

## Nález keříčkovité kvasinky v lihovarském provozu

RADOVAN KUBÍČEK a ALENA HANÁKOVÁ, Severomoravské lihovary a konservárny, n. p., Olomouc

663.5  
582.282.232

V lihovarské kampani 1964/65 i v roce 1935/66 byla v lihovaru Olomouc-Hodolany zjištěna po několikátýdenním kontinuálním provozu lihovaru v kvasící zápaře kvasinka, tvořící keříčkovité útvary, nápadně odlišné od kvasinek produkčního kmene. Této kvasince velmi dobře vyhovovaly podmínky lihovarské výroby. Intenzivně zkvašovala cukr na etanol, v kyselých preparačních lázních nebyla nijak oslabována a byla velmi odolná vůči poměrně vysoké koncentraci lihu v prokvašených záparách (10,5 až 11,5 %). Zprvu byla nalézána ojediněle, její množství však postupně vzrůstalo až do poměru asi 1 : 3 ve vztahu k normálním produkčním kvasinkám. Byl učiněn pokus, jak se bude chovat při normálním Boinotově výrobním postupu po rozpojení baterie: za těchto podmínek se však kvasinka rozmáhala stále intenzivněji, takže po několika cyklech byl provoz přerušen a kvasírna kompletně sterilací vyčištěna. Ve znovu zahájeném provozu se kvasinka více neobjevila.

Technologicky vzato, popisovaná kvasinka, pokud nebyla v soustavě příliš zastoupena, skoro nepřekážela. Vzhledem k tomu, že tvořila dosti rozměrné a poměrně pevné keříčkovité útvary, oddělovala se však od zápary. V úseku intenzivního kvašení se shromažďovala vlivem  $\text{CO}_2$  u hladiny, v prokvašené zápaře tvořila značné sedimenty, takže jak se rozmáhala, začala být velmi obtížnou. Vlivem oddělování se od zápary — úbytkem aktivní kvasničné hmoty — a keříčkovité struktury, v níž je omezena z prostorových důvodů látková výměna, zpomaloval se kvasničný proces, hlavně v konečných fázích (dokvašování).

Bylo zřejmé, že v soutěži potlačovala ušlechtilé kvasinky produkčního kmene. Narůstání kvasničné hmoty nebylo možno vzhledem k oddělování se od zápary spolehlivě měřit; bylo však zřejmé, že je poměrně vyšší a rychlejší než u lihovarské kvasinky. Rychlost kvašení lihovarských zápar, u nichž byla keříčkovitá kvasinka v poměru k normálním zastoupena asi 1 : 1 při asi 1 % kvasn. sušiny, byla až do koncentrace etanolu 9 až 9,5 % skoro normální, avšak zbytek cukru do lihovatosti 10 až 11,0 % dokvašel nápadně pomaleji.

Tvarem většiny jednotlivých buněk a chováním v lihovarské zápaře, se tato keříčkovitá kvasinka značně podobala běžným lihovarským sacharomycetám. Hlavním rozdílem v zápaře byla tvorba keříčkovitých útvarů — dceřinné buňky se neoddělovaly od matek a tak vznikly keříčkovité útvary, čítající několik desítek až stovek jedinců. Některé keříčky obsahovaly buňky nápadně protáhlejší.

Vzhledem k tomuto zajímavému chování uvedené kvasinky a nebezpečným vlastnostem z technologického hlediska, jsme tuto kvasinku izolovali s cílem prostudovat její vlastnosti a pokusit se o její určení.

### Metodika

Kvasinka byla kultivována na kapalných i pevných půdách, jak přirozených tak i syntetických. Byl sledován jednak růst a charakter kolonií na jednotlivých pevných půdách, event. morfologické změny, prokvašování jednotlivých cukerných substrátů, jak za fakultativně anaerobních podmínek, tak i za aerace, maximální schopnost tvorby etanolu a schopnost tvorby spór. Morfologická variabilita a růst kolonií na pevných půdách byly dokumentovány fotograficky.

