

Do redakce došlo 23. března 1976

Úvod

Slouží-li glukóza jako energetický substrát, mohou kvasinky získat za anaerobních podmínek veškerou energii pro syntetické pochody a růst pouze alkoholovou glykolýzou. *Bauchop* a *Elsden* [1] dokázali, že zkvašením jedné grammolekuly glukózy se může vytvořit z uvolněných 2 ATP bez přístupu vzduchu 21 g kvasničné sušiny. Kvasinky musí být však zcela zásobeny ze substrátu aminokyselinami a dalšími důležitými růstovými látkami, aby se mohla využít uvolněná energie pouze pro jejich růst. Toto zjištění vede k předpokladu, že se mohou kvasinky množit neomezeně dlouho i za anaerobních podmínek. Jejich růst je však závislý na obsahu ergosterolu v buňkách, neboť při poklesu jeho koncentrace pod limitní hodnotu se zastaví růst buněk [2]. *Klein et al.* [3] zjistili, že v přísně anaerobním prostředí se netvoří v buňkách ergosterol. K zajištění růstu za anaerobních podmínek se musí ergosterol přidávat do substrátu, nebo se musí zajistit nepatrný přísun kyslíku, protože v jeho přítomnosti se ergosterol syntetizuje z glukózy. Z těchto studií vyplývá, že i při anaerobním kvašení, které je spojeno s růstem, musí být přítomen kyslík. Podle jeho spotřeby má ze všeobecného hlediska dvojí význam [4]:

1. jako stopový prvek stimulující tvorbu sterolů,
2. jako akceptor vodíku umožňující oxidaci a uvolnění energie z redukovaných substrátů oxidativní fosforylací. V tomto případě se uplatňuje jako makroprvek a jeho spotřeba je srovnatelná s množstvím energetického substrátu.

Uvedená zjištění dobře vysvětlují, proč kyslík rozpuštěný v substrátu nemá při anaerobním kvašení přímý vliv na přírůstek buněk. Průměrné množství rozpuštěného kyslíku v substrátu před zakvašením bývá 6 mg/l. Podle zkušenosti z aerobního růstu vzniká na 1 g kyslíku přibližně 1,4 g sušiny kvasinek [5], takže při stejném způsobu využití kyslíku i při anaerobním kvašení, mohlo by vzniknout jen 8,5 mg sušiny kvasinek na litr. Znamená to, že kyslík musí být využíván jinou cestou než při aerobním kvašení, aby se zajistil dostatečný přírůstek.

Nedostatek kyslíku při anaerobním kvašení postupně snižuje růstové schopnosti buněk. Při stacionárním kvašení se běžně neprojevuje jeho nedostatek, protože je vždy před zakvašením v substrátu rozpuštěno dostatečné množství kyslíku, které udržuje rychlost růstu. Pro kontinuální kvašení je však obsah rozpuštěného kyslíku v přitékajícím substrátu nedostatečný, a proto po určité době se vlivem omezeného růstu buňky vyplavují. Stacionární kvašení začíná s velkým podílem čerstvého

substrátu, ve kterém je poměrně malý podíl zákvasu. Jestliže se určí koncentrace rozpuštěného kyslíku a kvasinek v zákvasu, může se vypočítat, kolik mg kyslíku připadá na 1 g sušiny. U kontinuálního kvašení naopak přitéká malé množství čerstvého substrátu k velkému objemu kvasícího média, které je bez kyslíku. Při stejném postupu výpočtu jako u stacionárního kvašení se dospěje asi k poloviční hodnotě, protože koncentrace buněk ve fermentoru bývá obvykle dvojnásobně vyšší. Tento výsledek neodpovídá skutečnosti, protože není v něm zahrnut vliv zředovací rychlosti. Jakmile se uvažuje při výpočtu hodnota zředovací rychlosti

$$D = \frac{F}{V}$$

je množství kyslíku připadající na 1 g sušiny buněk až o $2 \cdot 10^2$ nižší než u stacionárního kvašení. K zajištění stejné koncentrace kyslíku se musí jeho množství upravit větráním.

