

Nový způsob boje proti kontaminaci při lihovém kvašení melasy

JIŘÍ BARTA, OLDŘICH ŽVÁČEK,
Výzkumný ústav kvasného průmyslu, Praha

V melasovém lihovarství se problém kontaminace dosud důkladně nesledoval. Teprve při zavádění kontinuálních pochodů kvašení vynikl obzvlášť do popředí. Infekci se při lihovém kvašení, kromě dodržování mikrobiologických zásad až dosud zabraňovalo takto:

1. důsledným dodržováním čistoty mytím a čištěním kvasných kádí, potrubí apod.,
2. desinfekcí kvasných zařízení (kádě, potrubí apod.), pařením a běžnými antiseptiky (chlorovým vápnem, kyselou karbolovou, chloraminem, formalinem, fluoridem, různými kvarterními básemi atd.),
3. zvyšováním acidity minerálními nebo organickými kyselinami,
4. dávkováním různých antiseptik, např. pentachlorofenolátů, fenolu, kresolu, chloraminu, solí rtuti, mědi, zinku apod. do zpracovávaných surovin (melasa). Ojedinele se takto zasahovalo do kvasících zápar.

V laboratorním měřítku se zkoušela antibiotika. Haas (1955) zkouší různá antibiotika v pivovarství, Dal J. a Cinq C. (1948) ve vinařství a Vintika, Barta a Žváček (1957) v lihovarství. Použití antibiotik se však v současné době nejví jako výhledové pro jejich vysokou cenu. Jiné způsoby čelení infekci v melasovém lihovarství se nepodařilo z literatury zjistit.

Veškeré, až dosud v praxi používané prostředky, nebyly jednoznačné a v kontinuálních procesech zdaleka nedostačovaly. Jednou z hlavních příčin těchto nedostatků byla malá znalost původců infekce. Studium životních pochodů kontaminujících mikroorganismů a vztahy ke kvasinkám, pokud je nám známo se rovněž nesledovaly. V našich dřívějších pracích (Žváček, Barta, Vintika (1957, 1958) jsme prokázali, že hlavními původci kontaminace jsou bakterie rodu *Lactobacillus*, např. *L. buchneri*, *brevis*, *vermiformis* a *plantarum*. Jejich rozvoj závisí na přítomnosti kvasinek. Zjistili jsme, že hlavním nositelem *Lactobacillů* je melasa, dále pak staré zbytky melasové, zápary (v potrubí, vzorkovacích kohoutech atd.); velmi málo zárodků bylo zjištěno ve vzduchu. Zajímavé bylo, že proti jiným bakteriím se v melase vyskytovalo poměrně málo zárodků *Lactobacillů*. Během kvasného procesu se však *Lactobacilly* silně rozmáhaly a převládly. Tak např. v původních melasách bylo v 1 g 20 000 až 100 000 zárodků bakterií rodu *Lactobacillus*, ale již ve středně infikované prokvašené melasové zápaře (tj. čtyřnásobně ředěné) 2 až 3 milióny a ve velmi silně infikované až 10 miliónů zárodků v 1 ml. Ostatní zárodky původně v melase zjištěné (např. typy *Coli-aerogenes*) se vůbec neuplatnily. Bakterie skupiny *Coli aerogenes* se neuplatní jako infekce pro nepříznivé pH a obsah alkoholu.

Podle veškerých známek je kvasící melasová zápara dobrým prostředím pro rozvoj infekčních *Lactobacillů*. Již při výběru živných půd pro kultivaci *Lactobacillů* se zjistilo, že pouhé melasové zápary, byť i bohatě dotované minerálními živinami, jsou méně vhodné než zápary s kvasničnou vodou nebo autolysátem. Lze proto předpokládat, že dusíkaté a vitaminové látky uvolňované z kvasinek budou prvořadými růstovými faktory pro bakterie rodu *Lactobacillus*. Rozvoji bakterií je příznivá i inverze sacharosy v jednodušší cukry způsobovaná kvasinkami.

Je známo, že v buněčné hmotě kvasinek je přítomna řada vitaminů komplexu B (thiamin, riboflavin, kyselina panthotenová, kyselina listová, kyselina nikotinová atd.), z nichž většina jsou růstové faktory pro bakterie rodu

Lactobacillus. Podle prací autorů (Meyerhof, Ohlmayer 1957) jsou tyto vitaminy přítomny v kvasinkách jako fosfo-bilkořinné komplexy nebo kombinované formy mono či dinukleoproteinů. Tyto formy jsou potom skutečnými růstovými látkami pro *Lactobacilly* (Snell, Wright 1941, Snell, Peterson 1940, Snell, Strong 1937, 1938, 1939, Rosenberg 1943). Do kvasící zápary přecházejí potom při odumírání buněk, plasmolysou nebo jako přímé metabolity.

V naší práci jsme zvolili novou cestu boje proti infekci, a to na základě blokování růstových látek pro bakterie nezbytných. Jako látku blokuřící rozpustný bilkořinný komplex jsme použili formaldehyd. V řadě kvasných pokusů jsme prověřovali jeho funkce nikoli jako antiseptika, ale jako agens porušujícího *Lactobacillům* vhodné růstové látky z oblasti rozpustných bilkořin. V dalších pokusech jsme se snažili přímo znehodnotovat některé vitaminy produkované kvasinkami.

