

## Hodnocení kvality násadních kvasnic při výrobě krmných kvasničných bílkovin

663.14:636.087

Dr. LUBOMÍR ADÁMEK, Ing. MILOSLAV RUT, Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc.  
Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha

Při výrobě krmných kvasnic se propagace vycházející z čisté kultury provádí obvykle méně často než při jiných typech fermentačních výrob. Kultivační postupy jsou vesměs kontinuální a při zpracování některých surovin probíhají často i řadu měsíců bez poruch. Ani v těch případech, kdy je třeba pro zvýšenou kontaminaci média nebo z jiných příčin přerušovat kontinuální kultivaci častěji, se při zahájení nového kultivačního cyklu obvykle nepoužívají násadní kvasnice získané pomnožením čisté kultury, ale fermentační médium se zakvašuje násadním kvasničným mlékem uchovávaným v chlazených sbornících. Propagace čisté kultury se provádí jen výjimečně při vážných poruchách nebo po delších provozních zádržkách. Zakvašování fermentorů masivním inokulem z násadního kvasničného mléka podstatně snižuje nároky na obsluhu a zvyšuje stupeň využití hlavního fermentačního zařízení. Tyto výhody jsou zvláště výrazné ve velkých závodech s velkoobjemovými fermentory. Násadní kvasničné mléko se připravuje separací nekontaminovaného zralého média z dobře probíhající kultivace a skladuje se ve chlazených sbornících, obvykle při  $+5^{\circ}\text{C}$ .

Při výrobě krmných kvasnic ze syntetického etanolu je hlavním kultivačním procesem kontinuální kultivace s recirkulací odstředěného média. V jejím průběhu se hromaděním metabolitů popřípadě akumulací nečistot z používaných technicky čistých minerálních živin postupně zhoršují podmínky pro pomnožování kvasinek a po určité době je nutno pro pokles produktivity kultivaci přerušit. Na počátku nové kultivace se fermentory zakvašují násadním kvasničným mlékem získaným separací nekontaminovaného zralého média z počátku předchozího kultivačního cyklu. Propagační stanice se uvádí do provozu jen v ojedinělých případech. Provozní propagaci nepředchází vždy obvyklé laboratorní pomnožování čisté kultury, nýbrž první propagátor se většinou zakvašuje násadním kvasničným mlékem nebo pastou, které se uchovávají v laboratoři při  $+5^{\circ}\text{C}$  a čas od času překvašují v laboratorním fermentoru.

Kvalita násadních kvasnic je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících průběh a výsledky kultivací. Proto je třeba věnovat kontrole kvality násadních kvasničných koncentrátů náležitou pozornost a pravidelně sledovat aktivitu inokulačního materiálu.

K hodnocení kvality inokula je možno použít řady metod. Velmi běžnými hodnoticími kritérii v mikrobiologické praxi jsou např. počítání živých buněk metodami kultivačními [1], nebo počítání živých buněk metodami mikroskopickými za využití různých technik barvení [2, 3, 4, 5], popřípadě dalšími metodami např. kolorimetrickými [6].

V praxi se vitalita kvasničné kultury většinou stanovuje mikroskopicko-morfologickým hodnocením buněk [7], nebo technikou barvení podle Finka-Kühlese, kterou se rozlišují mrtvé a živé buňky barvením roztokem metylenové modři ve fosfátovém pufru [8]. Ačkoliv je tato metoda poměrně rychlá, je nevýhodná tím, že je značně subjektivní, protože v některých případech se těžko rozlišují buňky s oslabenou metabolickou aktivitou a proto mění metylenovou modř na leukoformu pomaleji a mohou být neprávem považovány za mrtvé buňky

[5, 8]. Proto jsou výhodnější metody objektivní. Spolehlivou metodou hodnocení fyziologického stavu kultury je fermentační pokus. Špatný fyziologický stav kultury se projeví prodloužením počáteční lag fáze růstu, nebo snížením růstové rychlosti kultury. Velkou nevýhodou tohoto testu je však jeho časová náročnost. Dalším možným a používaným kritériem hodnocení mikrobiálních kultur jsou respirační manometrické metody, založené na sledování změn ve výměně plynů [9, 10]. Z manometrických metod je nejpoužívanější metoda Warburgova, která se aplikuje na Warburgově přístroji. Při použití této metody je zde rovněž nutno počítat vždy s tím, že takové vyšetření je vždy náročné na pracnost a čas nejen při vlastní zkoušce, ale i při kalibraci přístroje.