Dávkování vzduchu je velmi nízké a mění se podle podmínek, které se nastavily při kontinuálním kvašení. Podle našich měření pohybuje se množství vzduchu od 40 do 250 ml na litr přitékajícího substrátu za hodinu (při 100 % využití). Využití přiváděného vzduchu závisí na rychlosti rozpouštění kyslíku v substrátu. Kromě vlivu kyslíku se uplatňuje při růstu kvasinek i vliv složení substrátu, koncentrace zákvasu, teploty, homogenity prostředí apod. Množství 21 g sušiny kvasinek, vytvořených zkvašením 1 molu glukózy za anaerobních podmínek je maximální hodnota, které se v praxi nemůže trvale dosáhnout. Úbytek substrátu a tvorba alkoholu jsou obvykle rychlejší než růst, a proto energie uvolněná z ATP se nevyužije zcela k syntetickým pochodům a k růstu, nýbrž určitá část se nespoteřebuje a uniká jako teplo.

Aby se mohly určit správné podmínky kontinuální kultivace, musí se zjistit předem důležité parametry. Základní matematické vztahy, vyjadřující průběh kontinuálního kvašení, vycházejí z těchto zjednodušených předpokladů:

1. v kvasném tanku se udržuje dokonalé homogenní prostředí,
2. uplatňuje se pouze vliv jednoho limitujícího faktoru,
3. rychlost růstu mikroorganismu se rovná rychlosti jeho vyplavování.

Uvedené vztahy byly odvozeny pro nárůst biomasy v tzv. chemostatu [6, 7]. Vzhledem k různým fermentačním podmínkám nelze základní matematické vzorce

zcela zveřejnit. Platí to především o prvních předpokladech. Dodržení třetího předpokladu je pro kontinuální kvašení bezpodmínečně nutné.

Chemostatu se může využít jako propagátoru pro zásobování kontinuální linky čistou kulturou, nebo jako selektoru pro vypěstování vhodného kmene mikroorganismů. Studium selekce kvasinek a vlivem zpětného toku při selekci se podrobně zabýval Hronček [8, 9, 10]. Při výrobě šumivých vín se používá osvědčených speciálních kmenů, které se podílejí na dosažené konečné kvalitě výrobku. Vzhledem k technologickému postupu kontinuální výroby těchto vín ve Starém Plzenci, musí se pro sekundární kvašení dodávat plynule určité množství zákvasu. Proto je propagační stanice součástí kontinuálního způsobu přípravy sektů.

Původní propagace podle licenční dokumentace měla pět tanků propojených spojovacím potrubím [11]. V každém tanku bylo míchadlo s elektromotorem, upevněné na víku. Po uvedení kontinuální výroby šumivých vín do provozu se ukázalo, že pětistupňový systém propagace kvasinek je nevyhovující, neboť se nikdy nepodařilo udržet vhodné podmínky pro růst v jednotlivých tankách. Uvedený postup by vyžadoval rozložení růstové křivky tak, aby v pátém stupni byl největší přírůstek. Zajištění těchto podmínek, jak potvrdily provozní výsledky, je prakticky neuskutečnitelné. Po zakvašení čistou kulturou byl sice zaznamenán v prvním až třetím tanku částečný růst, avšak ve čtvrtém a pátém tanku klesalo postupně množství buněk. Místo požadovaných 50 miliónů buněk v ml byl jejich počet průměrně o polovinu nižší. Z tohoto důvodu se muselo množství zákvasu doplňovat semikontinuálním pomnožováním v sudech.

Tento nedořešený úsek celého kontinuálního systému výroby sektů nepříznivě působil na kvasný proces v hlavních kolonách, protože jeho průběh závisí na udržení požadované konstantní koncentrace kvasinek v zákvasu. Aby se zajistil hlavní technologický požadavek, dostatečné množství kvasinek pro sekundární kvašení, upustilo se od pětistupňového systému propagace a vypracovaly se podmínky pro jednostupňový systém, který se dlouhodobě ověřil v provozu.

1. Pokusná část a metodika

Ke všem pokusům se používalo tirážní směsi, která se běžně zkvašuje při výrobě šumivých vín a provozního kmene, označeného jako Moskevský kmen. Laboratorní zkoušky se konaly v kvasném skleněném tanku o obsahu 5,5 l (Ø 100 mm). Teplota při kvašení se udržovala na konstantní hodnotě (15 °C) automatickou regulací. Provozní kvasné zkoušky se konaly přímo v propagátoru. Před každým zakvašením se upravila koncentrace kyslíku v tirážní směsi na 6 až 7 mg/l. V průběhu kvašení bylo zapnuto pouze míchadlo, nevzdušnilo se. Vzorky se odebíraly dvakrát denně. Sledovalo se pomnožení kvasinek, úbytek cukru a kyslíku po zakvašení a vliv výchozí koncentrace cukru.

