou nezaoberali a nepoznáme jeho disociačné schopnosti, zaradovali sme medzi infekčné i kolónie, ktoré mohli byť R-formami.

V každom prípade však naše výsledky ukazujú, že medzi výskytom aglutinácie a infekciou je určitá súvislosť. Využili sme preto našu zbierku infekčných mikroorganizmov a v niekoľkých pokusoch si ich vzťah k vzniku aglutinácie osvetlili podrobnejšie.

Fermentačné pokusy s infekčnými organizmami

Zo súboru infekčných organizmov sa vybral predstaviteľ každého typu (podľa tvaru kolónie na agare a mikroskopického obrazu). Získali sme tým 34 typov infekčných organizmov, ktoré sme pomnožili vo Freudenreichových fľaškách na obilnej sladine a suspenziou takto získaných organizmov sme umelo infikovali normálne trepačkové kultivácie trenčianskych pekárskych kvasníc v 1 °Bg melasovej pôde a s 1 % inokula. Inokulum sme si napestovali pomnožením konzervy čistej kultúry. Trepačková kultivácia prebiehala pri 30 °C 16 hodín. Potom boli kvasinky odseparované, premyté a stanovená u nich sedimentácia. Ukázalo sa, že zo skúmaných 34 mikroorganizmov 16 spôsobovalo aglutináciu (t. j. 47 %). Pre ďalšie pokusy sme používali už iba týchto 16 mikroorganizmov.

Predpokladali sme, že aglutinačný účinok infekčných mikroorganizmov by mohol spočívať v niekoľkých faktoroch:

1. Je aglutinovaný samotný infekčný mikroorganizmus. Za predpokladu jeho dobrého pomnoženia

v melasových pôdach môže sa v našich sedimentačných skúškach prejavíť svojím sedimentom, prípadne sediment narastá tým, že aglutinovaný infekčný organizmus strháva so sebou normálne kvasinky zo suspenzie.

2. Infekčný organizmus môže na kvasinky pôsobiť aglutinačne napr. tým, že má iné povrchové vlastnosti (znamienko náboja) a výsledná aglutinácia je dôsledok jeho prítomnosti v suspenzii kvasiniek.

3. Infekčný organizmus má také metabolické vlastnosti, že produkuje do pôdy látky, ktoré pôsobia na normálne kvasinky aglutinačne (napr. organické kyseliny a pod.).

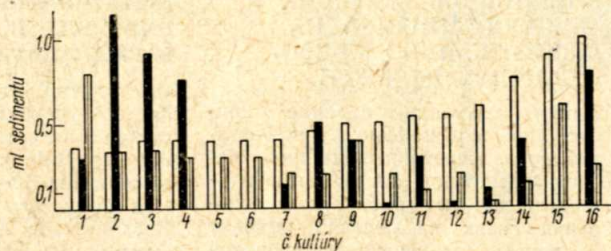
Možností pôsobenia by bolo viac. My sme sa zamerali na vysvetlenie týchto.

Infekčné organizmy boli pomnožené najprv vo Freudenreichových fľaškách na sladínovej pôde, potom na 6°Bg melasovej pôde a nakoniec na 1°Bg melasovej pôde na trepačke. Analogickým spôsobom si pripravujeme inokulum normálnych kvasiniek z čistej kultúry pre trepačkové pokusy. Odseparované a premyté organizmy boli potom suspendované vo fosfátovom pufre a meraná ich sedimentácia. Treba poznamenať, že vyššie uvedený spôsob pomnoženia buniek nevyhovoval trom typom bakteriálnej infekcie, preto tieto vzorky neboli zaradené do meraní sedimentácie. Tým však, že za podmienok pomnožovania kvasiniek nevyrástli, samotné vylúčili možnosť vlastného značného pomnoženia a pôsobenia na kvasinky tak, ako je uvedené pod bodom 1.

Zo skúmaných 13 organizmov malo po 30 minútach merania 7 sedimentáciu vyššiu ako 0,3 ml (z 10 ml 10 % suspenzie), čo pre kvasinky považujeme za rozhranie medzi aglutinovanými a neaglutinovanými. 3 vzorky z toho boli na rozhraní, t. j. vytvárali medzi 0,3 až 0,5 ml sedimentu (23 %) a 4 boli slabšie aglutinované (30,8 %).

Supernatant z 1°Bg pôdy, v ktorej boli nakoniec pomnožené infekčné organizmy, sa zachytával a použil na pokus s vyjasnením úlohy produktov metabolismu infekčných mikroorganizmov pre vznik aglutinácie. Pokus bol usporiadaný nasledovne: Boli pripravené 2°Bg melasové pôdy a riedené 1:1 záparami, v ktorých vyrástli infekčné organizmy. pH bolo upravené na 4,5 a pôdy sa sterilizovali parou. Potom boli naočkované 1 % inokula trenčianskeho droždia, pomnoženého z konzervy. Po 16hodinovej trepačkovej kultivácii pri 30 °C boli kvasinky odseparované, premyté a stanovená u nich sedimentácia. Aglutinácia sa objavila celkovo u 5 vzoriek, z toho 3 boli na rozhraní a 2 stredne aglutinujúce. Výsledky sú zachytené na obr. 4.

