

Nové kvasničné kmeny pro výrobu krmných kvasnic z etanolu

663.14:636.087

Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha

Podle doporučení PAG č.12 z roku 1972 pro výrobu jednobuněčných bílkovin (SCP) je jedním z hlavních požadavků výběr vhodného produkčního mikroorganismu [1]. Pro zpracování syntetického etanolu v našich podmínkách se osvědčily kvasinky *Candida utilis*, které se většinou používají při výrobě krmných kvasnic z klasických cukerných surovin. Ze sbírkového kmene byla připravena produkční kultura několikanásobným pasážováním, provedeným kultivacemi v syntetickém živném médiu s etanolem jako jediným zdrojem uhlíku a energie. Produkční kultura, takto získaná, se uchovává ve formě kvasničné pasty, která se obnovuje v pravidelných časových intervalech následnými kultivacemi na etanolu, při nichž se jako inokulum používají kvasnice — kvasničná pasta — získaná v předchozí kultivaci. Tento způsob udržování aktivní produkční kultury je z hlediska zachování optimálních životních podmínek velmi vhodný, zvláště pro kvasinky asimilující etanol.

Kultivace v laboratorním fermentoru, sloužící k přípravě produkční kultury, se provádějí stejně jako veške-

ré kultivace kvasinek na etanolu, za neaseptických podmínek s přísným dodržováním běžné čistoty; živné médium se nesteriluje, pouze fermentor se po důkladném vymytí horkou vodou dezinfikuje roztokem chlórového vápna, formalinu apod. Vzhledem k tomu, že se kultivuje v syntetickém médiu s etanolem a při nízké hodnotě pH, nebyly v průběhu dlouhodobého vedení produkční kultury zaznamenány žádné významné bakteriální kontaminace. Na druhé straně není vyloučena možnost kontaminace cizími kvasinkami, i když samotný substrát značně snižuje okruh případných kontaminantů. Tímto způsobem udržovaná produkční kultura se označuje z mikrobiologického hlediska jako prakticky čistá [2] a lze ji s úspěchem používat jako inokulum pro pokusné účely i pro provoz tak dlouho, dokud se nezmění její biochemické a mikrobiologické vlastnosti dané průběhem a výsledky kultivace v kontrolních podmínkách.

Během výzkumných prací bylo zjištěno, že při růstu kvasinek na etanolu vzniká jako vedlejší metabolit kyselina octová. Větší akumulace této kyseliny v médiu

byla vždy spojena se zhoršením výsledků kultivace [3]. Značné množství kyseliny octové se vytvářelo v základním syntetickém médiu, které se také používalo k udržování produkční kultury. Úpravou kultivačních podmínek např. snížením pH média nebo snížením koncentrace etanolu v médiu apod. se podařilo hromadění kyseliny octové omezit [4]. Nejúčinněji se v tomto směru osvědčil přidávek malého množství melasových lihovarských výpalků do živného média [5]; za jejich přítomnosti se nacházela kyselina octová v médiu v zanedbatelném množství a současně se značně zvýšila výtěžnost kvasničné biomasy. Výtěžnostní koeficient $Y_{x/s}$ okolo 0,65 dosažený při kultivaci v základním médiu se zvýšil přidávkou melasových výpalků až na 0,75.

Při pěstování produkční kultury v syntetickém médiu, zůstával mikroskopický obraz kvasničné kultury stálý, i když se měnily resp. zlepšovaly výsledky kultivace následkem vědomých zásahů do kultivačních podmínek, které však neměnily syntetický charakter média. Avšak při pokusném vedení produkční kultury v živném médiu s přidávkou melasových lihovarských výpalků byly pozorovány postupné morfologické změny kvasničné populace. Kultura pozbývala tvarovou vyrovnanost a ve značné míře se vyskytovaly buňky vyvíjející rozvětvené řetízky, které se při pěstování v základním syntetickém médiu neobjevovaly. Vznikla domněnka, že rozvoj těchto řetízkujících kvasničných buněk byl umožněn přítomností výpalků, které obohatily syntetické médium organickými sloučeninami. Tím se stala produkční kultura kmenově nejednotnou a protože poskytovala velmi dobré výsledky, byl proveden pokus o její rozdělení s cílem získat nové kvasničné kultury, vhodné pro využití etanolu k tvorbě biomasy.

MATERIÁL A METODIKA

Mikroorganismus

Produkční kultura vypěstovaná z kmene *Candida utilis* CCY 29-38-64 (ve sbírce RIFIS VÚKPS je vedena pod číslem 49) mnohonásobným pasážováním v živném médiu s přidávkou melasových lihovarských výpalků.

Substrát

Syntetický etanol asi 90 % hm. [93 % obj.], CHEZA, Litvínov.

Živná média

a) Sladinové agarové médium: 100 g sladového výtažku Pragomalt, 20 g promytého agaru, ad 1000 ml vodovodní voda, pH 5,5. Médium se plnilo do zkumavek a Petriho misek.

b) Syntetické agarové médium s etanolem: 5,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,76 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 g promytého agaru, ad 1000 ml vodovodní voda, pH 5,5. Médium se plnilo po 100 ml do Erlenmayerových baněk o objemu 300 ml, 0,5 ml syntetického etanolu bylo rozptýřeno na povrch vysterilovaného ztuhlého média.

c) Syntetické médium pro třepací baňky: 0,54 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,2 g močovina, 0,76 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 ml syntetického etanolu, ad 1000 ml vodovodní voda, pH 4,5. Etanol a močovina byly přidávány dodatečně do vysterilovaného média, močovina ve formě roztoku zfiltrovaného přes bakteriologický filtr. Sterilizace živných médií a) až c) byla provedena v autoklávu při 0,12 MPa po dobu 30 minut.