Množství kvasinek v substrátu se stanovilo filtrací odváženého vzorku přes filtrační kelímek s křemelinou a zjištěný váhový přírůstek po vysušení při 105 °C se přepočítal na 1000 ml vína.

Koncentrace cukru se vyjadřovala jako glukóza v g/l. Před vlastní analýzou se vzorky hydrolyzovaly a potom se titračně určilo množství glukózy podle Schoorla [12].

Obsah kyslíku před zakvašením a při propagaci se stanovil polarografickou metodou. Měřil se v podstatě difúzní proud při stálém potenciálu na katodicky polarizované elektrodě. Na pevných elektrodách z ušlechtilých kovů probíhá redukce kyslíku při vhodném potenciálu. Spolehlivě lze měřit změny koncentrace $\mu\text{g O}_2$ a rychlost jeho spotřeby. Měřicí elektroda Clarkova typu

dává proud úměrný parciálnímu tlaku kyslíku. Od měřného prostředí je elektroda oddělena membránou, která je propustná pro plyny, nikoli pro ionty. Krycí membrána propouští však i jiné plyny, a proto se musí volit při měření vhodný druh elektrody a vhodné polarizační napětí, aby se potlačil nežádoucí vliv jiného plynu. K měření se použilo analyzátoru MU-64, ČSAV Praha s elektrodami Ag — Au [13]. V prostředí kyslíčnicku uhlíčitého pro uvedenou kombinaci elektrod se udržuje polarizační napětí od 0,6 do 0,8 V.

α -aminodusík se stanovil kolorimetrickou metodou reakcí s kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou [14]. Vzniklé zbarvení se měří v kyselém prostředí při absorpčním maximu 340 nm.

K zjištění obsahu volných aminokyselin se použilo automatického analyzátoru AAA 881.

2. Výsledky a diskuse

2.1 Kvasné zkoušky

Udržení požadované koncentrace kvasinek v propagátoru vyžaduje nastavení odpovídající zředovací rychlosti $D = \frac{F}{V}$, aby se buňky nevyplavovaly. K výpočtu lze použít rovnice odvozené z látkové bilance chemostatu.

$$F x_0 + V x + V \frac{dx}{dt} = V x + F x$$

kde F je průtok substrátu [l h^{-1}],

V — objem propagátoru [l],

x_0 — výchozí koncentrace kvasinek [g suš. l^{-1}],

x — konečná koncentrace kvasinek [g suš. l^{-1}],

$\frac{dx}{dt}$ — rychlost růstu [$\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$],

úpravou rovnice se získá vztah

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F}{V} (x - x_0)$$

Obdobně se odvodí rovnice i pro rychlost úbytku substrátu. Potřebné hodnoty rychlosti růstu a úbytku substrátu se zjistí z průběhu pokusného stacionárního kvašení. Podmínky při ověřovacím kvašení je nutno udržovat stejné jako pro uvažované kontinuální kvašení (teplota, složení tirážní směsi, rychlost míchání apod.). Aby se stav při kontinuální fermentaci ustálil,

musí se rychlost rozmnožování $\frac{dx}{dt}$ rovnat rychlosti vyplavování $D(x - x_0)$. Mikroorganismy (x_0) mohou do chemostatu přicházet se substrátem z jiného chemostatu, nebo jako zpětný tok (částečná separace vyprodukovaných buněk), nebo do chemostatu nevstupují žádné buňky (pouze substrát) a jejich stálá koncentrace se udržuje zvcenými podmínkami, které odpovídají specifické rychlosti růstu a rychlosti spotřeby substrátu. Pro propagaci mikroorganismů je zajímavý poslední případ.