Metodika

1. Pokusy s jednorázovým kvašením

Nečeřená melasová zápara 12,38 Bg se okyselila kyselinou sírovou na pH 6,0. Přidal se v různých množstvích kvasničný autolysát připravený normálním tepelným způsobem. 40%ní formalin se přidával na zvolenou koncentraci. Plnilo se do Erlenmayerových baněk v množství 250 ml. Sterilovalo se frakcionálně 3× v parním sterilátoru po 30 minut.

Zakvařovalo se provozní sovětskou rasou kvasinek (*Ja*) a směsnou kulturou kontaminujících *Lactobacillů* (*L. buchneri*, *vermiformis* a *plantarum*), které se nejčastěji v provozu vyskytovaly. Mikroorganismy se předkultivovaly na tekutých melasových substrátech. Zakvasilo se 25 ml kultury do 250 ml media. Doba kvašení byla 3 dny při teplotě 30 °C.

2. Pokusy s kvašením s odběry

Použito nesterilní melasové zápary 12,1 až 12,4 °Bg pH upraveno kyselinou sírovou na 5,8. Plnilo se do 2 l Erlenmayerových baněk po 1000 ml, zakvařovalo 25 ml 4 dny staré kvasničné kultury, pomnožené na sterilním melasovém substrátu a 25 ml 5 dní staré směsné kultury *Lactobacillů* (*L. buchneri*, *vermiformis* a *plantarum*) pomnožené rovněž na melasovém substrátu s 1 % kvasničného autolysátu. Ponechalo se 24 až 48 hodin kvasit při teplotě 30 °C. Po této době odebráno 500 ml čerstvě připravené melasové zápary, což se potom vždy po uvedené době opakovalo. Použilo-li se formalinu, dával se v příslušné koncentraci vždy s přítokem čerstvé zápary. Odebraný vzorek se běžnými metodami mikrobiologicky a analyticky zhodnotil (hustota zásevu, fyziologický stav, počet buněk barvitelných methylenovou modří, poměr kvasinek k infekci, sacharidace, cukr a acidita).

3. Kvasné zkoušky s přidavkem ferrikyanidu sodného

Použita melasová zápara 12,0 °Bg, pH upraveno kyselinou sírovou na 6,0, přidáno 2,5 % kvasničného autolysátu, plněno do Erlenmayerových baněk po 250 ml. Sterilovalo se frakcionálně 3× v parním sterilátoru 30 minut.

Ferrikyanid sodný se přidával ve sterilním roztoku na příslušnou koncentraci pro sterilaci půdy. Zakvašovalo se směsnou kulturou kvasinek *Lactobacillů* (viz ad 2) v poměru 1 : 10. Kvašení trvalo 4 dny při teplotě 30°C. Sledoval se mikroskopický obraz, sacharisace a acidita.

4. Kvasné pokusy v kontinuitě

K pokusům jsme použili pětičlenné aparatury s vzájemně propojenými jednotlivými členy vždy ode dna nahoru. Užitečný obsah jednoho členu byl 850 ml. Nestabilní melasová zápara měla 12 až 12,2 °Bg, pH 5,8 až 6,0

s 0,012 % 40%ního formalinu; přitékala kontinuálně z 5000 ml zásobní nádoby do prvního členu systému. Denně jsme zpracovali 4000 až 5500 ml zápary. Po naplnění všech členů záparou se rozkvašovalo kulturou kvasinky (rasa JA) pomnožené na melasovém substrátu v poměru 1 : 10. Po rozkvašení se přikvašovalo vždy po 24 hodinách do prvního členu 150 ml kvasničné sedliny (h-8 až 9 °Bg) z 1 l melasového substrátu 12 °Bg a 25 ml směsné kultury *Lactobacillů*. Kvašení probíhalo při teplotě 30°C. V průběhu kvašení se do každého členu řízeně přidával na danou koncentraci formalin (40%ní) a ferrikyanid sodný. Denně se sledoval mikroskopický obraz sacharisace a acidita.

Experimentální část

Inaktivace formalinu kvasničným autolysátem ve vztahu k čistě kultuře kvasinek a ke směsné kultuře *Lactobacillů*