Pro naše účely jsme se pokusili využít závislosti změn koncentrací rozpuštěného kyslíku v kvasničných suspenzích na intenzitě dýchání za využití přístroje na měření rozpuštěného kyslíku [11, 12, 13]. Metodu lze co do významu porovnat s Warburgovou technikou, ale je neporovnatelně jednodušší, kratší a počítá s minimálním laboratorním vybavením.

### Materiál a metodika

#### Mikroorganismus

Použili jsme kvasničný kmen *Candida utilis* 49, jenž pochází ze sbírky VÚKPS a používá se pro fermentace na syntetických půdách s etanolem i v průmyslovém měřítku.

#### Sledování změn rozpuštěného kyslíku

Ke sledování změn rychlosti spotřeby kyslíku jsme sestavili jednoduchou aparaturu (obr. 1).

Aparatura pro stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku obsahovala: analyzátor rozpuštěného kyslíku s detekční elektrodou (Vývojové díly ČSAV - Oxytest), vzduchovací akvarijní motorek, 400 ml kádinka, míchadlo. Celý systém je termostátován ultratermostatem na  $30^{\circ}\text{C}$ . V jednodušším provedení stačí k temperování a míchání laboratorní magnetická míchačka.

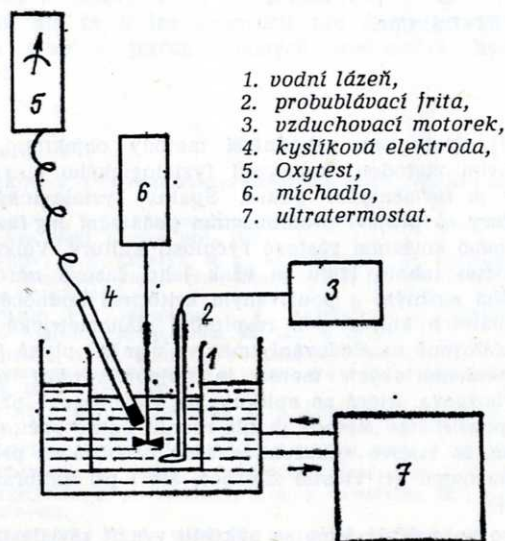
**Postup:** do kádinky s 300 ml vodovodní vody vytemperované na  $30^{\circ}\text{C}$  se vhání vzduchovacím motorkem vzduch až do nasycení tekutiny rozpuštěným kyslíkem. Potom se přidá 1 ml kvasničné suspenze obsahující asi 40 až 50 mg sušiny (50 g kvasničné pasty/250 ml vody) a 1 kapka etanolu a za nepřerušovaného mírného míchání se zastaví větrání. Od tohoto okamžiku se na analyzátor rozpuštěného kyslíku sleduje rychlost úbytku rozpuštěného kyslíku a vynesou se do grafu. Výhodný je automatický záznam na registračním přístroji.

Spotřebovávaný  $\text{O}_2$  jsme vyjadřovali pro jednoduchost jako  $Q_{\text{O}_2}$ , vyjadřující spotřebovaný rozpuštěný kyslík 1 gramem biomasy za 1 hodinu. Změny vitality kvasničných buněk (vyjádřené jako změny  $Q_{\text{O}_2}$ ) jsme sledovali u dlouhodobě uchovávaných kvasničných kultur (kvasničná pasta, kvasničné mléko) uložených v chladničce při  $+5^{\circ}\text{C}$ . Kultura kvasničné pasty se získala kultivací *C. utilis* na syntetické půdě s etanolem a následným odstředěním dokvašené kultury na laboratorní

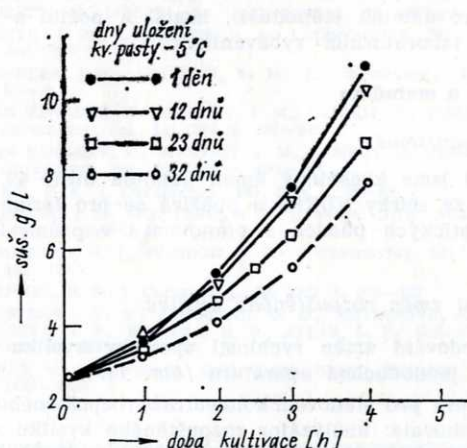


kalové odstředivce Westphalia LWA 205. Izolovaná pasta se balila do hliníkové fólie.