Pro kultivaci na přirozených kapalných i pevných půdách bylo použito jednak melasové sladinky přiživěné  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , okyselené kys. sírovou, podle účelu 10 až 20 °Bg, resp. obdobné obilné sladinky, připravené ze sladového výtažku. Tyto kapalně půdy byly v případě potřeby ztuženy 1,5 až 2 % agaru.

Jako základní syntetické půdy bylo použito směsí: 3 g primárního forforečnanu draselného, 2 g sekundárního fosforečnanu amonného, 0,1 g síranu hořečnatého, 0,1 g chloridu vápenatého a 0,01 g síranu železnatého na 1000 ml půdy, a k této směsi byly přidávány jednotlivé zkoušené cukry, resp. jiné uhlíkaté substráty v množství 5 %. Těchto půd bylo rovněž použito jak v kapalně, tak i ve ztužené formě. Z cukerných substrátů byly zkoušeny: glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza, laktóza, cukerné alkoholy, sorbit a mannit a rafinóza. Obdobně byla připravena kapalná i pevná půda ke zjištění asimilace nitrátů; v základní směsi byl v tomto případě zastoupen sekundární fosforečnan amonný dusičnanem draselným.

Schopnost sporulace byla zkoušena na agaru podle Gorodkové v této úpravě: glukóza 2 g, pepton 10 g, chlorid sodný 5 g, agar 20 g, studniční voda do 1000 ml [1]. V Chem. ústavu SAV Bratislava byla přezkoušena schopnost sporulace dále na Fowelově agaru (1,5 % agaru, 0,5 % octanu sodného). Současně byl studován růst na lysinovém agaru složení: glukóza 5 %, lysin 0,5 %, primární fosforečnan draselný 0,5 %, studniční voda, k ověření, zda nejde o zástupce rodu *Candida*.

Růst na uvedených půdách byl srovnáván při paralelně provedených kultivacích se sacharomycetami produkčního lihovarského kmene. Na sterilní koncentrované melasové sladince byla provedena přítokovým způsobem zkouška maximální tvorby etanolu.

Růst na kapalných půdách probíhal ve Freudreichových baničkách a je ho možno považovat za fakultativně anaerobní kultivaci. Vesměs bylo použito kultivačních teplot 29 až 31 °C. K zaočkování pevných půd bylo použito povrchového roztěru.

Funkce studovaného mikroorganismu byla na uvedených půdách posuzována jednak podle rychlosti růstu kolonií a jejich formy, resp. pigmentace



(pevné půdy), jednak podle tvorby zákalů, intenzity tvorby  $\text{CO}_2$  a koncentrace etanolu (kapalné půdy). Stanovení etanolu bylo prováděno chemicky jodometrickou metodou v destilátu po oxidaci chromovou směsí [2].

Současně s anaerobními kultivacemi byly provedeny i aerobní kultivace za pomoci větracích míchadel v melasové sladině, v lihovarských výpalcích a na glycerinové půdě. Tyto kultivace byly vedeny přítokovým způsobem při teplotách 28 až 31 °C, pH bylo udržováno mezi 4,7 až 6,5 amoniakem, resp. kys. sírovou (výpalky), přiživování bylo propočteno na očekávané výtěžky v rozmezích 0,6 až 1,5 % koncentrace kvasničné sušiny, pomocí  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a amoniaku. Konečný objem zápar činil 1000 ml (s malými odchylkami), jednotný zásev 0,8 g aktivní kvasničné hmoty o 0,175 g sušiny. Narůstání kvasničné sušiny bylo sledováno centrifugací vzorků kvasící zápary v kalibrovaných kyvetách. Výtěžky kvasničné hmoty byly zjištěny odstředěním a vážením promyté vzniklé biomasy. Ve vysušené biomase byl stanoven dusík obvyklým způsobem kjeldahlizačně a  $\text{P}_2\text{O}_5$  kolorimetricky po mineralizaci kys. sírovou [3]. U kvasinek aerobně získaných na melasové sladince byla změřena i aktivita v těstě (obdobně jako u pek. droždí).