| Melas. zápara 12 °Bg | | Čistá kultura kvasinky | | | Směsná kultura <i>Lactobacillů</i> | | |
|----------------------|-----------------|--|------------------------------|-----------------|--|-----------------|---------------|
| kvas. autolys. v % | formaldehyd v % | mikroskopický obraz po 3 dnech | intenzita kvašení po 3 dnech | zbytk. cukr v % | mikroskopický obraz | acidita | |
| | | | | | | počátek ml/20ml | konec ml/20ml |
| 0,25 | — | velmi silný zásev, buňky ojedinele pučí. Fysiol. stav velmi dobrý | prokvašeno | 0,38 | velmi silný zásev tyčinek různých forem a krátkých řetízků | 0,5 | 2,18 |
| 0,25 | 0,02 | velmi silný zásev, buňky ojedinele pučí. Fysiol. stav velmi dobrý; plasma buněk jasnější | prokvašeno | | infekce se nepomnožila, pouze původní zásev | 0,5 | 0,46 |
| 0,25 | 0,05 | zásev původně vnesených kvasinek — silné vyzrnutí | | 7,00 | infekce se nepomnožila, pouze původní zásev | 0,5 | 0,40 |
| 0,25 | 0,1 | zásev původně vnesených kvasinek — silné vyzrnutí | | 7,05 | infekce se nepomnožila, pouze původní zásev | 0,5 | 0,40 |
| 2,5 | — | velmi silný zásev buněk dobrého fyziolog. stavu | prokvašeno | 0,40 | velmi silný zásev tyčinek všech forem a místy i dlouhé řetízky | 0,40 | 2,80 |
| 2,5 | 0,02 | velmi silný zásev buněk dobrého fyziolog. stavu plasma jasnější | prokvašeno | 0,40 | slabé pomnož. střed. tyč. proti původně vneseným buňkám | 0,40 | 0,88 |
| 2,5 | 0,05 | zásev původně vnesených buněk | | 7,01 | bakterie se nepomnožily | 0,40 | 0,41 |
| 2,5 | 0,1 | zásev původně vnesených buněk | | 7,01 | bakterie se nepomnožily | 0,40 | 0,41 |
| 5,— | — | velmi silný zásev buněk dobrého fyziolog. stavu | prokvašeno | 0,40 | velmi silný zásev tyčinek všech forem, místy dlouhé nitovité buňky a řetízky | 0,35 | 3,27 |
| 5 | 0,02 | velmi silný zásev buněk dobrého fyziol. stavu plasma jasnější | prokvašeno | 0,39 | střední zásev tyčinek různých forem | 0,35 | 1,05 |
| 5 | 0,05 | silný zásev pučících buněk, silnější vakuolisovaných | prokvašeno | 0,85 | velmi slabé pomnožení bakterií; převaha tyčinek středních forem | 0,35 | 0,55 |
| 5 | 0,1 | zásev původně vnesených buněk | | 7,02 | infekce se nepomnožila | 0,35 | 0,42 |
| — | — | velmi silný zásev buněk s mírně vyzrnutou plasmou | prokvašeno | 0,41 | silný až velmi silný zásev většinou středních tyčinek | 0,20 | 1,73 |

* Redukující látky.

Tabulka 1

1. Inaktivace formalinu kvasničným autolysátem ve vztahu k lihovému kvašení a k *Lactobacillům* v jednorázovém kvašení

K melasové zápare se 7,40 % cukru se přidávalo různé množství kvasničného autolysátu a různé množství formalinu (40%ní). Zakvašovalo se směsnou kulturou *Lactobacillů* a pro kontrolu čistou kulturou kvasinky rasy JA (popis v metodice). U čisté kultury kvasinek jsme sledo-

vali mikroskopický obraz, intenzitu kvašení a zbytkový cukr, u kontaminujících bakterií, mikroskopický obraz a acidita vyjadřující intenzitu pomnožení bakterií a jejich metabolismus. Výsledky zkoušek jsou v tab. 1.

Zhodnocení výsledků z tab. 1.

Je patrný vliv přidávaného autolysátu na účinnost formaldehydu. U kultury kvasinek se prokázalo, že dávka 0,05 % formalinu a koncentrace 0,25 až 2,5 % autolysátu

Vliv formalinu na směšnou kulturu *Lactobacillů*

| Přídavek 40% formalinu v % | Charakter kvašení po 3 dnech | | |
|--|--|----------------------------|----------|
| | Mikroskopický obraz | acidita v ml 1,0 N NaOH/20 | cukr v % |
| — | zásev kvasinek velmi silný, ale silná aglutinace a 25% buněk barvitelných methylenovou modří; infekce velmi silná | 2,72 | 0,22 |
| 0,0012 | zásev kvasinek velmi silný, ale silná aglutinace a 25% buněk barvitelných methylenovou modří; infekce velmi silná | 2,53 | 0,15 |
| 0,0025 | zásev kvasinek velmi silný, ale silná aglutinace a 25% buněk barvitelných methylenovou modří; infekce velmi silná | 2,30 | 0,30 |
| 0,012 | zásev kvasinek velmi silný, plasma mírně zrnitá, aglutinace, Ø 3–5 % buněk barvitelných methylenovou modří; infekce se nepomnožila | 0,84 | 0,25 |
| 0,025 | zásev kvasinek velmi silný, plasma mírně zrnitá, aglutinace, Ø 3–5 % buněk barvitelných methylenovou modří; infekce se nepomnožila | 0,82 | 0,25 |
| I. kontrola Čistá kult. kvas. | zásev kvasinek velmi silný; plasma dispersní, 3 až 5% buněk barvitelných methylenovou modří | 0,82 | 0,25 |
| II. kontrola směs. kult. <i>Lactobacillů</i> | velmi silný zásev tyčinek, ponějvíce středních forem | 1,85 | — |

