

Submerzné octové kvasenie

JÁN HRONČEK,
Slovenská vysoká škola technická, Bratislava

577.15:547.292

VILLIAM WISTER
Liptovské liehovary a konzervárny-octáreň, Žilina

Problémy submerzného octového kvasenia možno rozdeliť na dve skupiny:

- a) problémy mikrobiologické a biochemické,
- b) problémy technologické.

Mikrobiologické problémy

Na čele všetkých mikrobiologických problémov stojí otázka kultúry. Je podstatne rozdielne pre mikrobiológa či pracuje s čistou kultúrou a či so zmesnou. Pracovať so zmesnou kultúrou je menej výhodné pre veľkú rozptýlenosť výsledkov. Pre prácu s čistou kultúrou vznikne ďalší problém, ako získať kultúru, ktorá je schopná submerzne oxydovať alkohol na kyselinu octovú.

Získaním tejto výkonnej kultúry ešte sa neskončila mikrobiologická časť výskumu, naopak vznikajú ďalšie problémy: zistiť živiny potrebné pre rozmnožovanie tejto kultúry, ako aj zistiť podmienky maximálnej výkonnosti.

Technologické problémy

Hlavnou zásadou pre prax je jednoduchosť princípu. Ak je celý technologický postup komplikovaný, v spleťosti problematiky vždy sa na niečo zabudne a tým celý výsledok je mnohokrát odsúdený k zániku. Ďalší predpoklad uplatnenia submerzu je znížená citlivosť na prípadné prevádzkové poruchy, ako aj jednoduchá manipulácia pri výrobe octu submerzným spôsobom.

Problémy, ktoré vzniknú pri dodržovaní týchto zásad sú navzájom závislé, preto ich nemožno riešiť izolovane.

Na katedre technickej mikrobiológie a biochemie SVŠT v úzkej spojitosti s praxou boli tieto problémy riešené.

Získanie čistej kultúry

Pri získavaní vhodnej kultúry šlo sa dvojím spôsobom.

a) klasickou cestou — izolácia Kochovou metódou identifikácia a adaptácia.

b) použilo sa zmesnej kultúry z rýchlooctárenskej veľkoocotnice a dali sa špecifické podmienky. Výsledky môžu byť takéto:

1. Všetky druhy baktérií, ktoré zmesná kultúra obsahuje, zahynú.
2. Udrží sa jeden druh a ostatné zahynú.
3. Udrží sa viac druhov.

Podmienky selekcie

Po viac ako dvoch rokoch výskumu prišlo sa na to, že zmesnej kultúre treba dať hneď od začiatku „tvrdé podmienky“, ináč je nebezpečie, že sa adaptujú na prostredie aj iné druhy. Preto pri výbere podmienok pre selekciu sa dnes volí:

1. Minimálne množstvo cukrov, aby sa netvorila zooglea a teda, aby sa nenapomáhalo rozmnožovanie *A. xylinum*.

2. Značná dávka alkoholu 10—11 %, aby aj baktérie, ktoré sú obzvlášť citlivé na nedostatok kyslíka vypadli, pretože ako je neskoršie uvedené, alkohol znižuje rozpustnosť kyslíka v substráte.

3. Prítomnosť trieslovín (redox pufer, zdá sa, že potlačuje tvorbu zooglei).

4. Prítomnosť hydroxykyselín, pretože sa zdá, že niektoré druhy ich vo väčšej koncentrácii neznášajú; pri selekcii boli použité:

kyselina citrónová,

kyselina mliečna.

kyselina vinná.

5. Glycerín (miesto glukózy).

6. Anorganické živiny.

7. Aminokyseliny a vitamíny (kvasničná voda).

V praxi všetkým týmito zásadám vyhovuje suché víno (s minimálnym zbytkom nekvasených cukrov). Najlepšie vyhovuje víno so značným obsahom trieslovín (červené víno) a s vysokým obsahom alko-

holu 11—12 % alkoholu. (Obvykle sa v literatúrach uvádzajú nahromaďovacie pôdy s nízkym obsahom alkoholu. To nás zvädzalo k podob.)

Do plynovej premývačky bol naliaty syntetický substrát, pripravený podľa horeuvedených zásad, alebo víno a začal sa vháňať vzduch. Súčasne sa vložila jedna stružlina z Fringsového renerátora.

Po dvoch dňoch bolo možné zbadat stúpanie acidity. Akonáhle začala stúpať acidita, stružlina sa vybrala a vetralo se ďalej. Baktérie žijúce v substráte produkovali kyselinu značne rýchlejšie než u upútaného kvasenia. Keď sa dosiahlo acidit 8—9 percent, $\frac{2}{3}$ substrátu sa odlialo a priliat čerstvý substrát, do pôvodnej náplne. Po ôsmom až deviatom priliatí bol v premývačke v prevážnej väčšine jeden druh. Dalo sa to zistiť izoláciou Kochovou metódou a identifikáciou.