Podle denního výkonu hlavních kvasných kolon a při 7 % dávce zákvasu (vztaheno na přítékající tiráž) musí se za 24 h vyprodukovat v propagaci asi 0,4 kg sušiny kvasinek, to odpovídá přibližně 2,5 kg kvasničné suspenze. Po zředění zákvasu tiráží má kvasná směs obsahovat 4 milióny buněk v 1 ml. Aby se dosáhlo této koncentrace, nesmí klesnout v zákvasu počet buněk v 1 ml pod 50 miliónů. Stanovení počtu kvasinek je zatíženo velkou chybou a získaná hodnota je pouze orientační. Využívá se jej hlavně k rychlé kontrole průběhu procesu. Přesné ohodnocení růstu se vyjadřuje množstvím sušiny kvasinek v jednotkovém objemu. Provnání počtu kvasinek a množství sušiny je uvedeno v tab. 1. Koncentrace 1,1 g sušiny odpovídá přibližně 50 miliónům buněk v 1 ml. Zjištěné rozdíly mezi oběma stanoveními (tab. 1) jsou způsobeny hlavně nedokonalou homogeni-

Tabulka 1. Porovnání počtu buněk a váhového množství

Počet buněk [mil./ml]	Sušina kvasinek [g/l]	Počet buněk [mil./ml]	Sušina kvasinek [g/l]
47,2	0,85	54,2	1,30
44,8	0,91	49,6	1,34
43,2	1,06	32,0	1,36
51,2	1,06	49,6	1,36
42,0	1,07	56,0	1,38
43,2	1,11	60,8	1,38
54,4	1,12	61,6	1,44
48,0	1,20	50,4	1,46
53,6	1,25	49,6	1,47

tou vzorku při přípravě preparátu pro určení počtu buněk.

Při stacionárních kvasných zkouškách se sledoval vliv výchozí koncentrace cukru v tirážní směsi používané k propagaci na rychlost růstu kvasinek. Hodnoty z většího počtu zkoušek se použily k výpočtu průtoku substrátu a k zajištění denního výkonu propagátoru pro zásobování hlavních kolon zákasem. Výpočty, získané z průběhu stacionárního kvašení, jsou zatíženy určitou chybou, protože neustále se měnící podmínky při kvašení v závislosti na postupných změnách koncentrace substrátu a hlavního metabolitu, neodpovídají podmínkám ustáleného stavu kontinuálního kvašení. V oblasti log-fáze růstové křivky se podmínky přibližují nejvíce podmínkám kontinuální kultivace, a proto se berou k výpočtu nejčastěji hodnoty z této části kvašení. Složení tirážní směsi, které není pochopitelně konstantní, působí také v určitém rozsahu na konečné množství produkovaných buněk.

Tabulka 2. Průběh kvašení v provozním měřítku

Odběr vzorků [h]	Sušina kvasinek [g/l]	Růstová rychlost [g/l h]	Koncentrace cukru [g/l]	Rychlost úbytku substrátu [g/l h]
0	0,721	0	41,2	0
9	0,767	0,0051	40,0	0,133
23	0,913	0,0104	37,6	0,171
34	0,993	0,0073	35,0	0,236
47	1,060	0,0052	31,3	0,285
59	1,096	0,0030	29,2	0,175
70	1,122	0,0024	27,4	0,164
96	1,185	0,0024	25,4	0,085
107	1,195	0,0009	24,5	0,064
130	1,225	0,0013	23,7	0,035

Teoretický přírůstek vztažený na zkvašený cukr 2,04 suš. g/l
Skutečný přírůstek 0,5 suš. g/l
Rychlost růstu ve 47 h 0,0052 g/l h
Rychlost úbytku substrátu ve 47 h 0,285 g/l h

Tabulka 3. Průběh kvašení v laboratorním měřítku

Odběr vzorků [h]	Sušina kvasinek [g/l]	Růstová rychlost [g/l h]	Koncentrace cukru [g/l]	Rychlost úbytku substrátu [g/l h]
0	0,813	0	79,5	0
10	0,877	0,0064	76,2	0,33
23	0,977	0,0077	70,2	0,46
33	1,082	0,0105	68,4	0,18
47	1,110	0,0020	61,0	0,53
57	1,24	0,0130	59,0	0,20
70	1,34	0,0077	55,4	0,28
81	1,40	0,0055	53,4	0,09
96	1,41	—	47,8	0,37
106	1,46	—	45,4	0,24
129	1,51	—	39,8	0,22