### Výsledky

Při růstu na melasových nebo sladinkových půdách tvořila uvedená keříčkovitá kvasinka velmi rychle rostoucí naprosto typické hutné a poměrně vysoké kolonie s hrubě drsným, hrudkovitým povrchem a nepravidelnými okraji, a to i u zcela mladých kolonií. Proti sacharomycetám je růst dvoj- až trojnásobně rychlejší (obr. 1 a obr. 2). Na obr. 2 je obrovská kolonie, jež dosáhla během 7denní kultivace průměru 25 mm; byl to dvojnásobek proti paralelně kultivované lihovarské sacharomycetě. U mladých kolonií je tento rozdíl ještě mnohem výraznější. Tento rychlý růst kolonií si vysvětlujeme tím, že u keříčkovité kvasinky tvoří základ kolonie (při roztěru suspenze) ne jediná buňka, nýbrž celý shluk — keříček, a tím je v růstu získán velmi značný náskok.

Stárnoucí kolonie v některých případech centrálně černá a její buňky jsou výrazně vyzrnlé asi tak jako u sacharomycet (obr. 3 a 4). V kapalné melasové nebo sladinkové půdě je prokvašování při nižších koncentracích cukrů přibližně shodné jako u sacharomycet. Kvasinka tvoří typické „keříčky“ jak je zřejmé z obr. 5.

Tvorba etanolu při paralelní 50hodinové kultivaci byla u sacharomycet 7,85 % etanolu, u keříčkovité kvasinky 7,87 %.

V žádném případě nebyla pozorována tvorba krísu; sediment byl dosti mohutný. Při zkoušce maximální tvorby etanolu bylo při rozdělení přítoků husté zápary na 4 díly dosaženo lihovitosti 11,07 %, tj. přibližně shodné, jako u sacharomycet. Prokvašování bylo v posledních fázích značně pomalé.

Na syntetických pevných půdách keříčkovitá kvasinka roste podstatně pomaleji; zřejmě vyžaduje

podobně jako sacharomyceta přítomnost růstových faktorů. Po několika dnech kultivace byla pozorována tvorba růžových až sytě červených pigmentů, které však neměly karotenoidní povahu. Pigmentace se vyskytla pouze na půdách se sacharózou, maltózou, glukózou a fruktózou. Růst na půdách s laktózou, mannitem a sorbitem a na nitrátové půdě a lysinovém agaru byl velmi nepatrný. Kolonie bílé. Uvedené substráty zřejmě nebyly asimilovány. Současně byl prostudován vliv přítomnosti biotinu. Na půdě bez biotinu rostly kolonie skoro v kulaté, hladké formě (obr. 6) na identické půdě se stopou biotinu v typické drsné formě (obr. 7). Rovněž tvar buněk byl rozdílný. Bez biotinu byly buňky podstatně kulatější se zrnitou plasmou (obr. 8), s biotinem měly obvyklou podlouhlejší formu (obr. 9). Rozdíly byly pozorovány i na odpovídajících kapalných půdách. Kulatou formu buněk jsme pozorovali i na jiných půdách, na nichž byly některé významné živiny v nedostatečném množství (draslík, síra). Na lysinovém agaru kvasinka nerostla.

Na laktózovém agaru byly pozorovány zvláště prodloužené tvary buněk, připomínající až pseudomycelium (obr. 10). Tvorba spor na agaru podle Gorodkovové ani po několika týdnech nebyla pozorována, zatímco paralelně kultivovaná sacharomyceta sporulovala velmi značně. Na Fowelově agaru kvasinka asi po měsíci bohatě sporulovala (1—3 spory v asku). Přehled prokvašování syntetických sladin jednotlivých cukrů je obsažen v tabulce 1.