d) Základní syntetické médium pro 30l fermentor: živiny byly připraveny v koncentrovaném roztoku, obsahujícím v 1000 ml 35 ml 85% H_3PO_4 , 30 g KOH, 25 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; k rozpouštění živin byla použita vodovodní voda. 1 ml koncentrovaného roztoku živin odpovídal 1 g přírůstku kvasničné sušiny. Do příslušně zředěného kultivačního média ve fermentoru se dále přidával 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l média. Etanol se dávalo přítokovým způsobem spolu s hlavním podílem dusíkatého živin jako lihoamoníaková směs, ve které byl vzájemný poměr 4 obj. dílu syntetického etanolu (93 % obj.) k 1 obj. dílu amoniaku (25 % hm.). V lihoamoníakové směsi bylo rozpuštěno 0,2 ml odpěňovacího oleje/100 ml směsi.

e) Médium s výpalky: složení média viz d), do kterého se přidávaly melasové lihovarské výpalky (zahuštěné, sušina okolo 78 % hm.) v množství 1 g výpalků/l média.

f) Syntetické médium s vápníkem a železem: složení média viz d), pouze množství $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v koncentrovaném roztoku živin bylo zvýšeno na 32 g. Vápník a železo se přidávaly do média v zásobních roztocích, a to 0,1 ml na 1 g očekávaného přírůstku kvasničné sušiny. Zásobní roztok vápníku — 156 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ad 1000 ml vodovodní voda a zásobní roztok železa — 10,6 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ad 1000 ml vodovodní voda.

Kultivační metody

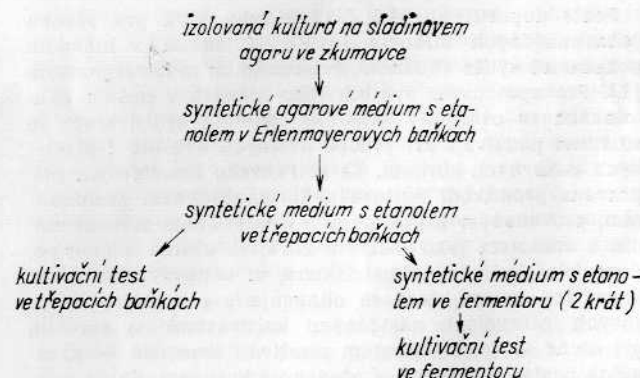
a) Kultivace na pevných médiích byly provedeny v termostatu při 30 °C, doba kultivace 48 až 72 hodin.

b) Kultivace ve třepacích baňkách byly provedeny v 500 ml varných baňkách s dvěma protilehlými zářezy ve stěně, objem kultivačního média byl 50 ml. Kultivace probíhala na rotační třepačce při 240 ot/min a teplota byla 30 °C.

c) Kultivace ve 30l fermentoru: podrobný popis fermentoru a kultivační postup byly uvedeny v dřívějších sděleních [6], resp. [7].

d) Postup rozdělení produkční kultury a izolace jednotlivých kultur: k získání jednotlivých kultur byla použita Kochova metoda [2] ve zjednodušeném provedení. Z kvasničné pasty produkční kultury byla připravena suspenze kvasinek ve sterilní vodovodní vodě a proveden rozsev na Petriho misky. Po inkubaci byly pro další práci vybrány misky s vhodnou hustotou kvasničných kolonií. Jednotlivé kolonie byly hodnoceny makroskopicky a mikroskopicky. Vybrané kolonie byly přeočkovány na sladinové agary ve zkumavkách. Narostlé kultury sloužily jako výchozí materiál pro další práci.

Širší výběr izolovaných kultur z hlediska využití etanolu pro tvorbu biomasy byl proveden testováním ve třepacích baňkách a vybrané kultury potom prověřeny kultivací ve fermentoru. Schéma namnožení kultur pro kultivační testy:



Analytické metody

Stanovení kvasničné sušiny, etanolu a kyseliny octové v kultivačním médiu a stanovení etanolu v substrátu jsou podrobně popsány v dřívějším sdělení [7].

- [144] KOTRLÁ, M.: Sborník čs. akademie zeměděln. věd 8-9, 1957, s. 915
- [145] ROBERTS, J. B.: J. Inst. Brew. 67, 1961, s. 337
- [146] HAUTKE, P.: J. Inst. Brew. 67, 1961, s. 337
- [147] KACSÓ, F., MURÁNYI, R.: Sörpar 16, 1969 s. 286
- [148] KOBUKO, E., KOWAKA, M., KUROIWA, J.: Proc. Congr. ASBC 1971, s. 262
- [149] ALDERTON, C., BAILEY, G. F., LEWIS, J. C., STITTE, F.: Analyt. Chem. 26, 1954 s. 983
- [150] SCHUR, F., PFENNINGER, H.: Brauwiss. 24, 1971, s. 151
- [151] VERZELE, M.: Proc. EBC Congr. 1967, s. 77
- [152] KRUEGER, R. K., REBERGER, A. J., BAYNE, P. D.: Proc. ASBC Congr. 1967, s. 84
- [153] LAMBERT, J. G.: Echo Brasserie 9, 1953 s. 133
- [154] SALAČ, V.: Kvas. 1945, s. 169; Brauwissenschaft 7, 1954, s. 197
- [155] SALAČ, V., KOTRLÁ, M.: Le petit journal du Brasseur, č. 593, s. 2508; 693, s. 2510, 1954
- [156] RIGBY, F. L., BETHUNE, J. L.: Proc. ASBC Congr. 1953, s. 174
- [157] NARZIß, L., REICHENEDER, E., FORSTER, A.: Brauw. 24, 1971, s. 145; 25, 1972, s. 239
- [158] HAUTKE, P., PETRÍČEK, D.: Chmelářství 43, 1970, s. 125; Wallerstein. Comm. 33, 1970, s. 89
- [159] MEILGAARD, M., TROLLE, F.: J. Inst. Brew. 66, 1960, s. 35
- [160] SALAČ, V., KOTRLÁ, M., VANCÚRA, M.: Brauwelt 1956, s. 189
- [161] SALAČ, V., KOTRLÁ, M., VANCÚRA, M.: Brauwissenschaft, 1957, s. 34
- [162] SALAČ, V., KOTRLÁ, M., VANCÚRA, M.: Brauwiss., 1954, s. 258; 1955, s. 5
- [163] SALAČ, V., KOTRLÁ, M., VANCÚRA, M.: Brauwelt 1956, s. 361
- [164] WINDISCH, W., KOLBACH, P., SCHLEICHER, R., DIETRICH, M.: Říšsko-německý patent č. 414913 z 10. 12. 1922
- [165] SALAČ, V.: Čs. patentní spisy č. 82825 82998 a 83000 z 1. září 1954
- [166] SALAČ, V., VANCÚRA, M., BEDNÁŘ, M.: Brauw. 12, 1959, s. 58
- [167] HEINZ, L.: Monatsschrift Br. 15, 1962, s. 47
- [168] SALAČ, V., DOSTAL, V.: Kvasný průmysl 1, 1955, s. 162
- [169] SELICE, W.: Tageszig. Brauerei 62, 1965, s. 202
- [170] NILSSON, J., SANDEGREEN, J.: Švédský patent č. 530937
- [171] VANCÚRA, M., BEDNÁŘ, M.: Čs. patent č. 974637 z 15. 11. 1960
- [172] BISHOP, L.: Proc. ASBC Congr. 1966, 64
- [173] SCHUR, F.: Schweiz. Br. Rundschau 80, 1969, s. 180
- [174] KUTTER, F.: Schweiz. Br. Rundschau 77, 1966, s. 317
- [175] NARZIß, L.: Der Doemensianer 10, 1970, s. 53
- [176] BARISOTTO, V. S., HANSEN, G. H., LESNIEWSKI, R.: Techn. Quart. MBAA 3, 1966, s. 43
- [177] CHAS PFIZER : BREWER Š J. 102, 1966, s. 744; 103, 1967, s. 25
- [178] HANSEN, G. H., BARISOTTO, V. S.: Proc. ASBC Congr. 1966, s. 131
- [179] WHITEAR, A. L., BUTTON, A. H.: Proc. EBC Congr. 1971, s. 129
- [180] WINDISCH, W., KOLBACH, P., VOGEL, W.: Woch. f. Br. 1933 s. 421
- [181] KOLBACH, P., SCHILFERTH, H.: Wiss. Bellage Brauerei 8, 1955, s. 3
- [182] PFENNINGER, M., SCHUR, F.: Schw. Brauerei-Räsch., 79, 1968, 241