Kvasničné mléko se připravilo z kvasničné pasty zředěním vodou na suspenzi obsahující 9 % sušiny.



Obr. 1. Schéma aparatury pro stanovení  $Q_{O_2}$  kultury kvasinek



Obr. 2. Vliv stáří kvasničné pasty na fermentační aktivitu *Candida utilis* 49

#### Fermentační pokusy

Srovnávací kultivační pokusy se prováděly v laboratorním skleněném fermentoru o obsahu 30 l s plněním 14,5 l, opatřeným samonasávacím míchadlem typu Waldhof a cirkulačním válcem. Fermentor je vybaven automatickou regulací teploty a pH. Regulační pHmetr zaznamenává dávkování zdroje N (čpavkové vody) a zdroje C (syntetický etanol). Fermentační pokusy se prováděly při teplotě 30 °C a pH = 4,5. Základní živná půda obsahovala v 1 litru: 1 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 1,6 g  $KH_2PO_4$ , 0,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . Použité soli byly chemicky čisté a k vlastní přípravě živné půdy bylo použito vodovodní vody. Zdroj dusíku byl během fermentace doplňován přítokovým způsobem 25 % čpavkovou vodou, která se dávkovala společně se syntetickým etanolem ve formě lihočpavkové směsi v závislosti na změnách pH živné půdy během fermentace [14].

K inokulaci laboratorního fermentoru se používala kvasničná pasta v množství 10 g/l půdy, což odpovídalo

asi 2,3 g suš./l. Po upravení počátečního pH kyselinou sírovou na pH 4,5 se zahajovala fermentace přidávkem 20 ml předlohy syntetického etanolu. Při kultivaci se kontroloval růst stanovováním sušiny, filtrací odebraných 10 ml vzorků kvasničné kultury filtračními kelímky S<sub>4</sub>. Zfiltrovaná biomasa se v kelímku proplachovala 2 × 10 ml destil. vody a sušila se 4 hodiny při 105 °C.

#### Výsledky a diskuse

Na základě předchozích zkušeností jsme zjistili, že kultura kmene kvasinek *Candida utilis* 49 se pro fermentační účely nejvhodněji uchovává ve formě pasty v chladničce při + 5 °C. Pro pokusné účely bylo nutné zjistit po jakou dobu lze toto inokulum používat a kdy se podstatně zhoršuje fyziologický stav buněk. Fyziologický stav kvasničného inokula jsme hodnotili v první řadě fermentačním pokusem. Ze sledované kvasničné pasty uložené v chladničce při + 5 °C jsme v časových intervalech v průběhu asi 1 měsíce postupně odebírali inokulum pro fermentační pokusy v 30litrových laboratorních fermentorech. Z porovnání průběhu růstu jsme usuzovali na fyziologický stav kvasničné pasty (obr. 2). Z grafu vyplývá, že během 12 dnů úschovy v chladničce se podstatně nezhoršila vitalita uchovávaných kvasinek, ačkoliv celková doba kultivace se mírně prodlužovala.

Podstatné snížení fermentační aktivity nastalo po 23 dnech úschovy a výrazné zhoršení se projevilo po 1 měsíci úschovy, kdy samotná pasta vykazovala již známky rozkladu.

Z provedeného pokusu vyplývá, že při úschově kultury kvasinek ve formě kvasničné pasty je možné ji používat k fermentacím maximálně do 12. dne úschovy v chladničce. Po této době je nutné kulturu kvasničné pasty opět oživit překvašením.

Ověření fyziologické aktivity kvasničného inokula fermentačním pokusem je spolehlivé a jednoznačné, avšak v praxi je často třeba ověřit životaschopnost kultury v mnohem kratším čase.

K tomu jsme se pokusili využít přístroje na měření rozpuštěného kyslíku — Oxytestu.

Stejně jako při fermentačním pokusu jsme z uložené kvasničné pasty v chladničce odebírali postupně vzorky a z připravené kvasničné suspenze jsme hodnotili rychlost spotřeby  $O_2$  v závislosti na době úschovy pasty při + 5 °C. Pro jednoduchost jsme rychlost spotřeby rozpuštěného  $O_2$  vyjadřovali hodnotou  $Q_{O_2}$ , představující spotřebu  $O_2$  jednotkou biomasy za časový interval. Za normálních podmínek by rychlost úbytku rozpuštěného  $O_2$  v suspenzi měla být úměrná počtu živých buněk v kultuře kvasinek.