Podle nálezů jde o II. kvasný typ [4], stejně jako u produkční sacharomycety. Nebyla pozorována asimilace cukerných alkoholů. Při aerobní kultivaci byla na melasové sladině pozorována poměrně rychlá asimilace cukrů a intenzivní tvorba kvasničné hmoty. Bylo získáno celkem 14 g sušiny kvasničné hmoty z 36 g vloženého cukru; odpovídá to výtěžnosti 39 %. Bereme-li v úvahu vytvořený etanol (0,467 % na 1000 ml), činila výtěžnost 50 % kvasničné sušiny na vložený cukr. Získané kva-

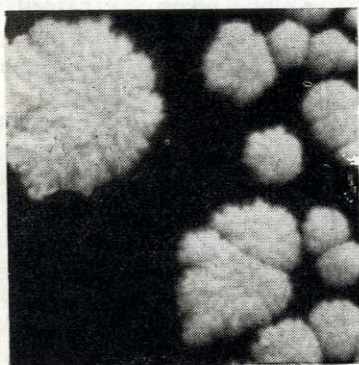
Tabulka 1

Sladina s cukrem	Zjištěný etanol %
Laktóza 5%	0,00
Sacharóza 5%	3,0
Glukóza 5%	3,0
Fruktóza 5%	3,0
Maltóza 5%	3,0
Rafinóza 2%	0,144
Nitrátová sladina (5% glukózy)	0,80

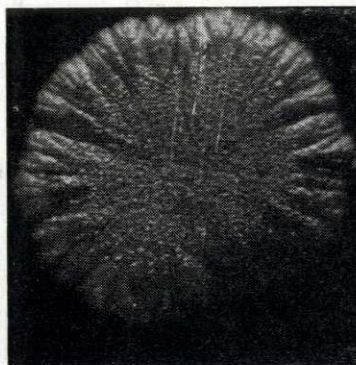
Tabulka 2

Kultivace	N v suš. %	Hrubý protein %	$\text{P}_2\text{O}_5$ v suš. %
Aerobní na melase	7,06	44,—	2,88
Aerobní na výpalcích	7,41	46,4	3,64
Aerobní na glycerinové zápare	8,11	50,7	3,66
Na melasovém agaru (kolonie)	6,70	41,8	—

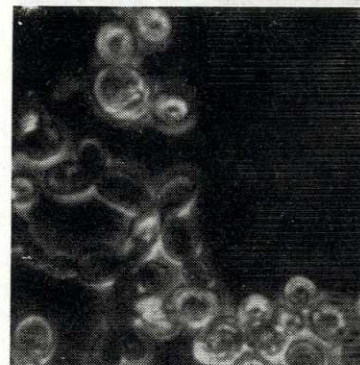




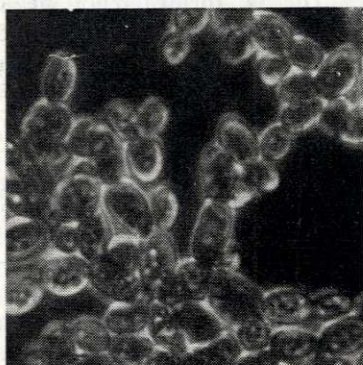
Obr. 1. Kolonie keříčkovité kvasinky po 4denní kultivaci na sladinkovém agaru



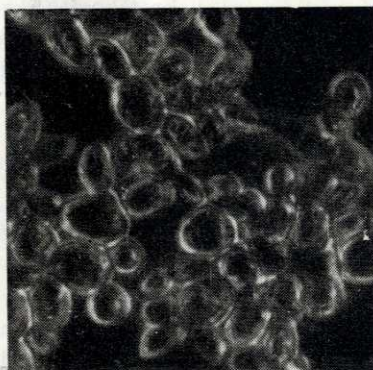
Obr. 2. Obrovská kolonie keříčkovité kvasinky po 7denní kultivaci na melasovém agaru



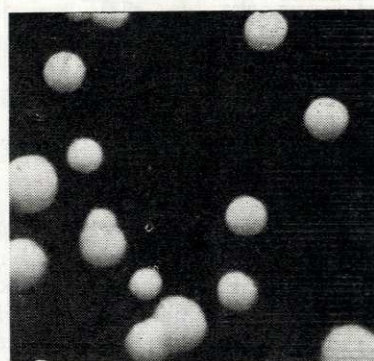
Obr. 3. Keříčkovité kvasinky z kolonie na melasovém agaru



