

O možnosti zvyšování výtěžku alkoholu v lihovarech zpracovávajících melasu

J. DYR a V. KRUMPHANZL

663.52 : 664.15 : 577.15

Zvýšení výtěžnosti v lihovarech je v poslední době podkladem četných prací. Autoři řeší tuto otázku s hlediska možnosti využití melibiosy, jež zbývá po částečném rozštěpení trisacharidu rafinosy, která je v melase přítomna. Štěpení melibiosy (galaktosa + glukosa) se provádí autolysátem připraveným z pivovarských kvasnic.

Řepná melasa zpracovávána v našich lihovarech obsahuje z cukerných látek vedle sacharosy (40 až 55 %) hlavně rafinosu (1—2,8 %). Tyto cukry tvoří surovinu pro výrobu lihu. Ke kvašení se používají v lihovarnictví svrchní kvasinky, které tvoří vysoké procento alkoholu a nejsou tak náročné na výživu, jako spodní kvasinky používané v pivovarnictví. Tyto dvě velké skupiny kvasinek se vzájemně liší od sebe svým souborem enzymů. Neuberg⁽¹⁾ zjistil, že sacharáza kvasinek hydrolyzuje rafinosu; trisacharid složený z galaktosy-glukosy-fruktosy, stejně jako sacharosu, protože má stejnou vazbu fruktosní-glukosy. Při štěpení rafinosy sacharázou je do prostředí uvolňována fruktosa. Po této hydrolyse zůstane v prostředí redukční disacharid melibiosa složená z glukosy a galaktosy. Kuhn (2, 3) objevil, že melibiosa není přímo zkvasitelná podobně jako byla rafinosa a může zkvasit jen tehdy, jestliže je nejprve přeměněna v glukosu a galaktosu α -galaktosidázou. Kvasinky používané v lihovarech (svrchní) jsou bohaté na sacharázu a zymázu, ale nevylučují α -galaktosidázu. Jedině spodní pivovarské kvasinky mají tuto vlastnost. Můžeme tedy předpokládat, že v prokvašené melasové zápaře svrchními kvasinkami zбудe jako zbytkový cukr melibiosa.

Úkolem této práce bylo najít způsob k odstranění melibiosy v prokvašených záparách. Dříve vypracované metody na stanovení rafinosy pomocí kvasného enzymatického extraktu Chollet (4) nám pomohly v našem úkolu. Princip spočíval v štěpení melasové rafinosy sacharázou a melibiázou a ze změny otáčivosti polarizovaného světla se vypočítával obsah rafinosy. Bylo nyní naším úkolem vyzkoušet, zda je možné použít enzymatického extraktu i v našem případě. Profesor Jörgensen (5) se zmiňuje o možnostech tohoto řešení. Připravili jsme proto enzymatický preparát a vyzkoušeli na praktických případech.

Příprava enzymatického preparátu

Enzymatický preparát byl připravován ze spodních pivovarských kvasinek. Před extrakcí je nutné nejprve porušit buněčnou blánu. Běžně se používají tyto způsoby: drcení buněk roztíráním s pískem nebo sklem, dále působením acetonu a etheru (trvá několik dnů) nebo konečně je možná autolysa za mírně zvýšené teploty.

Pro náš případ se ukázal nejvhodnější třetí způsob, t. j. autolysa kvasničných buněk za mírně zvýšené teploty. Tento způsob dovoluje v krátké době — 24 hodin, připravit dostatečné množství autolysovaných buněk. Výhodou tohoto způsobu je jednak snadná manipulace, krátká doba přípravy a možnost přímého použití kvasničného autolysátu jako enzymatického preparátu. Takto připravený autolysát může být přímo přidán do kvasného média, aniž by se tím porušoval normální průběh kvašení. Použití acetonu a etheru předpokládá další čištění

těni preparátu, což je ve větším měřítku neúnosné.