Tabulka 2

kvašení zcela brzdí. Při stejné dávce formalinu a zvýšené koncentraci autolysátu 5 % je kvašení téměř normální. U směšné kultury *Lactobacillů* lze pozorovat rapidní vzestup acidity v souladu se zvyšujícím se množstvím autolysátu. Při stejné koncentraci formalinu 0,02 % a zvyšujícím se množstvím autolysátu vzrůstalo množství buněk a tím i acidita. Důkazem účinných růstových látek v autolysátu je srovnání s kontrolou, kde acidita byla 1,73 ml 1,0 N NaOH 20 ml, avšak s přídavkem 5 % autolysátu činila 3,27 %. Formalin se jeví účinnější vůči kontaminujícím bakteriím než vůči kvasinkám, a to ve velmi malých koncentracích. Při uvážení všech okolností je formalin látkou reagující s dusíkatými látkami nezbytnými pro růst bakterií.

2. Vliv formalinu na směšnou kulturu kvasinek a *Lactobacillů* v jednorázovém kvašení

Vliv formalinu na kulturu kvasinek a *Lactobacillů* v melasové zápare se 7,6 % cukru a aciditou 0,40 ml 1,0 N NaOH/20 ml bez přídavku autolysátu jsme ověřili řadou pokusů (viz tab. 2).

Sledovali jsme zbytkový cukr, aciditu a mikroskopický obraz.

Z výsledků v tab. 2 vyplývá, že přítomnost kvasinek má podstatně vliv na růst i činnost infekčních bakterií. Přídavek 0,0012 až 0,0025 % 40%ního formalinu na množení bakterií vliv nemá. Přídavek 0,012 % formalinu (40%ního) nebrzdí nikterak činnost kvasinek, ale růst bakterií i jejich metabolismus je zastaven. Nutno ovšem podotknout, že uvedené hodnoty platí pro kvašení statické a jednorázové.

Vliv formalinu občasně přidávaného při kvašení s odběry (Směšná kultura kvasinka — *Lactobacilly*)

| Den | Mikroskopický obraz | Přídavek formalinu % | Sacharidace %Bg | Cukr % | Acidita ml 1,0 N NaOH/20 ml |
|-----------------|--|----------------------|-----------------|--------|-----------------------------|
| 0 start kvašení | zásev kvasinek i infekce vnesené v poměru 1:1 | — | 12,3 | 7,7 | 0,30 |
| 1 | zásev kvasinek velmi silný, fyziologický stav dobrý; infekce v mezích | — | 7,5 | 2,6 | 0,70 |
| 2 | zásev kvasinek velmi silný, ale asi 20 % buněk barvitelných methylenovou modří; infekce silnější poměr 2:1 | 0,025 | 6,2 | 0,75 | 0,94 |
| 4 | zásev velmi silný asi 10 % buněk barvitelných; infekce potlačena | — | 5,0 | 0,45 | 0,62 |
| 6 | zásev kvasinek velmi silný asi 15 % buněk barvitelných; infekce zesílila | — | 4,9 | 0,32 | 0,60 |
| 8 | zvětšení počtu barvitelných buněk (cca 25 %), infekce silná až velmi silná v poměru 1:1 | 0,035 | 5,0 | 0,45 | 0,99 |
| 10 | zásev kvasinek stále velmi silný; barvitelných buněk 10 %; infekce podstatně omezena | 0,025 | 5,1 | 0,45 | 0,61 |
| 12 | zásev kvasinek stále velmi silný; barvitelných buněk 10 %; infekce stále omezena | 0,025 | 4,9 | 0,38 | 0,61 |
| 14 | zásev kvasinek stále velmi silný; barvitelných buněk 5 %; infekce sporadicky | — | 5,0 | 0,42 | 0,58 |

Tabulka 3

3. Vliv formalinu na směšnou kulturu kvasinek a *Lactobacillů* při kvašení s odběry

Při kvašení s odběry nebo kontinuálním kvašení nastává větší, i když posléze konstantní nahromadění metabolitů vzniklých lysis nebo metabolismem kvasinek. K zamezení kontaminace jsme proto předpokládali i vyšší spotřebu formalinu než u kvašení jednorázových. Z vykonaných pokusů s čistými kulturami kvasinek i jejich směsí s *Lactobacilly* uvádíme tři pro dokumentaci. Kvasné pokusy s odběry, jež popisujeme v metodice, probíhaly v objemu 1 l. Prokvašenou záparu jsme odebírali po 24 nebo 48 hod. a nahrazovali jsme jí sterilní čerstvou záparou. Zakvašovali jsme směšnou kulturou kvasinek a *Lactobacillů*. V prvním pokusu jsme přidávali formalin nepravidelně, abychom doložili jeho citlivost na pomnožení infekce. Ve druhém pokusu jsme přidávali formalin již řízeně. Při třetím kontrolním pokusu formalin přidáván nebyl.

Výsledky jsou v tab. 3 až 5.