Teoretický přírůstek vztažený na zkvašený cukr 4,84 g suš./l
Skutečný přírůstek 0,72 g suš./l
Rychlost růstu v 52 h 0,0075 g/l h
Rychlost úbytku substrátu v 52 h 0,365 g/l h

Ověřovací kvasné zkoušky ukázaly, že je nutno zkvasovat dostatečně zacukřenou tirážní směsí. V opačném případě se nedosáhne požadovaného přírůstku kvasinek. Teoretický možný nárůst podle prokvašeného cukru byl dvojnásobně vyšší při koncentraci cukru okolo 80 g/l

než při průměrné koncentraci 43 g/l (tab. 2 až 5). Zkvasná dávka byla prakticky ve všech případech stejná. Znamená to, že při vyšší koncentraci cukru mají kvasinky pro růst k dispozici větší množství energie. Okamžité rychlosti růstu a úbytku substrátu nebyly vždy u zkoušeného kmene stejné a rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny složením tirážní směsi, protože se zkoušky konaly v delších časových intervalech s různou tiráží.

Tabulka 4. Průběh kvašení v provozním měřítku

Odběr vzorků [h]	Sušina kvasinek [g/l]	Růstová rychlost [g/l h]	Koncentrace cukru [g/l]	Rychlost úbytku substrátu [g/l h]
0	0,923	0	45,1	0
18	0,960	0,0021	41,7	0,189
30	0,990	0,0025	38,1	0,300
42	1,020	0,0025	36,7	0,117
55	1,070	0,0038	33,3	0,261
67	1,200	0,0108	30,6	0,225
78	1,310	0,0100	28,6	0,182
90	1,360	0,0042	26,2	0,200
102	1,390	0,0025	25,3	0,075
114	1,420	0,0025	24,4	0,075

Teoretický přírůstek vztažený na zkvašený cukr 2,42 g suš./l
Skutečný přírůstek 0,5 g suš./l
Rychlost růstu v 61 h 0,0073 g/l h
Rychlost úbytku substrátu v 61 h 0,243 g/l h

Tabulka 5. Průběh kvašení v provozním měřítku

Odběr vzorků [h]	Sušina kvasinek [g/l]	Růstová rychlost [g/l h]	Koncentrace cukru [g/l]	Rychlost úbytku substrátu [g/l h]
0	0,847	0	82,1	0
14	0,980	0,0102	75,7	0,46
26	1,06	0,0050	73,4	0,19
39	1,11	0,0038	70,9	0,19
50	1,16	0,0045	68,0	0,26
62	1,20	0,0033	64,0	0,33
87	1,30	0,0040	61,9	0,08
97	1,34	0,0040	58,4	0,35
108	1,36	0,0018	54,9	0,32
120	1,38	—	54,2	—
145	1,42	—	50,0	—
170	1,47	—	43,8	—

Podle požadavku má mít kvasná směs při vstupu do hlavních kolon 4 milióny buněk/ml a k zajištění tohoto množství musí se odebírat z propagace asi 7,5 l/h. Obsah cukru v tirážní směsi se upravuje podle výpočtů na 80 až 85 g/l. Při průměrné rychlosti zředění 0,0056 h⁻¹, zjištěné dlouhodobými propagačními cykly, musí být mít propagátor objem asi 13,5 hl. Po odpojení pětistupňové propagační stanice nebyla k dispozici tak velká nádoba, a proto se použily dvě menší nádoby, polovičního objemu. Každá nádoba pracuje samostatně, zapojení přítoku, odvod zákvasu a ostatní zařízení jsou však stejná.

2.2 Popis zapojení propagátorů

Propagátory jsou válcové nádoby s víkem, na němž je ve středu upevněno míchadlo s elektromotorem. Otáčky jsou zredukovány na 30 až 46 ot/min. Každý propagátor má duplikátorové chlazení s automatickou regulací teploty. Tirážní směs se přivádí přes plovákové zařízení ke dnu propagátoru. Plovákovým zařízením se udržuje současně konstantní hladina v nádobách. Z propagátorů odtéká zákvas přepadem, který je umístěn asi 10 cm pod hladinou. Dávkování zákvasu do hlavních kvasných kolon se reguluje dávkovacími čerpadly, která jsou zapojena na výtokovém potrubí propagátoru. I zde se množství proteklého zákvasu kontroluje rotametry. Obsah cukru v tirážní směsi se sleduje v zásobním tanku. Množství sterilního vzduchu k větrání se řídí rotametry. K jeho rozptýlení se používají keramické svíčky, umístěné u dna ve stejné úrovni jako je míchadlo. Při-

vod vzduchu i míchání jsou neustále v činnosti. Zákvas z obou propagátorů se dopravuje společným potrubím ke kvasným kolonám.