Pro přípravu autolysátu jsme použili lisovaných spodních pivovarských kvasinek z pivovaru Smíchov. Kvasinky byly přechovávány i po několik dnů v lednici a přesto nebylo vidět znatelné snížení aktivity jejich enzymového systému.

Lisované kvasinky byly upěchovány do litrových prachovnic. Osvědčilo se nenaplnňovat prachovnice úplně, protože v průběhu autolysy nastává působením teploty rozpinání plvnů v lisované hmotě a často obsah nádoby přeteče. Je nutné dávat pozor, aby nevznikaly zbytečné volné prostory v pýchované kvasničné hmotě, protože průběh autolysy není potom tak dokonalý. Takto připravené kvasinky byly ponechány v termostatu po dobu 24 hodin. Vzniklý autolysát byl zfiltrován a tím byl odstraněn případné neautolysované buňky. Filtrát byl potom zfiltrován přes Seitzův bakteriální filtr a sterilně rozpipetován do zkumavek. Připravený filtrát byl potom dále používán při pokusech. Kontrola čistoty byla prováděna kultivační zkouškou. Rozpipetovaný filtrát byl ponecháván v lednici. Před použitím bylo nutné ponechat jej po nějakou dobu při pokojové teplotě, protože chladem nastalo vypadávání bílé sraženiny z roztoku a tím byla porušena homogenita vzorku. Vzniklá sraženina při pokojové teplotě za několik hodin opět zmizí.

Sledování výsledku autolysy bylo prováděno rozdělovací papírovou chromatografií. Připravený 1 % vodný roztok rafinosy byl rozpipetován po 5 ml do zkumavek a vysterilován. K připravenému roztoku rafinosy bylo přidáváno vždy 0,05 ml enzymatického sterilního filtrátu jednotlivých vzorků autolysátů. Zkumavky byly potom vloženy do termostatu na 24 hodin při 28 °. Po vyčechení roztoků Herlesovým roztokem I. a II. byl každý vzorek nanášen mikropipetou na chromatografický papír Whatman č. 1. Jako rozpouštědlo byla použita směs n-butanol-kyselina octová-voda v poměru 4—1—5. Chromatografováno 40 hodin. Detekce byla provedena postříkáním roztokem kyseliny oxalové a anilinu a zahřátím papíru v sušárně na 105 ° po dobu 15 minut.

Vliv teploty na výsledek autolysy

Použitá teplota při autolysy	Doba autolysy	Zjištění chromatograficky					Poznámka
		rafi-nosa	meli-biosa	galak-tosa	gluko-sa	fruk-tosa	
28°	24 hod.	—	—	+	+	+	Dobry průběh autolysy. Malé množství autolysovaných buněk
38°		+	—	+	+	+	
50°		+	—	—	—	—	
78°		+	—	—	—	—	

Z výsledků je vidět, že při 28 ° neprobíhá autolysa prakticky vůbec. Teplota 38 ° se zdá být nejvhodnější pro přípravu autolysátu. Výsledek se shoduje s poznatký Browna (6), který používá pro přípravu autolysátů teploty 34 °. Vyšší teploty t. j. 50 ° a 78 ° narušují již samotný enzymový systém.

Současně byl sledován vliv přídavku NaCl na rychlost autolysy. Při koncentraci 10 % NaCl na váhu lisovaných kvasinek nastalo okamžité uvolnění vody vázané mezi buňkami a původně pevná hmota přešla v kašovitou. Tím bylo značně ulehčeno plnění prachovnic, ve kterých autolysa probíhala. Při koncentraci 1 % NaCl na váhu lisovaných kvasnic, nenastala znatelná změna. Je vidět, že NaCl napomáhá průběhu autolysy, ale náklad na přípravu preparátoru tím stoupne.