Zhodnocení výsledků z tab. 3 až 5.

Je patrný význam řízeného přidávání formalinu do kvasného procesu. Přidává-li se formalin nepravidelně, stoupne ihned acidita a pomnoží se infekce. U pokusu, kde se zasahovalo formalinem pravidelně, podařilo se

infekci zcela potlačit bez vlivu na lihové kvašení a konečně prokvasy. Kontrolní pokus (bez formalinu) prokázal jak kontaminující bakterie převládou nad kvasinkami, jaký vliv mají na jejich fyziologický stav a ztráty cukru.

Vliv formalinu řízeně přidávaného při kvašení s odběry (Směsná kultura kvasinka — Lactobacilly)

| Den | Mikroskopický obraz | Přídavek formalinu v % | Sacharóza % | Cukr v % | Acidita ml 1,0 N NaOH/20 ml |
|-----------------|--|------------------------|-------------|----------|-----------------------------|
| 0 start kvašení | vnesený zásev kvasinek a infekce | — | 12,4 | 7,72 | 0,25 |
| 1 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; infekce žádné nebo sporadicky | 0,0125 | 9,0 | 5,35 | 0,66 |
| 2 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; barvitelných buněk 2 až 3 %; infekce žádná | 0,025 | 6,5 | — | 0,72 |
| 3 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení barvitelných buněk 2 až 3 %, bez infekce | 0,024 | 6,0 | 0,52 | 0,54 |
| 4 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení barvitelných buněk 2 až 3 %; bez infekce a aglutinace | — | 5,5 | 0,50 | 0,52 |
| 5 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; barvitelných buněk 2 až 3 %; fyziologický stav kvasinek velmi dobrý; slabší pomnožení infekce | 0,035 | 5,0 | 0,41 | 0,67 |
| 6 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; barvitelných buněk 2 až 3 %; fyziologický stav kvasinek velmi dobrý; infekce ustoupila | 0,025 | 5,1 | — | 0,50 |
| 7 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; barvitelných buněk 2 až 3 %; fyziologický stav kvasinek velmi dobrý; bez aglutinace; infekce velmi jednotlivě | 0,0125 | 5,3 | 0,38 | 0,52 |
| 8 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; barvitelných buněk 2 až 3 %; fyziologický stav kvasinek velmi dobrý; bez infekce | 0,035 | 5,0 | — | 0,62 |
| 9 | velmi silný zásev kvasinek, intenzivní pučení; barvitelných buněk 2 až 3 %; fyziologický stav kvasinek velmi dobrý; bez infekce | 0,025 | 5,0 | 0,35 | 0,60 |
| 10 | fyziologický stav kvasinek velmi dobrý; barvitelných buněk 3 až 5 %; infekce velmi sporadická | 0,025 | 5,0 | 0,35 | 0,54 |

Tabulka 4

Výsledky v tabulkách potvrzují význam látek z kvasinek pro kontaminaci. Tyto látky lze inaktivovat malým množstvím formalinu řízeně přidávaného.

Kvašení s odběry bez přídavků formalinu (Směs kvasinka — Lactobacilly)

| Den | Mikroskopický obraz | Sacharóza % | Cukr v % | Acidita ml 1,0 N NaOH/20 |
|-----------------|---|-------------|----------|--------------------------|
| 0 start kvašení | vnesený zásev kvasinek a infekce | 12,4 | 7,72 | 0,22 |
| 1 | zásev kvasinek velmi silný; fyziologický stav dobrý; infekce se značně pomnožila | 8,0 | — | 1,20 |
| 1 | zhoršený fyziologický stav kvasinek; silná aglutinace; infekce velmi silná | 6,5 | 0,81 | 1,54 |
| 3 | zhoršený fyziologický stav kvasinek; poměr kvasinky k infekci 1 : 2 | 6,8 | 0,52 | 2,22 |
| 4 | zhoršený fyziologický stav kvasinek; asi 35 % buněk barvitelných methylenovou modří. Další pomnožení infekce | 6,5 | — | 2,40 |
| 5 | zhoršený fyziologický stav kvasinek; poměr kvasinek k infekci 1 : 3 | 5,8 | 0,58 | 2,80 |
| 6 | zhoršený fyziologický stav kvasinek; poměr kvasinek k infekci 1 : 3 | 5,8 | 0,51 | 2,60 |
| 7 | zhoršený fyziologický stav kvasinek; zásev kvasinek ubývá | 5,8 | 0,45 | 2,15 |
| 8 | zásev kvasinek slabý, infekce velmi silná | 5,2 | 0,42 | 2,75 |
| 9 | zásev kvasinek slabý, infekce velmi silná | 4,7 | 0,38 | 2,78 |
| 10 | zásev kvasinek slabý, fyziologický stav špatný, silná aglutinace, 25 až 30 % buněk barvitelných; infekce velmi silná (1 : 3 až 1 : 4) | 4,9 | 0,35 | 2,90 |

Tabulka 5

4. Vliv ferrikyanidu sodného na směsnou kulturu kvasinek a Lactobacillů

Abychom doplnili účinek formalinu, zkusili jsme odstranit další růstové látky, především vitaminy. Mléčné bakterie téměř postrádají proteolytické enzymy a proto proteiny nebo aminokyseliny jsou v rozpustné formě nejvhodnějším dusíkatým zdrojem. Podmínkou využití těchto zdrojů je přítomnost některých vitaminů komplexu B a dalších růstových faktorů (Orla, Jensen 1943). Pokusili jsme se různými látkami blokovat komplex vitaminů přecházejících do prostředí, při čemž jsme dbali, abychom kvasinkám neodejmuli růstové látky, na př. biotin.

