

Infekce při lihovém kvašení melasových zápar

OLDŘICH ŽVÁČEK, JIŘÍ BARTA, JAROSLAV VINTIKA

Výzkumný ústav kvasného průmyslu, Praha

663.541.22:664.151.2

Problémem kontaminace při lihovém kvašení se dosud zabývalo málo autorů. Jsou to většinou starší práce na př. Henneberga [1] a Lindnera [3]. Z našich autorů se tímto problémem zabývají Hulač [3] a Dyr [4]. Orla Jensen [5] se mléčnými bakteriemi zabývá velmi podrobně, avšak jeho práce nemá přes značnou obsáhlou k melasovému lihovarství přímý vztah.

Soustavným studiem infekce se zabýváme od r. 1952 ve Výzkumném ústavu kvasného průmyslu. Isolovali jsme četné hrubé kultury nejen přímo z kvasicích a prokvašených melasových zápar v různých průmyslových lihovarech, ale také z melas různého původu a z laboratorních kvasných zkoušek. Při těchto isolacích byly současně sledovány závislosti k průběhu kvašení a k technologickému postupu.

Možnosti infekce jsou dány technologickými postupy. V současné době pracuje většina závodů vratnou separaci kvasinek podle Boinota, která má tyto výhody:

- rychlý průběh kvašení,
- start kvašení v silně kyselém prostředí,
- odstraňování specificky lehčích mrtvých buněk a bakteriální infekce,
- kyselou lázeň za použití kyseliny sirové (event. solné) nebo směsi. Zde zůstává zředěný centrifugát při pH 1,8–2,2 po dvě až tři hodiny stát, čímž se určité množství infikujících bakterií, snášejících hůře kyselé prostředí než kvasinky bud usmrtí, nebo se jejich virulence podstatně sníží.

Při vratné separaci nastávají obtíže teprve tehdy, je-li silně infikovan provoz; je to nejčastěji vlivem bakteriální aglutinace kvasinek. Tyto obtíže je třeba zpravidla řešit výměnou násadních kvasinek, čímž se opět naruší normální chod kvasinky. Některé typy infekce mohou být příčinou vyšší spotřeby kyseliny v lázni. Obvykle se setkáváme se stejnými typy bakterii, a to heterofermentativními

Lactobacilly, které jsou značně variabilní a jejichž metabolismus je ovlivňován na př. teplotou, složením melasy, záparu a pod. Původ infekčních bakterií je přímo v melase. Vliv vzduchu, vody a pomocných surovin je druhořadý. Jiné druhy, které by se při lihovém kvašení mohly uplatnit, jako např. Clostridium, Acetobacter, Leuconostoc atd. jsou vzácné. Ostatní bakterie, které sice můžeme z melas i kvasicích zápar isolovat (na př. na půdách masopeptonových), jsou ve stavu latentním, nemnoží se, a při kvasném procesu nezpůsobují tedy ztráty.

Abychom zjistili, o jaké druhy kontaminujících Lactobacillů jde, a abychom objasnili jejich fyziologické vlastnosti, provedli jsme důkladný průzkum získaných isolátů [6, 7].

Metodika

Hrubé kultury jsme isolovali obvyklou zřeďovací metodikou na Petriho miskách na půdě tohoto složení: melasová sladinka 14–16 °Bg (nečeřená) 1000 ml, sladové klíčky (výluh ve 100 ml) 5 g, riboflavin 0,05 g, CaCO₃ 30 g, agar 20 g, kultivováno při 30 °C.

Cisté kultury byly isolovány na půdě, složené ze 20 g sacharosy, 5 g glukosy, 15 g peptonu, 200 ml kvasničného autolysátu (1 : 1), 1 g KH₂PO₄, 2 g NaCl, 1 g MgSO₄, 0,05 g FeCl₃, 1 g citranu sodného, 1 ml roztoku bromkresolového purpuru (podle Salleho), 20 g agaru a do 1000 ml voda. Ke kultivaci se jako velmi vhodný substrát osvědčila též invertovaná melasová zápara 6 °Bg s přídavkem autolysátu (9 : 1).

Zkvašování různých cukrů, vytváření kyselin a plynů

Zkoušky byly konány na základních substrátech tohoto složení: Kvasničná voda 10 % (nebo hydrolysát kaseinu podle Orla-Jensena a autolysát též podle O.-Jensena), zkoušený cukr 1 %, bromkresolový purpur (podle Salleho) 0,1 %. Na téže půdě byl připravován zákvas, který byl kultivován při

30 °C. Zkumavky byly plněny 10 ml substrátu a substrát zakvašován 0,1 ml inkubovaného zákvasu. Růst byl sledován 7 až 14 dní při teplotě 30 °C. Po- sitivní růst a vytváření kyselin se projevilo změnou barvy indikátoru.

Tvorba plynu se sledovala souběžně se zkvašováním různých cukrů za použití Durhamových plynovek.

Kromě těchto zkoušek byly prováděny ještě další, jako na př. redukce nitrátů, ztekucování želatiny, růst na mléku, Levinově agaru, barvení podle Gramma, stanovení kyseliny mléčné metodou Friedeman-Graeserovou, ethylalkoholu pyknometricky, kyse- liny octové destilací vodní parou, kyseliny propio- nové a máselné chromatograficky a odkvášení cukrů rovněž chromatograficky.

Výsledky

a) Isolované druhy a jejich vlastnosti

Lactobacillus buchnerii (Henneberg) Bergey je nejčastější typ infekce v kvasicích záparách i v melasách. Je to značně variabilní druh. Vyznačuje se zkvašováním arabinosy, glukosy, galaktosy, sacharosy, laktosy, maltosy a rafinosy. Některé typy zkvašují volněji sacharosu a rafinosu. Mikroskopicky na tekutých substrátech se jeví jako jednotlivé tyčinky dlouhé 2—4 μ ve dvojicích, místy s řetízkovými útvary a s tyčinkami dlouhými až 7 μ . Jsou grampositivní.