Stanovení účinnosti sterilního enzymatického filtrátu

Pro další práci bylo nutné zjistit účinnost připraveného filtrátu. Browne a Zerban (6) popisují polarimetrickou metodu na stanovení aktivity připravené melibiázy. Nemohli jsme však tuto metodu aplikovat, protože vyžaduje na přípravu standardních roztoků dosti značné množství melibiosy. Proto jsme zvolili snadnější cestu, jejíž princip spočíval opět v chromatografickém sledování průběhu štěpení rafinosy. Samozřejmě tento způsob nedával absolutní hodnoty, ale stačil pro naši potřebu. Postupovalo se stejným způsobem jako při sledování vlivu teploty autolysy. K 5 ml roztoku 1 % rafinosy byla přidávána určitá množství enzymatického filtrátu. Po 24 hodinách byl vzorek vyndán z termostatu a dále se postupovalo již uvedeným způsobem.

Filtráty byly připraveny z několika odebraných vzorků lisovaných kvasinek. Výsledky jsou sestaveny v tabulce.

Účinnost sterilního enzymatického filtrátu

Lisované kvasinky odebrané dne:	Množství přidaného sterilního enzymatického filtrátu k 5ml 1% rafinosy	Cukry zjištěné chromatograficky				Poznámka
		rafinosa	galaktosa	glukosa	fruktosa	
10. VI. 1955	0.025 ml	—	+	+	+	Tvorba pruhů
	0.050 ml	—	+	+	+	
	0.10 ml	—	+	+	+	
	0.50 ml	—	+	+	+	
	2.00 ml	—	+	+	+	
23. VI. 1954	Ředění vodou 1:1000 → 0.05ml 1:100 → 0.05ml 1:10 → 0.05ml	+	—	—	—	Tvorba pruhů
		+	—	—	—	
		+	—	—	—	
		+	—	—	—	
	Bez ředění	stopa raf.	+	+	+	
		0.025	+	+	+	
		0.050	+	+	+	
		0.10	+	+	+	
		0.50	+	+	+	
		2.00	+	+	+	
19. VII. 1954	Ředění vodou 1:1000 → 0.05ml 1:100 → 0.05ml 1:10 → 0.05ml	+	—	—	—	
		+	—	—	—	
		+	—	—	—	
		+	—	—	—	
	Bez ředění	stopa raf.	+	+	+	
		0.025	+	+	+	
		0.050	+	+	+	
		0.10	+	+	+	
		0.50	+	+	+	
		2.00	+	+	+	

Z výsledků je patrné, že sterilní enzymatické filtráty připravené ze vzorků lisovaných kvasnic a odebírané v různém stáří, mají celkem stejnou účinnost. Při chromatografii na papíře byly pozorovány v určitých případech nepravidelnosti dělení vzorků s vyšší koncentrací přidaného enzymatického filtrátu. Nastávala totiž tvorba pruhů od místa startu. Současně s tvorbou pruhů byl pozorován úbytek skvrn glukosy, fruktosy a galaktosy. Tyto anomálie si vysvětlujeme stoupením viskozity vzorků. Je způsobena látkami obsaženými v autolysátu.

Kontrola stálosti sterilního enzymatického filtrátu

Připravený filtrát byl přechováván v lednici. Zajímalo nás, zda při vyšší teplotě nedojde k zesí-

lení činnosti proteolytických enzymů, které by mohly případně ovlivňovat aktivitu filtrátu. Filtrát byl proto udržován v termostatu při 28 ° po dobu 120 hodin. Vždy po 24 hodinách bylo odebráno 0,05 ml filtrátu a sterilně přidán k 5 ml 1 % vodného roztoku rafinosy. Vodný roztok s přidaným filtrátem byl ponechán v termostatu 24 hodin a po vyčechení nanášen na chromatografický papír. Podle chromatografického záznamu je vidět, že po 120 hod. nenastalo ještě znatelné snížení aktivity sterilního filtrátu autolysovaných kvasinek.