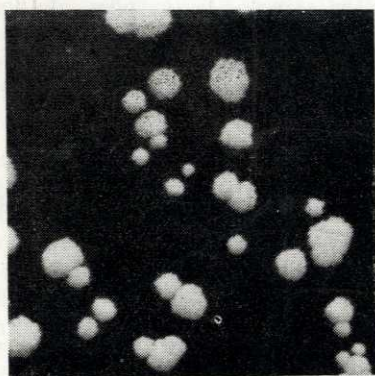
Obr. 4. Keříčkovité kvasinky z kolonie na melasovém agaru 4 měsíce staré, uchovávané v chladnici při 5 °C



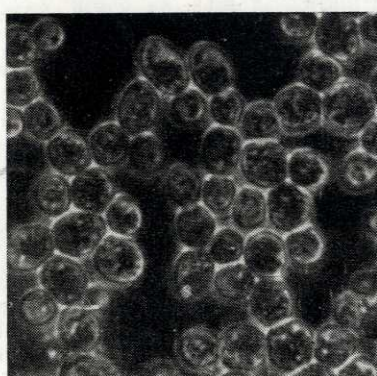
Obr. 5. Keříček kvasinek z obilné sladinky



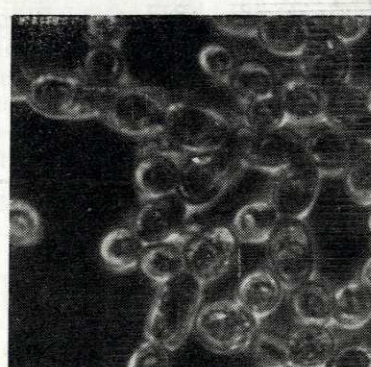
Obr. 6. Kolonie keříčkovitých kvasinek na syntetické půdě, jež neobsahovala biotin



Obr. 7. Kolonie keříčkovitých kvasinek ze syntetické půdy, identické jako u obr. 6, avšak s biotinem



Obr. 8. Keříčkovité kvasinky ze syntetické půdy bez biotinu



Obr. 9. Keříčkovité kvasinky ze syntetické půdy s biotinem

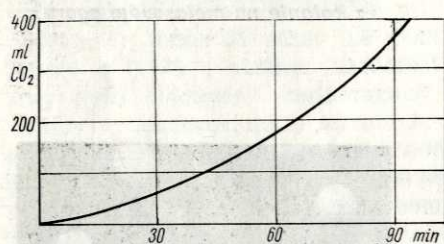
sinky byly podrobeny zkoušce aktivity v těstě a bylo dosaženo kynutí 95 minut v první době (obr. 11), při tvorbě 425 ml CO<sub>2</sub>; aktivita v těstě je tedy proti běžné sacharomycetě snížena. Při aerobní kultivaci na lihovarských výpalcích bylo dosaženo

celkem malé výtěžnosti 6 g kvasničné sušiny na 100 g výpalků. Glycerin při aerobní kultivaci se skoro neasimiloval. Složení sušiny aerobně kultivovaných keříčkovitých kvasinek je uvedeno v tabulce 2.





Obr. 10. Keříčkovité kvasinky z půdy na laktosovém agaru



Obr. 11. Průběh kynutí keříčkovité kvasinky v těstě

### Závěry

Biochemické vlastnosti zkoumané keříčkovité kvasinky se velmi značně podobají vlastnostem sacharomycet lihovarského produkčního kmene, až na některé morfologické znaky. Hlavní rozdíly jsou ve tvorbě keříčků, tj. neoddělování se pučících a dozrálých buněk, dále v tom, že kvasinka špatně sporuluje a tvoří typické, od sacharomycet naprosto odlišné kolonie. Před zjištěním sporulace na Fowelově agaru jsme se pod vlivem učiněných nálezů klonili k názoru, že nejde o nějakou známou nesporulující kvasinku, nýbrž o haploidní formu lihovarské sacharomycety, která vyrostla z náhodné spory. Ověřit tento názor se však nepodařilo, poněvadž přes intenzivní mikroskopické studium sedimentů nebyly v žádném případě zjištěny známky sporulace. Rozborem provozních poměrů při kontinuální výrobě melasového lihu jsme však došli k závěru, že jde o dissociální jevy — přechod produkčního kmene s *S*-formy na *R*-formu.