Upozornění

Na straně 5 je ve vzorcích hořkých kyselin chybně uvedeno označení obou forem α místo správného β . Totéž platí o enolformě a ketoformě β kyselin na straně 6, kde místo β má být α .

a Dosídl [68] použili k vystření sladového šrotu vody s rozptýleným chmelovým mlátem. Zbylými klyk bílkovin se během rmutování obohatí mláto chmelové, rovněž zbytky hořkých látek přejdou do příštího chmelovaru a kromě toho se urychluje scezování. K mému zlepšovacímu návrhu [68] se připojují také Setige a Karst [69], kteří uvádějí, že úspory se pohybovaly od 6 do 7 %. Využitím kvasných dek se zabývali v roce 1948 sládek Kopulej, Vancúra a Bednář [71], kteří zjistili, že propíráním dek lze využít hořké chmelové látky, aniž by se chuť piva zhoršila.

Podle patentu Nilsson a Sandegrena [70] lze komplex β -hořkých látek využít z chmelového mláta předběžnou oxidací peroxidem vodíku, přičemž se podstatná část komplexu β -hořké kyseliny přemění ve sloučeniny v mladně rozpustné.

Názory na výrobu a využití chmelového extraktu při výrobě piva

Výzkum dospěl k názoru, že lepšího a rychlejšího využití hořkých chmelových látek se dosáhne jednak extrakčním uvolněním z chmelových zlátek a jednak jemným rozdrcením. V obou případech přichází sladina lépe ve styk s pryskyřičnými zlátkami. To se projevuje zejména ve stárnutí chmelu, v němž povrch těchto zlátek je zneprůstňován tvrdými pryskyřicemi, které bez extrakčního působení omezují styk sladin s měkkými pryskyřicemi. Nejříve byl tento způsob vyzkoušen Salačem pouze za použití rozpouštědel, jako např. hexanem nebo metylenchloridem, čímž bylo možno získat pouze hořké chmelové látky. Jak již bylo řečeno, uvedený způsob výroby možno podle Salače doplnit další extrakcí vroucí vodou, při níž se kromě chmelových pryskyřic získají ještě další sloučeniny, chmelové třísloviny a podobné látky ve vodě rozpustné. Takto vznikly tzv. standardní nebo dvoustupňové chmelové extrakty, namísto dříve používaných jednostupňových extraktů.

Chmelové extrakty by neměly být pouze přechodně obchodním zbožím, nýbrž prvotřídním výrobkem obsahujícím veškeré chmelové látky, pokud možno v neporušeném stavu.

Názory na výrobu a využití práškovitých chmelů a koncentrátů při výrobě piva

Kromě chmelového extraktu bylo během doby započato i s výrobou chmelového prášku. Zde jde o mechanickou úpravu chmele rozemláním. Buď se chmelové hlávky odsuší asi na 4 % vláhý a opatrně se rozemílají na jemný prášek podle Frommova způsobu a prodávají se pod zn. „Hopstabil“ nebo se chmelové hlávky podchladí asi na -40°C a potom se rozemílají a jemné částice listů, větének a ramének jako specificky lehčí se větráním oddělí, takže tím vzniknou dvě části; jedna obohacená lupulinem a ostatními zlátkami mi bohatými hořkými látkami a druhá je téměř prosátá hořkých látek, avšak za to bohatá látkami ve vodě rozpustnými, především polyfenoly, dusíkatými látkami, monosacharidy a polysacharidy, různými univerzálními solemi aj. Není pochyby, že tento výrobek zvaný „Hopfix“ je mnohem bohatší na hořké látky než Hopstabil a tedy mezi oběma druhy prášků jsou určité rozdíly. Oba druhy jsou do obchodu dodávány v igelitových nebo podobných neprodyšných obalech s inertním plynem CO_2 nebo N_2 . Tyto plyny mají zabránit oxidaci

hořkých látek, ačkoli není zcela jisté, že chmelový prášek bude dokonale zbaven vzdušného kyslíku.