Vliv pH na enzymatický preparát

Pro pozdější využití připraveného filtrátu na přirozených půdách bylo nutné také vyzkoušet vliv pH na jeho aktivitu. Byl připraven 1 % vodný roztok rafinosy po 5 ml o rozdílném pH. pH bylo upraveno kyselinou sírovou. Do takto připravených půd bylo přidáno 0,05 ml filtrátu a vzorky ponechány v termostatu 24 hodin při 28 °. Vzorky byly dále připraveny k chromatografování uvedeným způsobem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce.

Vliv pH na enzymatický preparát

pH	rafinosa	galaktosa	glukosa	fruktosa
1.58	+	—	ve stopách	—
2.56	stopa	+	+	+
3.30	—	+	+	+
4.14	—	+	+	+
5.20	—	+	+	+
6.10	—	+	+	+

Podle výsledků je vidět, že pH nižší než 3,30 má záporný vliv na štěpení rafinosy.

Štěpení melasové rafinosy sterilním enzymatickým filtrátem

Po vyzkoušení činnosti preparátu v syntetickém prostředí bylo přistoupeno k jeho prověření v melasové zápare. Použitá melasa (ročník 1953) byla nejprve zředěna vodou na 20 ° Bg. Metodou přímé polarisace stanoven obsah cukru 11,2 %. Melasová zápara byla vysterylována a upraveno její pH na 5,2. Zápara byla potom zakvašena rasou III. v množství 0,3 % sušiny kvasnic na přítomný cukr. Současně se zaočkováním byl přidán sterilní enzymatický filtrát v různých koncentracích. Kultivovalo 30 hodin při 28 °.

Příprava suspence kvasinek

Kvasinky ze šikmého agaru byly přeočkovány do melasové 4 ° Bg zápany, která byla přizhivena 8 g Na₂HPO₄ a 4,5 g (NH₄)₂SO₄ na 1 l zápany. pH upraveno přídavkem kyseliny sírové na 5,2. Zápara byla vyčechena zahřátím k varu a po sedimentaci přetažena do baňky a vysterylována. Celkový objem zápany 4 l v desetilitrové baňce. Zápara byla po zakvašení intenzivně provzdušňována. Doba propagace 30 hodin, teplota 28 °. Napropagované kvasinky byly odstředěny a několikrát promyty vodou. Byla stanovena sušina vzniklé kvasničné suspence a potom touto byly zaočkovány připravené baňky s melasou.

Vliv objemu zápany na množství přidaného preparátu

Byla sledována závislost objemu zápany a množství použitého preparátu. Pokusy byly prováděny prozatím pouze v menších objemech.

Zjištěné množství potřebného autolysátu na rozštěpení rafinosy má význam hlavně vzhledem k praktickému využití. Objektivní obraz dají ovšem pokusy poloprovozní, až provozní, které se připravují.

Baňky s připravenou melasovou záparou byly začokovány suspensí kvasinek v množství 0,3 % sušiny kvasnic na přítomný cukr. Současně přidán enzymatický filtrát v různých koncentracích. Baňky kultivovány 30 hodin při 28°. Po této době byly odebrány vzorky prokvašených zápar, vyčerpeny Herlesovým činidlem I. a II. a nanášeny na chromatografický papír. Dále postupováno již uvedeným způsobem. Výsledky uvedeny v tabulce.