Z našich pokusov teda vyplýva, že infekčné mikroorganizmy môžu spôsobovať aglutináciu. Naše predpoklady sa vcelku potvrdili a bolo by azda vhodné aj na staršie výsledky pozeráť z tohto hľadiska a vo výrobe tento faktor nezanedbávať. Z nášho malého súboru 34 izolovaných typov infekčných organizmov po celkovom vyhodnotení spôsobovalo aglutináciu 17,6 %, výsledky na rozhraní dávalo 29,4 % a 53 % bolo neaglutinujúcich.



Obr. 4. Vplyv infekčných mikroorganizmov na aglutináciu kvasníc. Prázdné stĺpce udávajú výšku sedimentu kvasníc, kultivovaných s jednotlivými inf. organizmami. Plné stĺpce udávajú vlastnú sedimentáciu namnožených jednotlivých infekčných mikroorganizmov, čiarkované stĺpce udávajú výšku sedimentu kvasníc, pestovaných v pôde s polovičným objemom záparu po kultivácii infekčných mikroorganizmov. Výška sedimentu je odčítaná po 30 min vo fosfátovom pufri

Predpokladáme, že štúdie o vplyve infekčných organizmov na aglutináciu by boli oveľa zaujímavejšie a úplnejšie, keby sme ich boli mohli doložiť výsledkami sledovania pohyblivosti buniek a počítaním ich náboja. V našich málo úspešných pokusoch sledovania pohyblivosti sme napr. zistili, že *Torulopsis utilis*, pestovaná za podobných podmienok ako trenčianske kvasinky, sa pri pH 4,5 pohybovala v elektrickom poli na opačnú stranu ako trenčianske kvasnice. Podobné výsledky pre pH 5,5 sme získali s neidentifikovaným infekčným organizmom (spomínanou torulou s dvomi svetloložnými telieskami), izolovaným z trenčianskeho droždia.

Súhrn

Autori sledovali vplyv infekčných mikroorganizmov izolovaných z predajných kvasníc na aglutináciu. Štatisticky hodnotené percento výskytu infekčných mikroorganizmov je preukazne nižšie u neaglutinovaných kvasníc ako u aglutinovaných. Z výsledkov pokusov sa usudzuje, že aglutinačný vplyv infekčných organizmov môže spočívať alebo v tom, že infekčný organizmus je samotný aglutinovaný a pri sedimentácii strháva i kvasinky zo suspenzie, ďalej v tom, že infekčný organizmus priamo svojou prítomnosťou pôsobí aglutinačne, napr. tým, že za rovnakých vonkajších podmienok prostredia má náboj opačného znamienka, alebo tým, že produkuje do pôdy metabolity, ktoré spôsobujú aglutináciu (čo môžu byť napr. organické kyseliny a pod.).

V článku sa diskutuje o termíne „infekčný organizmus“ vo fermentačnej výrobe. Autori považovali za infekciu všetko, čo sa morfológicky pod mikroskopom alebo tvarom a vzhľadom kolónie líšilo od základného kmeňového materiálu. Na základe výsledkov autori usudzujú, že infekcia môže zohrať pri vzniku aglutinácie vážnu úlohu, ale v inom zmysle, ako sa to vysvetľovalo doteraz.

Literature

- [1] Malkow, A.: Parasitenk. u. Infekt. = „Zbl. f. Bakt.“, 90, 1934 : 212–17.
- [2] Sedlářová, L.: Nepublikované výsledky, 1962.

Došlo do redakcie 12. 4. 1965,

**ВЛИЯНИЕ ЗАРАЖАЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ НА
АГГЛЮТИНАЦИЮ ХЛЕБО-
ПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ**

Авторы изучали влияние присутствия заражающих микроорганизмов изолированных из проб хлебопекарных дрожжей на агглютинацию дрожжевых грибов и на основании своих наблюдений выводят заключение, что заражение дрожжей имеет значительное влияние на агглютинацию, сущность его влияния однако авторы объясняют несколько иначе чем преобладающие в настоящее время теории.

**INFEKTIONSMIKROORGANISMEN
UND AGGLUTINATION BEI DER
BACKHEFEFABRIKATION**

Die Autoren verfolgten den Einfluss der aus verkäuflicher Backhefe isolierten Infektionsmikroorganismen auf die Hefeagglutination und kamen zu der Einsicht, dass die Infektion zwar einen bedeutenden Einfluss auf die Agglutinationsbildung aussübt, jedoch in einer ziemlich anderen Richtung, als wie man es bisher erklärte.

**INTERPENDENCE BETWEEN THE
PRESENCE OF CONTAMINATING
MICROORGANISMS AND AGGLUTI-
NATION OF BAKERY YEAST**

The authors describe the results of their research works on the effect microorganisms present in bakery yeast have upon its agglutination. In their experiments they isolated contaminating microorganisms from bakery yeast taken from shops. It is true that the presence of contaminating microorganisms contributes to agglutination, but the mechanism of the interdependence and character of influence are rather different from what has till now been accepted as a satisfactory explanation.