Výhodou ve srovnání Hopstabilu s Hopfixem je u posledně jmenovaného zmenšení skladovacího prostoru ve prospěch jeho pivovarské vydatnosti, a to asi o 1/3, ovšem při podstatném nedostatku chmelové třísloviny a vůbec látek ve vodě rozpustných. Hopstabil je v podstatě jeně rozemletý přírodní chmel, který má být chráněn proti vzdušnému kyslíku v uzavřeném prostoru inertním plynem. Jeně mletí má jen lépe podpořit při chmelovaru lepší vyvaňování hořkých látek, které je však ve skutečnosti minimální.

Tyto výrobky byly během doby doplněny ještě dalšími. Tak Bishop [72] navrhuje používat lupulin místo chmelových hlávek. U tohoto výrobku se snižuje skladovací prostor rovněž asi o 1/3. V takovém lupulinu se lépe uchovává sílice. Lupulin se hodí lépe k dávkování při chmelování než chmel přírodní. Obchod nabízí pivovárům ještě další výrobek, tzv. chmelový práškovitý extrakt označovaný jako HEP s přísadou kyseliny křemičité jako stabilizátoru piva. V tomto případě byla směs promíslena ještě chmelovým extraktem.

Schur [73] doporučuje ke zpracování chmelových extraktů a prášků nejlevnější americké chmely i chmely různého původu, které se vyznačují vysokým obsahem hořkých látek. Podle jeho názoru nezáleží tak na nejakostní vůni, lépe řečeno pachu, neboť je známo, že chmelová sílice vytěká, ne z největší části vytěká. Není pochýb, že i když chmelová sílice vytěká, nevyravná se chmel amerického původu jakostním chmelům středoevropským, které mají větší obsah chmelové třísloviny, jejíž přítomnost ve chmelu není zanedbatelná. Kutter [74] porovnává chmelové prášky s chmelovými extrakty a chmelovými hlávkami. Upozdňuje, že chmelové extrakty, které byly vyrobeny dvojnásobnou extrakcí, mají jisté přednosti. Mají např. stabilní obsah hořkých látek, tříslovin apod., což u hlávkového chmele není. Jsou lehce skladovatelné, trvanlivé a nedávají prakticky žádné máto.

Na základě chmelové dávky a obsahu hořkých látek v pivě se počítá u várky s Hopfixem se skutečnou úsporou asi 6 % a u várky z mletého chmele s ještě nižší úsporou.

Narziš [75] analyzoval chmelový prášek a chmelové extrakty, které přídával při chmelovaru podle obsahu komplexu α -hořké kyseliny. Standardní chmelový extrakt poskytl vyváženou hořkost, když obsah hořkosti byl pod 30 mg/l.

Narziš [75] pojednává opět o možnosti dosáhnout úspory při chmelovaru. U chmelových prášků se dosahuje 15 %, u chmelových extraktů asi 20 % a u chmelových práškovitých extraktů asi 25 %, a to za předpokladu, že obsah α -kyseliny se pohybuje kolem 32–35 % z celkového obsahu.

Uvedené úspory mohou být vysvětleny rychlejší extrakcí hořkých látek v mladině a nižšími inhibičními ztrátami ve chmelovém mlátu. Také u chmelových extraktů se vyžaduje doba varu nejméně 90 minut, aby proběhla dostatečná izomerace nasazeného komplexu α -hořké kyseliny a zabránilo se tak nadměrné ztrátě v ležáckém sklepe.