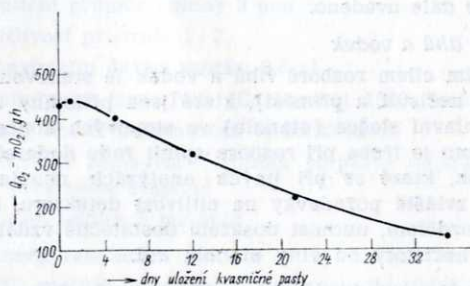
V pokusu (obr. 3) za využití přístroje na měření rozpuštěného  $O_2$  — Oxytestu bylo dosaženo u čerstvě izolované pasty získané po dokvašení kvasničné kultury hodnoty  $Q_{O_2} = 450 \text{ mg } O_2/\text{g} \cdot \text{h}$ , avšak tato hodnota se v době uložení při + 5 °C postupně snižovala. Během prvních 5 dnů byl pokles  $Q_{O_2}$  pomalejší, potom následovala do 12. dne fáze rychlejšího poklesu a opět fáze stabilizace. V průběhu 1 měsíce poklesla hodnota  $Q_{O_2}$  za podmínek uložení kvasničné pasty při + 5 °C asi o 2/3 původní hodnoty.

Obdobně byla zjišťována vitalita pomocí Oxytestu u chlazeného kvasničného mléka, jež může být rovněž dobrým zdrojem rezervního inokula. Změna  $Q_{O_2}$  kvasničného mléka zchlazeného na + 5 °C a obsahujícího 9 % sušiny byla v tomto případě výraznější v prvních pěti dnech a po ní následovala postupná stabilizace této hodnoty (obr. 4).

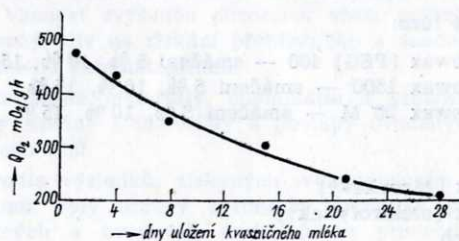
Ze vzájemného porovnání obou metod, tj. fermentač-



ního pokusu a měření rychlosti spotřeby  $O_2$  Oxytestem vyplývají některé zásady pro použití kvasničného inokula jako násadního materiálu. Z porovnání rychlosti růstu a  $Q_{O_2}$  je zřejmé, že kvalita inokula se při uchovávání mění, přičemž výraznější změny v kvalitě inokula nastávají po poklesu  $Q_{O_2}$  pod hodnotu 300 mg  $O_2$  /g .h, tj. asi po 12 až 14 dnech úschovy v chlazeném prostředí.



Obr. 3. Změny  $Q_{O_2}$  kultury kvasničné pasty v závislosti na době uložení při 5°C



Obr. 4. Změny  $Q_{O_2}$  kvasničného mléka (9% suš.) v závislosti na době uložení při 5°C

Za těchto podmínek uložená kvasničná kultura neztrácí svoji fermentační aktivitu ani po 30 dnech, je však nutno počítat s tím, že starší inokulum se projeví negativně na růstových parametrech kvasničné kultury.

Dlouho uchovávaná kultura není vhodná také jako inokulum pro srovnávací fermentační pokusy, kde se může projevit jako neznámá proměnná a tím srovnání znehodnotit. Pro srovnávací pokusy je třeba používat inokula maximálně 5 dnů stará. V provozní praxi, kdy se inokulum uchovává za chladu ve formě kvasničného mléka nebo pasty, je třeba zásobní inokulum vyměňovat nejpozději po 12 dnech.