Zhodnocení tab. 5

Výsledky prokazují, že dávkami 0,005 až 0,01 % ferrikyanidu sodného lze omezit množení a činnost kontaminujících bakterií, ale nikoliv ji zcela potlačit. Proti kontrole bez přídavku je při uvedených dávkách patrné zlepšení fyziologického stavu kvasinek. Koncentrace kolem 0,5 % ferrikyanidu brzdí již podstatně činnost kvasinek, ale koncentrace pod 0,1 % již jejich činnosti nevadily.

5. Pokusy s řízeným přidáváním formalinu a ferrikyaniidu sodného v kontinuálním kvasném procesu

Výsledky pokusů popsaných v předchozích kapitolách a tabulkách jsme ověřili kontinuálními pokusy (viz metodika) s řízeným přidáváním formalinu a ferrikyaniidu sodného. Cyklus každého pokusu byl 10 až 14 dní. V pětičlenném systému byl jednotlivý člen zhodnocován mikrobiologicky a stanovena sacharisace a acidita. V tab. 7 a 8 uvádíme výsledky 2 pokusů a pro stručnost pouze hodnoty z posledního, pátého členu, ze kterého vytékala již prokvašená melasová zápara. U prvního pokusu jsme pro potvrzení výsledků přidávali formalin a ferrikyaniid nepravidelně, u pokusu druhého řízeně.

Zhodnocení tab. 7 a 8

Výsledky v obou tabulkách plně potvrdily naše dřívější závěry. Podle výsledků z tab. 7 vyplývá, že přerušili se přidávek formalinu, pomnoží se vzápětí silně kontaminující bakterie a stoupne acidita. Bakterie se pomnožily již třetího dne a acidita byla velmi vysoká. Přidávky formalinu a ferrikyaniidu se zdařilo kontaminaci v kontinuálním kvasném procesu zcela potlačit a ze systému vyplavit (po př. se v jednotlivých členech usadila). Z tab. 8 vyplývá, že pravidelným a řízeným přidáváním formalinu a ferrikyaniidu lze udržet lihové kvašení i přes vnášené kontaminující bakterie bez jejich dalšího pomnožení, což je shodné s aciditovou prokvašené zápary, vytékající ze systému.

Vliv ferrikyaniidu sodného na směsnou kulturu kvasinka — Lactobacilly

| Přidávek ferrikyaniidu sodného k melas. zá- páře %Bg s 2,5 % auto- lyzátu | Mikroskopický obraz po 4 dnech | Sacharisace | Acidita ml 1,0 N NaOH/20 ml | | |
|---|--|-------------|--------------------------------|------------|------------|
| | | | počáteční | po 2 dnech | po 4 dnech |
| Kontrola | zásev kvasinek střední asi 20 % buněk barvitel- ných; infekce velmi silná | 4,8 | 0,32 | 1,22 | 3,8 |
| 0,001% | zásev kvasinek střední asi 20 % buněk barvitel- ných; infekce velmi silná | 4,5 | 0,32 | 1,19 | 3,75 |
| 0,005% | zásev kvasinek velmi sil- ný; plasma jemně zrnitá; infekce silná až velmi silná | 4,5 | 0,32 | 1,15 | 2,8 |
| 0,01% | zásev kvasinek velmi sil- ný; 10 % buněk barvi- telných methylenovou modří; infekce potlačena | 4,5 | 0,32 | 0,70 | 1,7 |
| 0,1% | zásev kvasinek velmi sil- ný; 10 % buněk barvi- telných methylenovou modří; infekce potlačena | 4,8 | 0,32 | 0,59 | 1,9 |
| 0,5% | velmi slabý zásev kvasi- nek; plasma zrnitá, in- fekce potlačena | 8,0 | 0,32 | 0,52 | 1,0 |