Identifikácia kultúry

Spomenutou metódou vyselektovaná kultúra bola identifikovaná podľa *Bergeya* a podľa *Fraturea*, súčasne porovnávaná so zbierkovými kmeňmi. Podľa *Bergeya* táto kultúra pripomínala najviac *A. xylinoides*, podľa *Fraturea* *A. meoxydans* *Frature*.

Submerzná kultúra (v ďalšom kultúra S) má niektoré výhody proti zmesnej kultúre.

1. Znáša vysoké koncentrácie alkoholu bez újmy na intenzite oxydácii.
2. Nezarastá vetracie otvory (na rozdiel od *A. xylinum*).
3. Znáša prudké zmeny alkoholu a acidity.
4. Pracuje pri nízkych teplotách (23—28 °C).

Vplyv zloženia substrátu

Bol pozorovaný zjav, že kultúra S na pôde Henneberg I submerzne oxydovala alkohol, kdežto na pôde Henneberg II nie. Keďže podľa Henneberg I má v zložení peptón, to dokazuje, že baktérie potrebujú k svojmu rozmnoženiu organicky dusikaté látky. Aby sa zistilo, ktoré aminokyseliny potrebujú baktérie, previedol sa nasledujúci pokus:

Z dobre pracujúceho 22litrového fermentačného valca boli odstránené baktérie zo substrátu odstredením pri 15 000 obrátkach za min. Po premytí vodou a opätom odstredení boli baktérie podrobené kyslej hydrolýze a vzniklé aminokyseliny identifikované chromatograficky. V prevážnom množstve boli prítomné: alanín, valín, leucín, izoleucín, kys. asparagová, cystín, glycín, kys. glutamová, guanín a ďalšie neidentifikované škvrny. Uvedené aminokyseliny sa pridali v čistom stave do pôdy Henneberg II za súčasného prídavku komplexu vitamínov B. Postupne bola jedna aminokyselina po druhej odoberaná, až sa došlo na tie, bez ktorých sa baktérie nerozmnožovali. Z výsledku sa predpokladalo, že valín, izoleucín a α -alanín sú esenciálne aminokyseliny, ktoré pri rýchlom množení nevedia si baktérie syntetizovať z anorganického dusíku a bezdusíkatých organických látok.

Tak isto pri mikroskopickom pozorovaní submerzne kvasiaceho substrátu sa zistilo, že baktérie sa zhlukujú okolo mŕtvej kvasničnej bunky. Predpokladalo sa, že baktérie potrebujú v pôde aj vitamíny skupiny B. Preto tak isto ako predošle dali sa do syntetickej pôdy všetky vitamíny a jeden po druhom sa odoberali, až sa prišlo k niektorým vitamínom, ktoré stimulujú rozmnožovanie baktérií. Sú to kyselina p-aminobenzoová, kyselina

pantothénová, amid kyseliny nikotinovej a aneurín. Optimálne koncentrácie sa nehľadali.

Okrem toho sa zistilo, že oxydáciu alkoholu stimuluje prítomnosť glycerínu a kyseliny mliečnej.

Vplyv teploty

Ako už bolo spomenuté, kultúra S pracuje pri nízkych teplotách. Optimum sa posunuje v závislosti od množstva alkoholu a acidity. Tieto závislosti vypracoval *Hromátka* a s našimi výskumami sa plne zhodujú až na to, že všetky naše teploty sú proti *Hromátkovým* zisteniam o 2 °C nižšie.

Vplyv pH

Zdá sa na prvý pohľad nelogické hovoriť o aktuálnej acidite u periodického submerzného kvasenia, keďže acidita s časom stúpa a teda pH klesá. Pri sledovaní pokusov se však zistilo, že pH neklesá úmerne stúpajúcej acidite, ale v prostredí, kde sú baktérie, je akýsi pufer. Baktérie vykazujú najväčšiu rýchlosť oxydácie pri pH asi 3,1—3,2, pri pH asi 2,8—2,9 zdá sa, že ustávajú.

Maximálna rýchlosť oxydácie je závislá na pufrovaťelnosti substrátu v okolí pH 3,1—3,2. Pridaním cudzej kyseliny octovej (silnejším octom) baktérie sú zabrzdené v svojej životnej činnosti a len neskôršie po adaptácii začínajú rýchlejšie oxydovať.