Vliv objemu zápary na množství přidávaného preparátu

Objem melasové zápary 20 °Bg	Ředění enzym. filtrátu	Množství přidávaného filtrátu v ml	Zbytkový cukr stanovený chromatograficky				
			rafinosa	melibiosa	galaktosa	glukosa	fruktosa
10 ml	1:1000	0.05	ve stop.	+	+	+	+
	1:100	0.05	ve stop.	+	+	+	+
	1:10	0.05	ve stop.	+	+	+	+
	0	0.025	—	—	ve stop.	ve stop.	—
	0	0.05	—	—	ve stop.	ve stop.	—
100 ml	1:100	0.05	ve stop.	+	+	+	+
	7:10	0.05	ve stop.	+	ve stop.	ve stop.	+
	0	0.05	ve stop.	+	ve stop.	ve stop.	+
	0	0.025	—	ve stop.	ve stop.	ve stop.	+
	0	0.5	—	—	—	—	—
1000 ml	0	1.0	—	—	—	—	—
		0.05	stopa	+	+	+	+
		1	—	stopa	—	—	stopa
		2.5	—	—	—	—	—
		5	—	—	—	—	—
	0	10	—	—	—	—	—

Aby byl zachycen celkový průběh odkvašení cukrů melasy, byly odebírány vzorky kvasící zápary nejprve po desíti hodinách, ke konci kvašení po pěti hodinách. Vzorky byly po úpravě nanášeny na chromatografický papír. Průběh kvašení je zachycen na obr. 1 a 2.

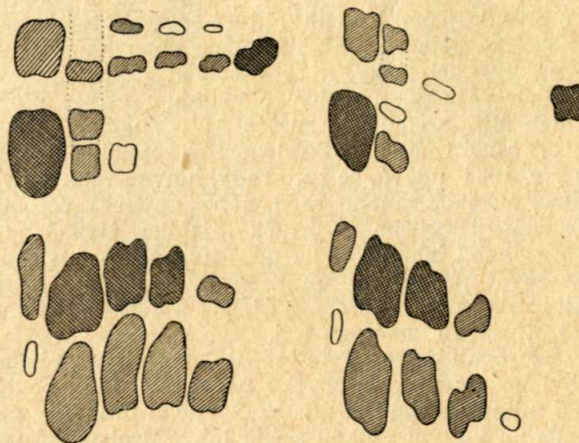
Při srovnání obou fotografií je vidět, že při vyšší koncentraci filtrátu nastalo úplné rozštěpení rafinosy. Současně je vidět, že celkový průběh kvašení v případě 2. je značně zrychlen. Tento zjev jsme pozorovali i v ostatních případech. Se vzrůstem přidávaného filtrátu stoupá rychlost prokvašení i ostatních cukrů.

Souhrn

Účelem této práce bylo ověřit možnost zvyšování výťažku lihu z melasy. Byla zkoušena optimální tep-

lota na přípravu kvasničného autolysátu a vliv NaCl. Dále byla sledována stálost autolysátu při 28°. Rovněž byl vyzkoušen vliv pH na aktivitu pre-

1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6



Obr. 1. K 1 l melasové 20 °Bg zápary přidáno 0,05 ml sterilního enzymatického filtrátu. Doba kvašení 30 hod. t °C 28.

Obr. 2. K 1 l melasové 20 °Bg zápary přidán 1 ml sterilního enzymatického filtrátu. Doba kvašení 30 hod. t °C 28.

Popis:

Z levé strany na pravou.	Pořadí cukrů od startu
1. Zápara před zakvašením.	dolů.
2. Desátá hodina kvašení.	rafinosa
3. Dvacátá hodina kvašení.	melibiosa
4. Dvacátá pátá hodina kvašení.	?
5. Třicátá hodina kvašení.	sacharosa
6. Standard melibiosy.	glukosa
	fruktosa

parátu a vliv objemu zápary na množství použitého preparátu.

V další práci bude sledován přírůstek alkoholu a současně budou pokusy prováděny ve větším měřítku.

Literatura:

1. Neuberg: Biochim. Z. 3 (1907), 519.
2. Kuhn: Z. physiol. Chem. 57 (1923), 129.
3. Kuhn a Münch: Z. physiol. Chem. 1 (1927), 163.
4. Chollet: Industrie agricoles et alimentaires 1952.
5. Jörgensen: Industries agricoles et alimentaires 1953.
6. Browne a Zerban: Sugeranalysis.