Tabulka 6

Nepravidelně přidávání formalinu a ferrikyaniidu do kontinuálního procesu

| Den | Zpracování melasy v sys- tému za 24 h/ml | Přidávek do systém. | | Mikroskopický obraz | Sacharisace %Bg | Acidita ml 1,0 N NaOH/20 ml |
|-----|--|------------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------------------|
| | | formalin mg | ferrikyaniid mg | | | |
| 1 | 4,000 | — | — | zásev kvasinek vel- mi silný; infekce jednotlivě | 12 | 0,30 |
| 2 | 4,500 | — | — | zásev kvasinek vel- mi silný; infekce se pomnožila; poměr kvasinek k infekci 3 : 1 | 5,5 | 1,3 |
| 3 | 5,250 | 1,200 | — | zásev kvasinek silný, ale asi 15 % buněk barvitelných; infekce velmi silná; poměr kvasinky infekce 1 : 2 | 6,0 | 2,4 |
| 4 | 5,500 | 1,500 | 200 | zásev kvasinek vel- mi silný; podstatný úbytek infekce | 5,0 | 1,7 |
| 5 | 5,000 | — | — | zásev kvasinek vel- mi silný; další ome- zení infekce | 4,8 | 1,5 |
| 6 | 4,800 | — | — | zásev kvasinek vel- mi silný; fyziologic- ký stav dobrý; in- fekce v mezích; poměr kvasinek k infekci 4 : 1 | 4,8 | 1,2 |
| 7 | 5,000 | 1,500 | 150 | zásev kvasinek vel- mi silný; fyziologic- ký stav dobrý; in- fekce zesílila (2 : 1) | 5,5 | 1,9 |

Tabulka 7

| Den | Zpracování melasy v sys- tému za 24 h/ml | Přidávek do systém. | | Mikroskopický obraz | Sacharisace %Bg | Acidita ml 1,0 N NaOH/20 ml |
|-----|--|------------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------------------|
| | | formalin mg | ferrikyaniid mg | | | |
| 8 | 5,300 | — | — | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; ome- zení infekce | 5,2 | 1,2 |
| 9 | 4,500 | 1,500 | 200 | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; vze- stup infekce | 5,2 | 1,8 |
| 10 | 4,500 | — | — | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; in- fekce podstatně po- tlačena | 4,8 | 0,8 |
| 11 | 5,500 | 1,200 | 100 | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; slab- ší vzestup infekce | 5,1 | 1,2 |
| 12 | 5,500 | 1,500 | 250 | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; in- fekce podstatně omezena | 5,0 | 0,80 |
| 13 | 5,300 | 1,200 | 100 | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; in- fekce jednotlivě | 4,8 | 0,75 |
| 14 | 5,000 | — | — | zásev kvasinek vel- mi dobrý; fyziologic- ký stav dobrý; in- fekce jednotlivě | 5,1 | 0,65 |

Řízené přidávání formalinu a ferrikyanidu do kontinuálního procesu

| Den | Zpracování záparu v systému za 24 hod. ml | Přídavek do systému | | Mikroskopický obraz | Sachar. isace °B _x | Acidita ml 1.0 N NaOH/20 ml |
|-----|---|---------------------|----------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| | | formalin mg | ferrikyanid mg | | | |
| 1 | 4,000 | 500 | — | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce vnesená | 12 | 0,32 |
| 2 | 4,500 | 500 | 90 | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce se nepomnožila | 7,5 | 0,50 |
| 3 | 5,000 | 1,500 | 100 | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce se nepomnožila | 5,5 | 0,40 |
| 4 | 5,000 | 1,500 | — | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce se nepomnožila | 5,5 | 0,57 |
| 5 | 5,500 | 1,600 | — | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce se nepomnožila | 5,2 | 0,61 |
| 6 | 5,000 | 1,500 | 200 | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce velmi sporadicky v každém 4. zorném poli 1 zárodek | 5,0 | 0,60 |
| 7 | 5,250 | 1,500 | 100 | | 5,2 | 0,62 |
| 8 | 5,300 | 1,800 | 90 | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; slabší pomnožení infekce | 5,3 | 0,72 |
| 9 | 5,000 | 1,500 | 100 | silný zásev kvasinek, dobrý fyziologický stav; infekce se zmenšila | 5,0 | 0,65 |
| 10 | 4,800 | — | — | velmi silný zásev kvasinek; fyziologický stav velmi dobrý; infekce velmi sporadická | 5,0 | 0,68 |

Tabulka 8

Souhrn

Práce se zabývá způsobem boje proti kontaminaci při lihovém kvašení na zcela nových principech. Nevolí cestu antiseptik nebo antibiotik, ale na základě blokování růstových látek nezbytných pro kontaminaci. Tyto látky představované pravděpodobně složitými komplexy fosfoproteidů, které jsou vázány na vitaminy skupiny B, uvolňují kvasinky během lihového kvašení. Prokazuje se, že intenzivní pomnožování kontaminujících Laktobacillů a jejich zvýšený metabolismus souvisí s uvedenými látkami přítomnými v autolysátu kvasnic i v kvasici melasové zápaře. Lze je zneškodňovat malými množstvími formalinu přidávanými úměrně k jejich vzniku a v průběhu kvašení. Podle výsledků formalin nepůsobí jako antiseptikum. Jeho účinnost lze zesílit přidávkou některých antivitaminů (úspěšná jsou malá množství ferrikyanidu sodného). Zásahy oběma látkami se musí provádět přímo v kvasném procesu. Přiznivé výsledky se potvrdily jak v kvasných zkouškách s odběry, tak i v pokusech kontinuálních.