Názory na výrobu a použití izomerovaných chmelových extraktů

Barisotto, Hansen a Lesniewski [76] provedli pokusné várky se standard-

Literatura

- [1] LEBERS H.: Chemie des Brauwesens 1926, vyd. Parcy.
- [2] LEBERS, H.: Wissenschaftliche Grundlagen von Mälzerei u. Brauerei 1950, vyd. H. Carl, Nürnberg.
- [3] MALCEV, J.: Technologie i obrabování pivovarského průmyslu 1948, Moskva.
- [4] SCHÖNELD, F.: Handbuch der Brauerei u. Mälzerei I. 1930, vyd. Parcy.
- [5] WÖLMER, W.: Berichte der Brauerei u. Mälzerei I. 1930, vyd. Parcy.
- [6] WÖLMER, W.: Berichte der Brauerei u. Mälzerei I. 1930, vyd. Parcy.
- [7] STÄNDL, A.: Neue Methoden der chemischen Beurteilung des Hopfens. Berichte der Versuchsanstalt für Brauindustrie in Böhmen 1925, 24.
- [8] SALAČ, V., DYR, J.: Gambrinus 62, 1943, 267; 63, 1944, s. 144.
- [9] WINDISCH, W., KOLBACH, P., SCHLEICHER, J.: Woch. f. Br. 1927, s. 453.
- [10] WIELAND, H., MARTZ, E., HOECK, H.: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 58, 1925, s. 2012.
- [11] WIELAND, H., MARTZ, E.: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 59, 1926, s. 2352.
- [12] De CLERK, J.: Lehrbuch der Brauerei I. a II. Versuchs u. Lehranstalt f. Br. 1905 Berlin.
- [13] HAYDUCK, M.: Woch. f. Br. 1885, s. 102; 1887, s. 39, 1888, s. 937.
- [14] BROWN, A., CLUB, Woch. f. Br. 1913, s. 267.
- [15] RICHARDSON, F. W.: Woch. f. Br. 1898, s. 160.
- [16] SCHIMMELT, J. L.: Woch. f. Br. 1937, s. 346.
- [17] GOVAERT, F., VERZELE, M.: Congrès inter. d. ind. de Fermis, Gand 1947, 297, Wallerstein, Lab. Comm. March 1957, s. 8.
- [18] BEVAERT, M., CORNAND, P.: Congrès inter. d. ind. de Fermis, Gand 1947, s. 236.
- [19] CARSON, F. J.: Amer. Chem. Soc. 73, 1951, s. 4652.
- [20] RIEDL, W.: Brauwiss. 4, 1951, s. 52; 4, 1951, s. 132; Ber. deutsch. chem. Gesel. 85, 1952, s. 672.
- [21] STÖCKER, H. R.: Schwein. Br. Rundschau 73, 1962, s. 138.
- [22] DE KEULELEIRE, D., VERZELE, M.: J. Inst. Brew. 76, 1970, s. 265.
- [23] MOŠTER, J., ČEPIČKA, J.: Kvasný průmysl 19, 1969, s. 145.
- [24] REGAN, J. P.: Proc. EBC Cong. 1969, s. 471.
- [25] RUDIN, A. D.: Inst. Brewing 66, 1960, s. 18.
- [26] VERZELE, M., DIERCKENS, J.: Inst. Brew. 75, 1969, s. 449.
- [27] KÖLLER, H.: J. Inst. Brew. 75, 1969, s. 174.
- [28] CLARK, B. J., HILDEBRAND, R. P.: J. Inst. Brew. 73, 1967, s. 282.
- [29] MOHR, O.: Jahrbuch V. L. B. 1913, s. 516.
- [30] CHABOT, A., WEVER, W.: Woch. f. Br. 1938 s. 122.
- [31] SALAČ, V., KOTRILÁ, M. a VANCURA, M.: Le petit journal du Brasseur 1953, s. 725, 742, 2463, 2466.
- [32] KOLBACH, P.: Woch. f. Br. 1939, s. 41.
- [33] JERUMANIS, J.: Bull. Univ. Louvain 65, 1969, s. 189.
- [34] JANSSEN, V. J.: J. Inst. Brew. 69, 1963, s. 460; Nature 196, 1962, s. 474.
- [35] BENGHOUGH, W., HARRIS, G., RICKETTS, W. R.: J. Inst. Brew. 1955, s. 134, 62, 1956, s. 390; 64, 1956, s. 22.
- [36] NARZIŠ, L., REICHENEDER, E., RESSLER, H.: Brauwiss. 23, 1970, s. 333.
- [37] PÖHLMANN, R.: Brauereibesitz u. Braumeister 1969, s. 557.
- [38] GURECKAJA, W. F., ESHOW, J. S., EMELIANOVA, S. I., KALASCHIKOVA, A. M., BALAKINA, L. P.: Spiritus ind. rus. Nro. 1, 1972, 35.
- [39] VERZELE, M., GOVAERT, F.: Waller. Lab. Comm. March 1957, s. 8.
- [40] HALL, R. D., GOUGH, H.: J. Inst. Brew. 62, 1956, s. 16.
- [41] BIRWISTLE, L. E., DAVIES, J. W., HOWARD, G. A. L., HUDSON, J. R., WHITEAR, A. L.: J. Inst. Brew. 6, 1963, s. 239.
- [42] STÄNDL, A.: Neue Methoden der chemischen Beurteilung des Hopfens, Berichte der Versuchsanstalt für Brauindustrie in Böhmen 1925, 24.
- [43] JAKSON, G. P., WALKER, J. K.: J. Inst. Brew. 1959, s. 459.
- [44] SILBERSTEIN, K. et al.: Brauw. 1964, s. 459.
- [45] RIGBY, F. L., BETHUNE, J. L.: Proc. A. M. Soc. Chem. 1953, s. 119.

ně zvyknou. Bohužel i v tomto případě, jakož i u izomerovaného chmelového extraktu se při výrobě neuplatňuje ani chmelová tříslovina ani komplex β -hořké kyseliny.

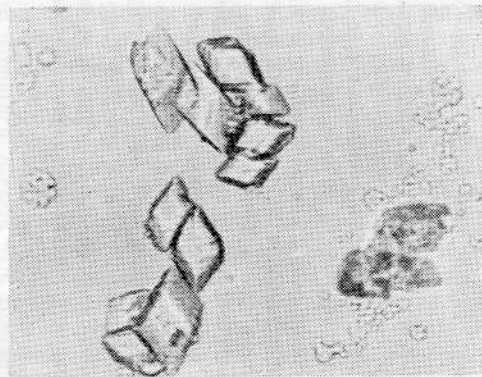
Také je v tom případě nedostatek dusíkatých látek důležitých pro výživu a pravděpodobně i látek sacharidické povahy, které podobné výrobky doplňují. Aplikují-li se tato porovnání i na chmel, nelze potom plně mluvit o nehošpodárném využití jeho hořkých látek, které jsou vzhledem k ostatním průvonným látkám do značné míry nutné.

Věřím, že tímto způsobem se dá vyrobit také pivo a bude-li toto přání otcem myšlenky, bude i zodpovědným posuzujícím až na „malé odchylky“ vyhovovat a také spotřebitel po delším postupném upravování, zvláště tam, kde výroba má malou tradici, si na takovou chuť piva zvykne.

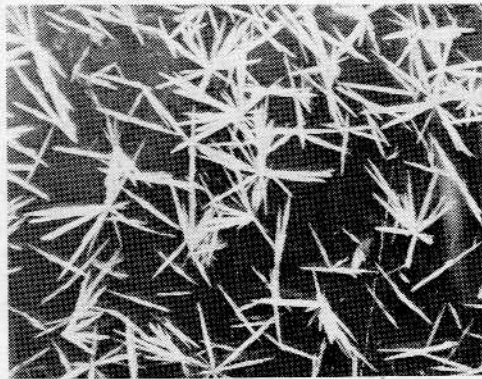
Bohužel, nebyl by to již tradičně chutnající výrobek a ve výrobě piva by to byl krok zpět. Pivo by se tak zařadilo do pestré řady mnoha nápojů, sloužících jen k zahnání žízně, jako například Coca-cola apod. Věřím však, že při výrobě piv plzeňského typu bude se velmi opatrně postupovat a že sládcí si uvědomí, že chmelovar je velmi důležitým procesem pro celou výrobu piva a že pouhý přidávek hořkých látek na konci výroby, nikdy plně nenahradí ty jemné nuance v chuti piva.

Výroba izomerovaných extraktů by ovšem mohla plným právem poukazovat i na jiné neméně závažné změny ve výrobě piva. Je to především přidávání různých škrobnatých surrogátů za slad a jiné, přičemž se již jeví jejich počáteční zdánlivě „nepatrné“ odchylky v chuti piva. Při takových „nepatrných“ změnách a bude jich během doby možná i více, dospělo by se nakonec jejich sečítáním k úplné změně charakteru nápoje.