2.3 Vliv kyslíku při propagaci

K udržení přiměřeného růstu při anaerobní kontinuální propagaci kvasinek se musí přivádět určité množství vzduchu, kterého využívají buňky pro biosyntézu důležitých sterolů a růstových látek. Z hlediska kvality šumivých vín nemá s kvasnou směsí vstupovat do hlavních kolon kyslík. Přímé větrání do propagátoru vyžadovalo zjištění rychlosti úbytku rozpuštěného kyslíku při stacionárním kvašení, aby se mohla určit potřebná doba zdržení pro úplnou asimilaci. Podle získaných výsledků se mění koncentrace rozpuštěného kyslíku jen nepatrně v závislosti na době vzdušnění okolo 70 % stupně nasycení [4]. Spotřeba kyslíku kvasinkami po zakvašení je velmi rychlá a závisí na množství zákvasu. Při stacionárním kvašení klesla koncentrace kyslíku na nulu během 1,5 až 3,5 hodiny (tab. 6). Znamená to, že v oblasti lag-fáze růstové křivky není v substrátu již žádný rozpuštěný kyslík.

Tabulka 6. Úbytek rozpuštěného kyslíku při kvašení

Doba odběru vzorků [h]	Koncentrace kyslíku [mg/l]	Stupeň nasycení [%]	Sušina kvasinek po zakvašení [g/l]
Původní víno	4,85	47,5	0,28
1	3,38	32,06	—
2	1,88	18,4	—
3	0,45	4,4	—
3,5	0,0	0,0	—
Původní víno	6,80	66,5	1,10
0,33	5,10	50,0	—
0,5	3,80	37,2	—
1	1,76	16,7	—
1,5	0,0	0,0	—
Původní víno	6,06	59,5	0,83
0,5	4,88	47,8	—
1	3,63	35,8	—
1,5	2,36	23,2	—
2,5	0,0	0,0	—

Tabulka 7. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v zákvasu

Doba odběru vzorků	Koncentrace kyslíku [mg/l]	
	za propagátory	před vstupem do hlavních kolon
7.5.	0,06	0
13.5.	0,0	0
18.5.	0,03	0
24.5.	0,04	0
1.6.	0,0	0
17.6.	0,01	0
19.6.	0,0	0
21.6.	0,02	0
23.6.	0,02	0
25.6.	0,03	0
3.7.	0,04	0
11.7.	0,0	0
28.7.	0,03	0
3.8.	0,01	0
11.8.	0,0	0
18.8.	0,0	0
27.8.	0,0	0
27.8.	0,0	0

Pro rychlost rozpouštění kyslíku je rozhodující velikost bublinek přiváděného vzduchu. Čím jsou bublinky menší, tím se kyslík rozpouští rychleji. Dostatečně rychlé rozpouštění vyžaduje buď intenzivní míchání, nebo rozptýlení vzduchu přes porézní materiál. Póry porézního materiálu nesmí být větší než 100 μm , jestliže se má kyslík rozpouštět dostatečně rychle. Při nedodržení tohoto požadavku se kyslík prakticky nerozpouští

a uplatňuje se pouze sekundární vliv vzdušnění, to je míchání.

Po dobu tří měsíců se sledovala rychlost úbytku kyslíku při kontinuální propagaci přímo v provozu. Měřilo se na výtok z propagátoru a těsně před vstupem do hlavní kolony. Pokusy potvrdily výsledky ze stacionárního kvašení. Prakticky veškerý rozpuštěný kyslík byl asimilován kvasinkami již v propagátoru a jen nepatrná část přecházela do potrubí (tab. 7). Úpravou sběrného potrubí (rozšíření na 80 mm v délce asi 1 m) za propagátory se prodloužila doba zdržení kvasinek v potrubí a tím se úplně odstranily zbytky kyslíku ze zákvasu před vstupem do hlavních kolon.