#### Literatura

- [1] RAŠKA, K. et al.: Mikrobiologické vyšetřovací metody, SZN, Praha 1958.
- [2] MÜLLER, J., CHYTIL, F.: Barviva v mikroskopické praxi, Academia, Praha 1963.
- [3] GRAHAM, R. K.: Journal of the Institute of Brewing, 76, 1970 s. 16.
- [4] KETTERER, M.: Brauwissenschaft, 9, 1956, s. 59.
- [5] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky, SVTL, Bratislava 1957.
- [6] RECA, M. E.: Applied Microbiology, 16, 1968, s. 236.
- [7] Laboratorní kontrola surovin, pomocných látek a výrobků v lihovarském oboru, I. díl, ÚVÚPP, Praha 1968.
- [8] GRÉGR, V.: Návod k praktickým cvičením z kvasné technologie. VŠCHT, SNTL, Praha 1982.
- [9] KLEINZELLER, A., MÁLEK, J., VRBA, R.: Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii, Praha 1954.
- [10] GRÉGR, V., ŠESTÁKOVÁ, M.: Sborník VŠCHT - Potravinářství E 12, Praha 1953.
- [11] Analyzátor rozpuštěného kyslíku - prospekt Vývojové dílny ČSAV.
- [12] VINCENT, A.: Process Biochemistry, April 1974 s. 19.
- [13] VINCENT, A.: Process Biochemistry, August 1974 s. 31.
- [14] ŠTROS, F., PROKOP, A., HAUSER, K., ŠVOJGR, M., ADÁMEK, L.: Čs. autor. ověd. č. 158 954, 1974.

Adámek, L. - Rut, M. - Štros, F.: Hodnocení kvality násadních kvasnic při výrobě krmných kvasničných bílkovin. Kvas. prům. 24, 1978, č. 7, s. 153—155.

Popis možností kvalitativního hodnocení životaschopnosti uchovávaných chlazených kultur určených pro inokulační účely. Vitalita kvasničných kultur byla sledována fermentačním a oximetrickým stanovením.

Bylo zjištěno, že při uložení kvasničného inokula při +5°C byla částečná životaschopnost této kultury zachována i po 30 dnech. Optimální dobou pro využití těchto kultur jako inokulačního materiálu pro fermentační účely bylo stanovení na 12. dne stáří. Pro přesnější srovnávací pokusy bylo doporučeno používat uložené inokulum maximálně do 5. dne.

Ада́мек, Л. — Ру́т, М. — Штрос, Ф.: Оценка жизнеспособности заквасочных дрожжей, применяемых на заводах кормовых дрожжевых протеинов. Квас. прум. 24, 1978, № 7, стр. 153—155.

В статье рассматривается метод качественной оценки жизнеспособности дрожжевых культур, хранящихся в холодильной камере и предназначенных для применения в качестве закваски. Жизнеспособность определялась как сбраживанием, так и оксиметрически. Было установлено, что при хранении закваски в камере с температурой +5°C она сохраняет частичную жизнеспособность даже после 30-дневного складирования. Наибольшей жизнеспособностью отличается закваска, срок хранения которой не превышает 12 дней. Для экспериментов, включающих сравнение, следует применять закваску не старше 5 дней.

Adámek, L. - Rut, M. - Štros, F.: Evaluating the Quality of Yeast Inoculum Used in Plants Producing Fodder Yeast Protein. Kvas. prům. 24, 1978, No. 7, pp. 153—155.

The article deals with a method permitting to evaluate the viability of cold-stored yeast cultures kept for inoculation. The vitality of yeast cultures was determined by applying both fermentation and oximetric methods. The results indicate, that if the yeast inoculum is stored at 5 + °C it maintains its partial viability even after 30 days, but full activity can be expected only if the storage period is no longer than 12 days. Inoculum to be used in comparison tests must not be stored longer than 5 days.

Adámek, L. - Rut, M. - Štros, F.: Bewertung der Qualität der Anstellhefe bei der Produktion von Futterhefeeiweiß. Kvas. prům. 24, 1978, No. 7, S. 153—155.

Der Artikel enthält die Beschreibung der Möglichkeiten der Qualitativen Bewertung der Vitalität der gekühlten, für Inokulationszwecke aufbewahrten Hefekulturen. Die Vitalität der Hefekulturen wurde mittels Fermentations- und oximetrische Bestimmungen verfolgt. Es wurde festgestellt, daß bei der Aufbewahrung des Hefe-Inokulums bei +5°C die teilweise Vitalität der Kultur auch noch nach 30 Tagen erhalten blieb. Die optimale Zeit für die Anwendung dieser Kulturen als Inokulationsmaterial ist nach den Versuchsergebnissen bis zum Alter von 12 Tagen. Für präzisere Vergleichsversuche wurde empfohlen, das aufbewahrte Inokulum spätestens am 5. Tag zu benutzen.