Lektoroval Ing. M. Vančura



α -hořká kyselina



β -hořká kyselina. Foto Satač a Dyr

ním extraktem a izomerovaným, v mladíně a v pivě rozpustným extraktem, a to 90, popř. 60 minut.

Standardní extrakt byl vařen ve sladině a poskytl 41 % hořkých látek ve vystaveném pivě. V pivě, k němuž byl přidán izomerovaný extrakt po hlavním kvašení, ukázal se stupeň využití 71,9 %. Podle nového patentovaného způsobu vytvořená emulze poskytla při velkopokusu výtěžnost 89,6 %. Kdežto všechna ostatní pokusná piva byla v chuti, pěnívosti a stabilitě bílkovin přibližně rovnocenná pivu s použitím pozmeněné emulze, jevíla špatnou stabilitu. Piva, chmelená po hlavním kvašení, byla všechna označena jako citlivější proti světlu, než piva normálně chmelená.

Chmelové extrakty z části v izomerované formě se v rozličných zemích vyrábějí s rozdílným úspěchem. Důležitým kritériem těchto produktů je jejich komplexní složení. Výroba izomerovaného extraktu zahrnuje rozličné stupně. Tekutý nebo práškovitý α -koncentrát obsahuje podle Chase Píizera [77] také koncentrát huluponů a nespecifických měkkých pryskyřic i 12 % kyseliný hulupinový, spolu se chmelovou silicí. Kyselina humulinová nemá žádný vliv na biologickou trvanlivost piva.

Hansen a Barisotto [78] připravili preizomerovaný extrakt, který je ve vodě dispergovaný a může být tak zředěn, že v nutných případech může být přidáván přímo do piva. Přidáváním do mladiny hodinu před čerpáním bylo využito 40,5 %, kdežto u hlávkového chmele jen 25 %. Za přidavku emulze do ležáckých tanků dosahuje využití 73 % a k předfiltrování piva dokonce 79 %. Chladivá stabilita (48 hodin při 0 °C) a koloitní stabilita piva byly proměnlivé. Pivo, třepané 48 hodin při 25 °C a 24 hodin při 0 °C bylo uchováváno a porovnáváno s pivem konvenčně vyrobeným. Za použití izomerovaného extraktu je možno provést konečnou korekturu hořkosti piva.

Whitear a Button [79] uvádějí, že nejlepších výsledků „studeného“ chmelení bylo dosaženo, když se zředěné extrakty s obsahem 1–5 % α -kyselin dávají jemnou tryskou do pivaňho potrubí před filtrem. Tato injekce musí být tak rychlá, aby probíhala rovnoměrně s proudícím pivem. Když se extrakt přidává do tanku s pivem, jsou těžkosti s nedostatečným promícháním. Pro rychlé rozpustění jsou lepší alkalické izohumulonáty. Rozpouštění podporují ionty NH_4^+ , Na^+ a K^+ .

Názor na uvedené citace a celkové posouzení různých výrobních z chmele

Ze souhrnu citací výzkumných prací věnovaných průzkumu ekonomiky chmelovaru je patrné, že i nadále se může pivo dodat ona typická hořká chuť jen chmelovými látkami, ovšem pokud možno v neoxidované formě.

Dosud se tak děje většinou klasickým způsobem chmelení, vařením sladin s chmelovými hlávkami. Neví se ovšem přesně, jaké hořké látky při chmelovaru vznikají, ale jistě je známo, že za použití jakostního chmele tato hořkost je celkem nezměnná, tradičně uspokojivá.

Nutno také přiznat, že vlastně ani v dnešní době neexistuje nějaká obecná předloha vzorné chuti piva, která je mnohdy dosti odlišná na chuti konzumentů té které země. Je třeba si také uvědomit, že v některých zemích ztratili konzumenti téměř vůbec smysl pro chuťovou jakost piva, neboť pili i pivo s přísadou šampaňského vína, citrónů apod.

Uvažili se chut československých piv, myslím, že by mi nebyl ani v zahraničí vytýkáno patriotismus řeknu-li, že větším dílem jejich chut je přece jen dobrá nebo alespoň uspokojivá.

Uvažili se ještě „Plzeňský prazdroj“, který jediný se úzkostlivě přidržuje klasické výroby, zůstává v našem státě i v mnoha dalších zemích, jako stálý vzor ušlechtilého nápoje.

Tak je to v současné době, avšak neví se, jaké pivo bude předkládáno hlavně v zahraničí konzumentovi v budoucnu.

V posledních 20 letech se vyvinula v pivovarském průmyslu ve světovém měřítku téměř horečka v touze po zvýšení využitelnosti hořkých látek při výrobě piva. Vlnu na tom nese nepochybně bezpočet výzkumných prací v chemismu chmelových látek, které někdy až nezdůvodněně, nedostí seriózní desorientují do značné míry výrobu piva a svými důsledky možnosti lákají k odchýlení se od klasického způsobu chmelování používáním různých chemických výrobků.

Řadou výzkumných chmelových průmyslů se totiž dospělo ke směsi různých šetrných produktů, které kromě izomerů α -hořké kyseliny s největší pravděpodobností se ani v přirozeném stavu nevytvářejí. Jsou to různé více, méně hořké látky, ale rozhodně cizí, pokud jde o jakost hořkosti ve srovnání s původními látkami chmelovými, které by se mohly pravděpodobně již řadit do bohaté skupiny synteticky připravovaných hořkých látek, srovnatelných např. s chininem, kofeinem apod. Při té příležitosti je třeba vzpomenout i práce Reganovy [22], který mj. zjistil, že při chmelování vznikají kromě izomerů α -hořké kyseliny i přechodná stadia mezi nimi a původním komplexem α -kyseliny a které se asi uplatňují lepšími koloïdními i chutovými vlastnostmi.

I když jsem tedy stále stoupencem pokroku výroby chmelového extraktu, uvažuji o tom, zda by snad nebylo lépe používat do té doby, než se zdokonalí ještě výroba chmelového extraktu, bez ohledu na možné úspory, dobře uchovávaly chmel za dobrých podmínek než z něho vyrobený, špatně uchovávalý výrobek.