V kontinuálních pokusech dosaženo zcela kontaminovanou kvasicí záparu během 3 dnů infekce téměř zbavit, aniž byl obsah kvasné baterie měněn. Další kontinuálně probíhající pokus, do kterého byly uštěle přikvašovány kontaminující bakterie, podařilo se udržet bez přírůstků infikujících bakterií řízenými pravidelnými přidávkami formalinu a ferrikyanidu. Výsledky provedených pokusů se prověřují v praxi a podle předběžných zjištění jsou výsledky velmi dobré.

Domníváme se, že nový námi navrhovaný směr boje proti kontaminaci bude významný pro zvládnutí i jiných kontinuálních kvasných pochodů, kde infekce je jednou z hlavních překážek. Pro řešení je však nezbytné důkladně znát původce infekce a jejich vztah ke kulturnímu používanému mikroorganismu.

Literatura

- HAAS G. J.: Wallerstein Lab. Com. New York XVIII (1955) 68
DAL J., CING G.: Antibiotika ve výrobě vína, 1948
VINTIKA J., BARTA J., ŽVÁČEK O.: O úkolech potravinářské mikrobiologie, Sborník VTS 1957.
ŽVÁČEK O., BARTA J., VINTIKA J.: Čs. Mikrobiologie (1957) 2, 5.
Věda výzkum a praxe v potravinářském průmyslu, Sborník VUKP, 1958.
MAYERHOF, OHLMAYER: Biochem. eatschr. 290, (1937) 334
SNELL E. E., PETERSON W. H.: J. Am. chem. soc. 60 (1938) 2825
SNELL E. E., STRONG F. M.: Ind. Eng. chem. Anal. Ed. 11 (1939) 396
SNELL E. E., WRIGHT J.: J. Am. chem. Soc 6028 (1941) 251
ROSENBERG H. R.: Chemie a fyziologie vitaminů, New York 1945.
ORLA-JENSEN: Mléčné bakterie, Kopenhagen 1942-43.

Výsledky

V статье рассматривается новый метод борьбы с заражением дрожжевых культур при спиртовом брожении, основанный на новых принципах. Вместо антибиотических или антисептических веществ применяется воздействие на ростовые вещества необходимые для развития заражающих микроорганизмов. Эти вещества представляемые повидному сложными комплексами фосфоропротеинов вяжутся с витаминами группы B и влияют на дрожжевые культуры. Было установлено, что интенсивное размножение микробов семейства Lactobacilli являющихся причиной загрязнения и их повышенный метаболизм находятся в зависимости от присутствия указанных веществ в автолизате дрожжей и в бродящем заторе из меласы. Заражающие вещества можно нейтрализовать малыми количествами формалина, добавляемыми в затор по мере возникновения заражений и в зависимости от фазы брожения. Наблюдения показывают, что формалин не проявляется как антисептическое соединение. Эффективность воздействия формалина можно еще повысить добавкой определенных антивитаминов. В этом отношении были получены удовлетворительные результаты с малыми количествами железосинеродистого натрия. Указанные вещества добавляются в затор без прерывания бродильного процесса. Положительные результаты метода относятся не только к отдельным пробам, но и к непрерывному процессу.

При экспериментах удалось в течении трех дней устранить почти совершенно заражение затора находившегося в весьма плохом состоянии без замены содержания бродильной батареи. При дальнейших экспериментах в затор вводились заражающие бактерии, однако несмотря на это периодические добавки формалина и железосинеродистого натрия воспрепятствовали распространению заражения. Метод проверен в настоящее время непосредственно на заводах и полностью себя оправдывает.

Есть все основания предполагать, что новый метод борьбы с заражением будет иметь важное значение и для других бродильных процессов поставленных под угрозу инфекционных заражений. Необходимо однако изучить тщательно причину заражений и отношения между дрожжевыми культурами и их вредителями.

Summary

The article deals with a new method of inhibiting the contamination during the alcohol fermentation process, based upon new principles. Instead of using antibiotics or antiseptics the method interferes with growth regulating substances indispensable for the contamination.

The substances - presumably composite phosphoric proteins are bound upon vitamins of the B group and release the yeast taking part in fermentation. It has been found that the intensive propagation of contaminating Lactobacilli and their intensified metabolism is connected with the presence of the mentioned substances discovered in the yeast autolysate as well as in fermenting mash.

The substances can be neutralized by small quantities of formalin introduced during the fermentation in accordance with the rate of their formation. The results of

research work indicate, that formalin does not act as antiseptic stuff. Its efficiency can be further improved by adding some antivitaminas as for instance sodium ferricyanide. Inhibitors must be added during the fermentation process. Positive results have been obtained with samples as well as in continuous production.

In experiments on production scale heavily infected mash was almost completely restored within three days without changing the contents of fermenting battery.

In another experiment contaminating bacilli were introduced into the mash which despite this artificial conta-

mination was kept by adding formalin and ferricyanide in sound condition. The results are now being verified directly in manufacturing plants, the reports being so far very encouraging.

It may be expected that the new method as described in the article could be successfully applied for inhibiting contamination of other fermenting processes where contamination is one of the most serious problems. It is necessary of course to study thoroughly the nature of the contamination and the relation existing between the infecting bacilli and yeast.