Vplyv ďalších faktorov

Pri prevádzaní pokusov submerzného kvasenia bolo zo 169 pokusov len 92 kladných. U ostatných baktérie buď vôbec nezabrali, alebo predčasne ustali v činnosti. Pri hodnotení pokusov sa zistilo, že všetky nezdarené pokusy sa odchylovali od ostatných výkyvom hodnoty jedného faktoru od strednej hodnoty — množstvom vháňaného vzduchu. Je zaujímavé, že nadbytočné množstvo vzduchu zabráňovalo rozkvasenie a nedostatočné, zabránilo úplne kvasenie. V oboch prípadoch dal sa zistiť 2,4 dinitrofenylhydraxínom acetaldehyd. Množstvo vzduchu potrebného na udržanie normálnej činnosti baktérií rastie s časom.

Preoxydácia

Pri stanovení acidity v krátkych časových úsekoch boli spozorované poklesy acidity na dvoch miestach, na začiatku a na konci. Na konci, keď už nebol prítomný alkohol, dalo sa očakávať, že baktérie budú spaľovať kyselinu octovú na kyslíčnik uhličitý. Predpoklady potvrdili výsledky pokusov, kde vháňanie vzduchu pokračovalo ďalej aj keď acidita bola vysoko (8 %) a nebol prítomný žiaden alkohol. Acidita začala klesať a došla až k nule. Zaujímavejší bol pokles acidity na začiatku pokusu, keď alkoholu bolo nadbytok (6—8 %). Na niektorých pokusoch táto preoxydácia nebola zjavná, na iných zrejme.

Pri zhodnotení výsledkov prišlo sa na to, že ak v substráte bol akýsi redukujúci cukor, preoxydácia sa tak neprejavila. Ešte viac sa prejavila preoxydácia, keď sa dala pred fermentačný valec premývačka s lúhom. To dalo podnet k predpokladu, že baktérie potrebujú k svojmu rastu aj kyslíčnik uhličitý. Tieto úvahy potvrdili literárne pramene, ako aj keď do exikátora boli umiestnené kultúry na vinnom agare spolu s lúhom sodným, ktorý pohltil kyslíč-

ník. Kontrolný exikátor mal (bez lúhu) všetky platne s kolóniami baktérií.

Je možné, že ak baktérie nemajú v substráte rozpustený CO_2 , tak si ho na začiatku nepatrnou preoxydáciou vytvoria.

Inhibitory submerzného kvasenia

Počas troch rokov výskumu podarilo sa skúsenosťou prísť na niektoré inhibitory, ktoré silno rušia priebeh submerznej oxydácie.

V prvom rade je to acetaldehyd. Nedostatok kyselika spôsobí silnú tvorbu acetaldehydu. Acetaldehyd v ocotnici možno zistiť z odpadových plynov tak, že sa v nich podrží sklenená tyčinka, na ktorej je kvapka dinitrofenylhydrazínu. Acetaldehyd zdá sa, že trvale poškodzuje baktérie.

Minerálny olej je ďalším inhibítorom submerzného octového kvasenia. Olej z kompresora je tak jemne rozptýlený, že je ho veľmi ťažko zachytávať filtráciou vatou. Prítomnosť oleja sa zistí pod mikroskopom a už jeho nepatrné množstvo silne zníži výkon submerzného fermentera, až nakoniec submerzní octový kvasenie prestane.

Silným bakteriálnym jedom je aj chróm. Filtračné sviečky (pokiaľ nebola preskúšaná metóda vhodnej selekcie a bola zmesná kultúra, ktorá čiastočne zapchávala frity), ako aj sklenené fermentačné valce boli čistené kyselinou chromsírovou. Intenzita oxydácie postupne klesala. Prečistením sviečok zmesou kyseliny sírovej a dusičnatej výkon valcov sa vrátil na pôvodnú hodnotu.

Nepatrne inhibuje kyslíčnik siričitý. Je známy spôsob zabrániť octovateniu vína zasírením. Z toho by sa dalo usudzovať, že octové baktérie neznášajú kyslíčnik siričitý. Proti tomu však hovorí prax. V octárni v Žiline, kde prebiehajú prevádzkové pokusy submerzného octového kvasenia, je atmosféra tak zamorená kyslíčnikom siričitým z blízkej továrne na výrobu kyseliny sírovej, že stromy sú vyschnuté a baktérie pracujú nerušené ďalej, hoci jediný filter vzduchu je vata, ktorá má zadržať minerálny olej. Okrem toho spracováva sa víno na ocot submerzným spôsobom s veľkým množstvom SO_2 .