Jestliže se tedy ve výzkumných pracích stále objevuje tvrzení, že různé chmelové výrobky poskytují piva jakostnější chuti než piva vyrobená z pouhého jakostního chmele, pak toto tvrzení má asi více společného s obchodními zájmy než se skutečností.

Nesmí se přece zapomenout, že nejen ve chmelových extraktech, ale i ve chmelových koncentrátech jsou vzhledem k rozličné jakosti východního materiálu ve chmelu značné rozdíly. Jestliže se v takových výrobcích stále zdůrazňuje jen význam komplexu α -hořké kyseliny a z něho vyrobených izomerů, skrývá se za tím buď jen konkurenční zájem, nebo neznalost věci. Zatecké chmely obsahují na rozdíl od chmelů zahraničních kromě významného množství chmelové třísloviny i mnohem vyšší poměr komplexu β -hořké kyseliny ke komplexu α -kyseliny, a to u žateckých asi 1,9–2:1,1, kdežto u chmelů méně jakostních 1,2–1:3–1.

Příznivý poměr komplexu β -hořké kyseliny k α -kyselině se vyskytuje i u chmelových klonů. Pozornostně je však, že pouze klon č. 126, který byl již několik let pěstován na Zatecku, byl stále téměř týž jako u chmelů méně ja-

kostních, a proto byl vyřazen z pěstění. Je prokázáno, že klon č. 126 se projevuje také v chuti piva odlišně.

Rovněž ve frakcionaci analogů obou hořkých látek žateckých chmelů jsou podle Kofříle [44] na rozdíl od chmelů zahraničních určité rozdíly, a to v poměru humulonů ke kohumulonu a lupulonů ke kolupulonů. Většinou se jeví mnohem vyšší obsah humulonů nad kohumulonem a lupulonů nad kolupulonem. To není ovšem při mimořádné pivovarské jakosti žateckého chmele a vůbec chmele českého náhodný jev, to jsou spíše s nízkým obsahem silice a současně i s nízkým obsahem vysokomolekulárních frakcí typickými a nenapodobitelnými znaky.

Výzkumy komplexu β -hořké kyseliny ukázaly, že i když ve své původní podstatě nejeví nějaký významný vliv na tvorbu hořkosti, přece jeho oxidací hodnota uváděná jako humupony, přichází k uplatnění, a to tím více, čím více se oksiduje komplex α -hořké kyseliny. Komplex β -hořké kyseliny je tu tedy v uskladňování chmelu během doby jakousi druhou garniturou ve tvorbě hořkosti a jak se již dříve ukázalo, nikoliv špatnou.

U komplexu β -hořké kyseliny, možno také vzpomenout řady citací, v nichž se zdůrazňuje, že na vůni piva mají vliv nejspíš šetrné produkty komplexu β -hořké kyseliny, a to tím více, čím více je ho ve chmelové hlávce obsaženo. Bylo by ještě třeba zjistit, zda se na vůni podílejí všechny analogy lupulonů stejně nebo nestejně, někteří analog více a jiný méně. Nemí jistě bez zajímavosti, vzpomene-li se, že stěží sládky vždy na podzim po nové sklizni chmele přidávali i starý chmel, přičemž asi zcela empiricky vystihli vliv oxidované β -hořké kyseliny.

Nejkrásnějším případem využití chmelových hlávek jsou izomerované extrakty. Obsah izomerovaných látek je v pivě prý úplně rozpustný a tudíž jeho hořkost také zcela využitelná. Hořkost izomerovaných extraktů bude především asi rozdílná podle způsobu provedení izomerace, o čemž byla zmínka již v dřívějších kapitolách.

Především je problém, jak by se měl takový izomerovaný extrakt v konečné fázi výroby dávkovat do piva. Pravdou je, že nyní se při výrobě piva doporučuje používat izomerovaný extrakt jen z části, přičemž jedna část by proběhla normálním chmelováním. Tím by se ovšem dostala do piva kromě hořkých látek jen malá část třísloviny, což např. chuti čs. piva by sotva prospělo.

V poslední době uveřejnili *Pfenniger, Schur et al.* výsledky pokusných várek piv, k jejichž výrobě byly použity synteticky vyrobené kyseliny o vysoké čistotě. Zkoušky byly provedeny jednak laboratorně a jednak v poloproduktu. Podle autorů nebyly zjištěny v pivech takto vyrobených ve srovnání s pivy normálně vyrobenými jakékoliv rozdíly ani v hořkosti ani v celkové chuti.

Pro porovnání piv vyrobených různým způsobem bylo by však třeba především vědět, jak piva sloužící k porovnání, byla vyrobena, zda přímo z hlávkového chmele nebo chmelového extraktu, a to buď pouze z průmyslového nebo standardního, popřípadě i z jakého chmelového prášku. Pro posuzování chuti a celkových vlastností piv by to bylo velmi důležité.

Překvapuje, že autorům dostičila k výrobě jakostního piva pouze α -hořká kyselina, popřípadě i α -kyselina, byť i vysoké chemické čistoty. Ovšem vyrobit pivo lze z různých surovin a záleží jen na konzumentech, pokud si na

Stanovení sušiny v kvasničné pastě: 16 g pasty bylo resuspendováno v destilované vodě na konečný objem 1000 ml. 10 ml vzorku bylo usušeno v Al-misce, nejprve pod infralampou a potom v sušárně při 105 °C do konstantní váhy.

Stanovení dusíku v kvasničné pastě: 5 ml kvasničné suspenze, připravené pro stanovení kvasničné sušiny, se v Kjeldahlově baňce odpaří s několika kapkami konc. H_2SO_4 do sirupovité konzistence. Další postup spočívá ve spálení vzorku metodou podle Kjeldahla za použití selenu jako katalyzátoru. Vydestilování amoniaku se provádí mikrometodou v přístroji podle Roye-Markhama [8].