Lactobacillus brevis (Orla-Jensen) Bergey je méně častý typ infekce, mikroskopicky podobný *L. buchnerii*, nezkvašující laktosu a obtížněji rafinosu. Roste v zákalu a nezpůsobuje aglutinaci. Za aerobních podmínek roste velmi špatně — mikro-aerofilní typ. Je gramvariabilní.

Lactobacillus vermiciformis (Ward) je dost častý druh infekce, isolovaný často ve smíšených kultu- rách s *Lactobacillus buchnerii*. Vytváří slizovité silně aerobně rostoucí kolonie. Jednotlivé buňky jsou 3,6 až 5 μ dlouhé a často tvoří řetízky dlouhé až 54 μ . Zkvašuje velmi dobře veškeré zkoušené cukry, (viz u *L. buchnerii*). Je grampositivní.

Lactobacillus sp. (kmen 11 p)

Velmi řidce isolovaný typ, který patří mezi homofermentativní *Lactobacilly* (nevytváří CO₂, těkavé kyseliny a alkohol). Je zajímavý intenzivním zkvašováním nejen veškerých zkoušených cukrů (viz u *L. buchnerii*), nýbrž i škrobu za velmi silné produkce kyseliny mléčné. Tvoří aerobně špatně rostoucí nízké ploché kolonie na tekutých substrátech. Jsou to tenké tyčinky dlouhé 3,6 až 5,4 μ , často v nífovitéch formách dlouhých až 68 μ . Při 37 °C rostou lépe než při 28 °C, při 50 °C již nerostou. Je to typ gramvariabilní, který se dosud nepodařilo přesně determinovat. Od *L. delbrückii* se liší zkvašováním arabinosy a škrobu, od *L. thermophilus* nízkým tepelným optimem.

Dále bylo isolováno ještě několik podobných, ve- směs intermediárních kmenů; výsledky těchto po- kusů nejsou dosud zpracovány.

b) Fysiologické vlastnosti isolovaných kmenů

Byly zkoumány metabolity jednotlivých druhů a zjištěno u heterofermentativních typů a jejich směsi (*L. buchnerii*, *brevis* a *vermiciformis*) na melasovém substrátu s obsahem cukru 4,66 %: tvorba 1,2 až 1,5 % kyseliny mléčné, 0,5—1 % kyseliny octové a 0,13—0,26 % alkoholu. U homofermentativního kme- ne byla zjištěna tvorba 2,20 % kyseliny mléčné při negativním obsahu kyseliny octové a alkoholu.

Při kvasných zkouškách na melasových substrá- tech obohacených 0,25 % rafinosy s čistými kmeny lihovarských infekcí, čistými kulturami kvasinek a se směsnými kulturami jednotlivých kmenů bak- terií s lihovarskou kvasinkou byl sledován chro- matograficky průběh kvašení. U čisté kultury kva- sinek bylo zjištěno, že zůstává jako „zbytkový cukr“ melibiosa. U čistých kultur heterofermenta- tivních bakterií *L. buchnerii* a *L. vermiciformis* byla přednostně zkvašována glukosa a fruktosa. Sacha- rosa a rafinosa byly sice zkvašovány, ale volněji. Rafinosa není při zkvašování štěpena tak, jako je to u kvasinek. *L. brevis* zkvašuje sacharosu rych- leji a rafinosa neubývá. U smíšených kultur byl ke konci kvašení zaznamenán nulový zbytkový cukr. Melibiosa je tedy velmi dobře prokvašována.

Závěr

Mikroorganismy způsobující kontaminaci kvasi- cích melasových lihovarských zápar náleží do rodu *Lactobacillus*, při čemž heterofermentativní typy se uplatňují zvláště druhem *Lactobacillus buchnerii*, který způsobuje silnou aglutinaci kvasinek.

Většina isolovaných typů zkvašuje z cukrů při- tomných v melasových záparách přednostně glu- kosu a fruktosu před sacharosou a rafinosou. Je tedy inverse sacharosy kvasinkami příznivá pro metabolismus *Lactobacillů*.

Melibiosa je zkvašována intensivně. Ve smíše- ných kulturách s kvasinkami může být ve zkva- šených melasových záparách dosaženo „nulového zbytkového cukru“. Proto není nízký „zbytkový cukr“ objektivním ukazatelem správného kvašení, neprovádí-li se současně mikrobiologická kontrola.

Všechny heterofermentativní *Lactobacilly* potře- bují ke svému rozvoji vhodný organický dusíkatý zdroj a dusíkaté látky uvolňované kvasinkami (od- umírání, plasmolyza, metabolismus atd.) jsou zvláště vhodné. Rovněž melasa má vhodné zdroje dusíku pro *Lactobacilly*.

Spontánní infekce *Lactobacillů* v lihovarském provozu známená kromě závad při odstřeďování, kyselé lázni, destilaci atd. značné ztráty na cukru. Obsah kyseliny mléčné v prokvašené zápaře činil podle našeho zjištění v jednom našem závodě pře- chodně až 1,6 %.

L iteratur a

- [1] HENNEBERG W.: Handbuch der Gärungsbakteriologie, Bd I-II Berlin 1926
- [2] LIDNER P.: Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsge- werben, Berlin 1909
- [3] HULÁČ V.: Mikrobiologická kontrola průmyslových kvašení, Praha 1952
- [4] DYR JOS. A KOLEKTIV: Lihovarství I, Praha 1956
- [5] ORLA JENSEN S.: The Lactic Acid Bacteria, Copenhagen 1942, 1943