Naproti tomu veľkým nepriateľom octového kvasenia je prítomnosť gummy. Gumové súčiastky sú úplne rozožraté a badať škodlivý vplyv na životnú činnosť baktérií. Potravinárska guma nie je atakovaná v octovom prostredí.

Kontaminácia

Kontaminácia u submerzu môže nastať mikroorganizmami, ktoré znášajú veľkú aciditu. Sú to v prvom rade iné druhy octových baktérií. Za tým účelom bol spravený nasledujúci pokus. 1 rok bežal stále submerz v malých premývačkách na víne tak, aby mali k vínu prístup mušky (*Drosophilla*). Počas celej doby nenastala kontaminácia inými baktériami tak vážna, aby sa musel pokus prerušiť.

Príčina je jasná, niektoré druhy octových baktérií potláča priamo prostredie (soli, triesloviny, veľké množstvo alkoholu, resp. kyseliny), alebo pod-

mienky: rýchle stúpajúca acidita, nedostatok kyselika a pod., čiže sú to podmienky pre sústavnú selekciu.

Nebezpečná je infekcia kvasinkami. Pri menšej acidite (pod 3 %, niekedy pod 4 %) hoci je aj vysoké percento alkoholu, rozmnožia sa kvasinky, ktoré spotrebúvajú alkohol a kyselinu. Zábrana proti nim je prudké stúpnutie acidity asi o 1 % a baktérie sa skôr adaptujú na zvýšenú aciditu než kvasinky. Okrem toho pri vyššej acidite sa kvasinky nerozmnožujú.

Sem možno zaradiť i prítomnosť octových háďatek (*Nematodes*). Háďatka pri vysokom osmotickom tlaku hynú, preto je výhodné zaoctovať submerznú ocotnicu s vínom, ktoré má väčšie množstvo kyseliny vinnej a kyslého víňanu draselného. Háďatka v zmesi 50 % vína a 50 % zápary už nehynú, ale sa rozmnožujú a sú podstatne väčšie ako u upútaného kvasenia.

Laboratórne a prevádzkové pokusy

Kým mikrobiologická časť výskumu bola prevádzaná na malých aparaturách (plynové premývačky), technologická časť bola prevádzaná na týchto zariadeniach:

1. Valce 3 cm vnútorného priemeru, výška 1,5 m a 3 m, opatrené fritom na spodu priemeru 2 cm, zrnitosti G 2. Vyhrievanie sa robilo ponorným telesom, trúbkou z jenského skla, v ktorej bola vyhrievacia spirála zapojená na sieť cez relátko a konštantný teplomer.

2. Valce priemeru 10 cm, výška 160 cm a 320 cm, zariadené podobne ako u 1. okrem toho je vnútorný chladič.

3. Valce priemeru 6 cm a výška 300 cm, opatrené fritovou sviečkou bez ohrievania a chladenia.

4. Prevádzková kaďa vnútorného priemeru 100 cm a výške 600 cm (vnútorná svetlosť).

Zaoctovanie je jednoduché vo všeobecnosti pridržiava sa zásad uvedených pri selekcii. Keď je ocotnica zaoctená, manipulácia je veľmi jednoduchá: Odoberú sa $\frac{2}{3}$ liehového octu a prileje sa ďalšia zápara. Vetranie sa reguluje podľa toho, koľko spotrebúvajú baktérie. Spotrebu kyselika určuje prístroj, ktorý stanovuje kontinuálne a súčasne i registruje množstvo kyselika v odpadových plynách odchádzajúcich z ocotnice.

Množstvo rozmnožených baktérií robí značný zákal v octe. Tento sa dá odstrániť odstredením alebo ostrou filtráciou.

Priemerne zatiaľ stúpa v prevádzkových zariadeniach acidita 2,6—2,8 % za 24 hod. Takže možno počítať, že výkon submerznej ocotnice je asi 8krát tak veľký ako u Fringsovej veľkoocotnice 20 m³. Laboratórne výsledky však dokazujú, že výkon môže podstatne stúpnuť, preto že priemerná rýchlosť bola asi 4 % za 24 hodín, čo však ešte tiež nie je hranica. Zatiaľ na submerznej ocotnici sa pracuje s vínom. Laboratórne pokusy však dokazujú, že submerz ide aj na liehovej zápary, pridržiujúc sa hore uvedených zásad, v zložení substrátu.

VÁŽENÍ ČTENÁŘI!

Při objednávce Kvasného průmyslu na příští rok si můžete v předplatitelském středisku vašeho závodu nebo na poštovním úřadě ve vašem bydlišti zajistit dodávku dalších časopisů vydávaných ministerstvem potravinářského průmyslu a výkupu zemědělských výrobků PRŮMYSL POTRAVIN a LISTY CUKROVARNICKÉ.