Při kontinuálním kvašení jsou totiž proti normálnímu postupu s vratnou separací v baterii poněkud odlišné podmínky. Vracené kvasinky, přicházející do prvního členu baterie, jsou vystaveny stabilnímu působení prostředí, jež obsahuje 4 až 6 % alkoholu a pouze asi 1 % cukru za současné slabé aerace. Toto prostředí zřejmě postupně působí na produkční kmen a během velmi dlouhého trvání provozu se jeho vliv projeví vznikem *R*-formy. O tom, že dlouhodobé působení uvedených faktorů — zmíněné koncentrace etanolu za současné aerace — může mít za následek vznik drsných forem, bylo již referováno [5] a je ve shodě se známými zkušenostmi. Než se tento jev objevil, byl produkční kmen vystaven provozu delšímu než 200 dní. Tomuto názoru dále nasvědčuje skutečnost, že vznik keříčkovitých forem byl spontánní a dosti mohutný, takže výklad náhodnou kontaminací je málo pravděpodobný.

Přímý důkaz lze provést postupným převodem keříčkovité kvasinky (drsné formy) zpět na *S*-formu a naopak, což se mezitím podařilo, a bude popsáno později spolu se závěry významnými pro výrobní praxi.

Konsultaci poskytla dr. A. Kocková-Kratochvílová z Chemického ústavu SAV Bratislava a doc. ing. L. Šilhánková z Mikrobiologického ústavu Vysoké školy chemické Praha.

### Souhrn

Byla popsána zvláštní forma nesporulující keříčkovité kvasinky, jež se vyskytla v lihovarském provozu, kde vyvolala provozní potíže. Rozborem jejích biochemických vlastností a jejího chování na přirozených a syntetických půdách při aerobní i anaerobní kultivaci utvořili si autoři závěr, že jde o *R*-formu sacharomycety produkčního kmene.

### Literatura

- [1] Jantček, G. - Šandera, K. - Hampel, B.: Rukověť potravinářské analytiky. SNTL, Praha 1962, s. 634.
- [2] Kubiček, R.: Kvasný průmysl 9, 1963: 173.
- [3] Bell, R. D. - Doisy, E. A.: J. biol. chem. 44, 1920: 50.
- [4] Kocková-Kratochvílová, A.: Kvasinky. Slovenské vydavateľstvo technickej literatury, Bratislava 1957, s. 298.
- [5] Šilhánková, L.: Kvasný průmysl 4, příloha — sešit 2 (1958).

Došlo do redakce 22. 12. 1965

### ОБНАРУЖЕНИЕ КУСТОВИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ НА СПИРТОВОМ ЗАВОДЕ

В статье описывается редкая форма аспорогенных кустовидных дрожжей, обнаруженных на одном спиртовом заводе, где они вызвали производственные затруднения. Изучение их биологическо-химических свойств и поведения в естественных и синтетических питательных средах в условиях аэробного и анаэробного разведения показало, что это — редкая *R* — форма сахаромыцетов применяемого на заводе штамма.

### VORKOMMEN VON STRAUCHFÖRMIGEN HEFEN IN EINER SPIRITUS-FABRIK

Es wird eine besondere Form einer nichtsporulierenden strauchförmigen Hefe beschrieben, die in einer Spiritusfabrik gefunden wurde, wo sie Betriebsschwierigkeiten verursachte. Aufgrund der Analyse der biochemischen Eigenschaften und des Verhaltens dieser Hefe auf synthetischen Böden bei aerober und anaerober Kultivierung kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es sich um die *R*-Form des Saccharomyces des Produktionsstammes handelt.

### DISCOVERY OF FRUTICOUS YEAST IN A DISTILLERY

The authors describe an unusual fruticous form of asporogenous yeast which has been discovered in a distillery, where it caused some difficulties by affecting the fermentation and related processes. Through a study of its biochemical properties and its behaviour in natural and synthetic culture media under aerobic and anaerobic conditions the yeast has been identified as a rare *R*-form of saccharomyces of a strain used by the distillery.