2.4 Vliv dusíkatých látek

Růst kvasinek bývá ovlivněn kromě nedostatku různých růstových látek ještě složením výchozí suroviny, používané k výrobě. Tirážní směs obsahuje málo dusíkatých látek a poměrně vysoké procento alkoholu ($\approx 11\%$). Obě tyto složky mají inhibiční účinek na růst a jakýkoliv pokles dusíkatých látek se projevuje při propagaci kolísáním koncentrace kvasinek. Vzhledem k tomu, že v tirážní směsi je velmi nízký obsah α -aminodusíku (okolo 8 mg/100 ml), nelze očekávat velké pomnožení buněk. Podle licenční dokumentace se odstraňuje z tiráže před sekundárním kvašením kyslík v uzavřeném tanku, v tzv. fermentoru. Tímto tankem protéká tirážní směs obsahující asi 3 g cukru v litru a přibližně 2 % kvasničné suspenze, počítané na objem tiráže. Uvnitř tanku jsou polyetylenové kroužky, na kterých se zadržují kvasinky a jejich činností se odstraňuje rozpuštěný kyslík ze substrátu. Současně se však mění dusíkaté látky a proto se sledoval obsah volných aminokyselin a α -aminodusíku. U vytékající tiráže z fermentoru se zjistilo až o 25 % méně α -aminodusíku a o 12 % méně volných aminokyselin. Z těchto důvodů se nedoporučuje používat k propagaci takto ošetřenou kupáž.

Tabulka 8. Obsah volných aminokyselin v tirážní směsi

Označení aminokyselin	Tirážní směs	
	před fermentorem [mg/l]	za fermentorem [mg/l]
Lys	2,96	2,89
His	stopa	stopa
Arg	6,51	6,29
Asp	1,45	1,33
Thr	1,75	1,61
Ser	—	—
Glu	2,08	1,87
Pro	34,54	27,78
Gly	0,83	0,71
Ala	1,98	1,88
Val	0,98	1,06
Met	0,37	0,27
Ileu	0,42	0,40
Leu	1,16	1,16
Tyr	1,06	1,22
Phe	1,07	1,13
α -aminodusík	8,10	6,24

Literatura

- [1] BAUCHOP, T., ELSDEN, S. R.: J. G. Microbiol. **23**, 1960, s. 456
- [2] ANDREASON, A. A., STIER, T. J.: J. Cell. Comp. Physiol. **48**, 1953, s. 95
- [3] KLEIN, H. P. et al.: Biochim. Biophys. Acta **13**, 1954, s. 591
- [4] KAHLER, M., HOSPODKA, J., ČASLAVSKÝ, Z.: ASBC - Proc. 1965, s. 112
- [5] FRANZ, B.: Die Nahrung **2**, 1959, s. 1104
- [6] HERBERT, D. et al.: Gen. Microbiol. **14**, 1958, s. 601
- [7] NOVICK, A., SZILARD, L.: Science **112**, 1950, s. 715
- [8] HRONČEK, J.: Selektor (Rezortná úloha 03.18/d)SVŠT - Bratislava 1966
- [9] HRONČEK, J.: Mitteilungen **22**, 1968, s. 4
- [10] HRONČEK, J.: Kvasný průmysl **20**, 1974, s. 225
- [11] VOLDŘICH, R.: Kvasný průmysl **18**, 1972, s. 13, 41
- [12] TOMÍČEK, O.: Odměrná analýza ČCHSV - Praha 1949
- [13] HOSPODKA, J., ČASLAVSKÝ, Z.: Folia Microbiol. **10**, 1965, s. 186
- [14] SATAKE, K. et al.: J. of Biochem. (Tokyo) **47**, 1960, s. 654

Kahler, M. - Voldřich, R.: Kontinuální propagace kvasinek. Kvas. prům. 22, 1976, č. 6, s. 135—139.

Stanovily se hlavní parametry pro kontinuální propagaci kvasinek v jednostupňovém systému. V anaerobních podmínkách získávají kvasinky veškerou energii pouze alkoholovou glykolýzou, a proto jejich pomnožení je závislé na množství zkvašeného cukru. Proto musí přitékající tiráž obsahovat dostatečné množství cukru. Jeho koncentrace se udržuje v rozmezí 80 až 85 g/l. Při nižších koncentracích se nezajistí požadovaný přírůstek.

Přímé dávkování vzduchu do propagátoru, jehož množství odpovídá stimulaci důležitých sterolů, neohrožuje jakost tirážní směsi dodatečnou aerací, protože dodaný kyslík je téměř okamžitě asimilován kvasinkami. Měření prokázala, že v zákvasu před vstupem do hlavních kolon není přítomen kyslík ani ve stopách. Dlouhodobé provozní zkoušky potvrdily správnost výpočtů. Kontinuální propagaci v jedné nádobě se podařilo udržet v zákvasu koncentraci 50 až 70 milionů buněk v 1 ml.

Калер, М. — Волдржих, Р.: Непрерывное размножение дрожжей Квас. прум., 22, 1976, № 6, стр. 135—139.

В статье приведены основные параметры одноступенчатых дрожжерастильных установок для непрерывного размножения дрожжей. В анаэробных условиях дрожжи получают всю нужную энергию посредством спиртового гликолиза и поэтому интенсивность их размножения зависит от количества сбраживаемого сахара. Поступающая в установку питательная среда должна содержать достаточную долю сахара. Его концентрация поддерживается в пределах от 80 до 85 г/л. При более низкой концентрации размножение замедляется.

Воздух подается в дрожжерастильную установку в количестве необходимом для стимуляции имеющих важное значение стериннов. Его присутствие в установке не имеет никакого влияния на аэрацию поступающей среды так, как весь кислород немедленно ассимилируется дрожжами. Точные измерения подтвердили, что в закваске, поступающей в главные колонны, нет следов кислорода. Длительные проверочные испытания в эксплуатационных условиях показали правильность теоретических расчетов. При непрерывном размножении дрожжей в одноступенчатой установке концентрация клеток не выходила за пределы 50—70 миллионов в 1 мл закваски.

Kahler, M. - Voldřich, R.: Continuous Propagation of Yeast. Kvas. prům. 22, 1976, No. 6, pp. 135—139.

The article deals with the principal parameters of a single step installation for continuous propagation of yeast. Under anaerobic conditions the yeast has only one source of energy, viz. alcohol glycolysis and, consequently, the propagation intensity depends on the amount of fermented sugar. Feeding medium must therefore contain sufficient percentage of sugar the concentration of which should be kept within the 80 — 85 g/l limits. Lower concentrations reduce the growth rate. Air must be fed into the propagator in quantities required to stimulate essential sterols. There is no danger of medium aeration, since all incoming oxygen is immediately assimilated by yeast. Thorough measurements confirm, that in starter entering main columns are no traces of oxygen. Long lasting experiments carried out on industrial scale gave results fitting theoretical calculations. Through the whole period of continuous propagation in the described single step propagator the concentration of cells never exceeded 50 — 70 million per 1 ml.

Kahler, M. - Voldřich, R.: Kontinuierliche Hefevermehrung. Kvas. prům. 22, 1976, No. 6, S. 135—139.

Es wurden die Hauptparameter für die kontinuierliche Hefevermehrung im Ein-Stufen-System ermittelt. In anaeroben Bedingungen gewinnen die Hefen die gesamte Energie ausschließlich durch die Alkohol-Glykolyse und deshalb ist ihre Vermehrung von der Menge des vergärten Zuckers abhängig. Die zufließende Tirage-Mischung (Wein-Zucker-Mischung) muß daher eine genügende Menge Zucker enthalten. Ihre Konzentration wird im Bereich zwischen 80 und 85 g/l gehalten. Bei niedrigeren Konzentrationen kann der benötigte Zuwachs nicht gesichert werden.

Die direkte Dosierung der Luft in den Propagator in einem Ausmaß, das der Stimulierung der wichtigen Sterole entspricht, führt zu keiner Beeinträchtigung der Qualität der Tirage-Mischung durch nachträgliche Aeration, weil der zugeführte Sauerstoff fast unmittelbar von den Hefen assimiliert wird. Durch Messungen wurde bestätigt, daß in der Gärmasse vor dem Eintritt in die Hauptkolonnen auch in Spuren kein Sauerstoff anwesend ist. Langfristige Betriebsversuche bestätigten die Richtigkeit der Berechnungen. Durch die kontinuierliche Hefevermehrung in einem Gefäß konnte in der Gärmasse die Konzentration 50 bis 70 Mill. Zellen in 1 ml erhalten werden.