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. Rozdělení produkční kultury a izolace jednotlivých kultur

Při rozsevu kvasničné suspenze produkční kultury na sladinné agarové médium v Petriho miskách byly po 72 hodinách inkubace zjištěny morfologicky odlišné kolonie. Podle makroskopického vzhledu je bylo možno rozdělit na dvě skupiny:

skupina A — obsahovala menší kolonie \varnothing 1–1,5 mm s hladkým povrchem, čoučovitě vypouklé, bělavé barvy a neprůhledné,

skupina B — zahrnovala převážně větší kolonie \varnothing 2 až 4 mm, s hladkým povrchem, plošší. Velká většina kolonií měla zhruba 0,5 až 1 mm od kraje zřetelně zvýšený prstenec a mírně zvýšený střed — hrbolek. Kolonie byly průhledné, barvy o něco světlejší než sladinný podklad, hrbolek uprostřed byl bělavý.

Kolonie skupiny B početně převládaly.

Vzhled buněk obou morfologicky odlišných skupin kolonií byl vzájemně podobný: buňky byly většinou oválné až oválně protáhlé, 2,7–5,4 \times 5,4–10 μ m, vedle nich se více nebo méně vyskytovaly buňky větší a protáhlejší. Jediný pozorovaný rozdíl byl ten, že v koloniích skupiny A se nacházely občas buňky kulaté, které nebyly zjištěny v žádné kolonii skupiny B.

Výsledky tohoto prvního pokusu ukázaly, že v produkční kultuře se skutečně nacházejí nejméně dvě kmenově rozdílné kvasničné populace. Z jednotlivých kolonií na Petriho miskách byly naočkovány šikmé sladinné agary ve zkumavkách, a to 11 zkumavek kvasinkami z kolonií skupiny A a 25 zkumavek z kolonií skupiny B. Po 48 hodinách inkubace bylo opět provedeno mikroskopické hodnocení, podle kterého bylo možno rozdělit izolované kvasničné kultury na tři typy pravděpodobně kmenově rozdílné. Typ I se nacházel v kulturách získaných z kolonií skupiny A a byl pro něj charakteristický výskyt zakulacených až kulatých buněk. Z kolonií skupiny B byly odvozeny další dva typy izolovaných kultur, a to početně méně zastoupený typ II, vyznačující se protáhlým tvarem buněk a převládající typ III, mající oválný až oválně protáhlý tvar buněk. Izolované kultury byly dále podrobeny testování z hlediska využití etanolu k tvorbě biomasy.

2. Výsledky testování izolovaných kultur kultivací ve třepacích baňkách

Při testování kultur byl stanoven nárůst kvasničné biomasy, zbytkový etanol a provedeno mikroskopické sledování. Kultury byly hodnoceny podle dosaženého výtěžnostního koeficientu $Y_{x/s}$, kde x = přírůstek kvasničné sušiny v g a s = spotřebovaný substrát v g absolutního alkoholu. Celkem bylo ohodnoceno 11 kultur typu I (označeny I-1 až I-11), 4 kultury typu II (označeny II-2, II-3, II-8 a II-10) a zbývajících 21 kultur typu III (ozna-

čeny III-1 až III-25 s výjimkou čísel 2, 3, 8 a 10, která byla přiřazena kulturám typu II).

Izolované kultury typu I poskytl většinou nižší výtěžnostní koeficienty, které se většinou pohybovaly mezi 0,40–0,47, pouze u tří kultur bylo dosaženo hodnoty vyšší než 0,50. Nejvyšší výtěžnostní koeficient byl stanoven u kultury I-1, a to 0,59. Mikroskopicky bylo zjištěno, že kultury obsahují oválné až kulaté buňky značně rozměrově nevyrovnané a ve všech případech byl pozorován sklon k řetízování buněk i do rozvětvených útvarů.

S kulturami typů II a III bylo dosaženo podstatně vyšších hodnot výtěžnostních koeficientů, a to více než 0,70. Nejlepší výsledek mezi kulturami typu II poskytl izolát II-2 ($Y_{x/s}$ = 0,78) a u kultur typu III byly stanoveny vyšší výtěžnostní koeficienty u izolátů III-5, III-6, III-7 a III-17 ($Y_{x/s}$ = 0,78–0,79). Jednotlivé kultury byly většinou velmi vyrovnané, ve tvaru buňky byly oválné až oválně protáhlé — méně ve velikosti a mezi kvasničnými kulturami těchto dvou typů nebyly pozorovány žádné rozdíly ve tvaru buněk jako při kultivaci na sladinném agarovém médiu. V žádném případě nebyly pozorovány řetízkující tvary, buňky byly většinou spojeny po dvou.

Z výsledků testů ve třepacích baňkách je zřejmé, že kultury typu I se lišily nejen morfologicky od druhých dvou typů, ale také schopností využít etanol, která byla u nich podstatně nižší než u kultur typů II a III.

3. Výsledky testování vybraných izolovaných kultur kultivací ve 30 l fermentoru

K hodnocení růstu kvasinek na etanolu ve větším měřítku byly vybrány izolované kultury, které poskytly nejlepší výsledky při kultivaci ve třepacích baňkách. Celkem byly otestovány 4 izolované kultury: I-1, II-2, III-5 a III-6. Každá izolovaná kultura byla po získání dostatečného množství inokulačního materiálu nejprve dvakrát pasážována kultivací ve fermentoru a testování bylo provedeno s kvasničnou pastou, získanou při druhé pasáži.

Při kultivačních testech ve fermentoru byla použita tři různá živná média. Základní syntetické médium bylo původně používáno pro pěstování kvasinek *Candida utilis* na etanolu a podporovalo u této kvasinky značnou akumulaci kyseliny octové [viz úvod]. Druhá dvě živná média — s přidávkou melasových lihovarských výpalků a médium s vápníkem a železem — naopak omezovaly hromadění kyseliny octové, čímž se současně zvyšoval výtěžnostní koeficient. Kultivace v médiu s výpalky byla provedena především ke stanovení nároků izolovaných kultur na přítomnost výpalků. Produkční kultura, ze které byly izolovány, se stala na výpalcích závislou, resp. za její nepřítomnosti v médiu poklesl výtěžnostní koeficient o 25 %.

Během kultivačních testů ve fermentoru byl sledován růst kvasinek stanovením kvasničné sušiny v hodinových intervalech a každou druhou hodinu byl odebrán vzorek na stanovení kyseliny octové. Během kultivace bylo prováděno mikroskopické pozorování. Výsledky testů vybraných izolátů jsou uspořádány v tabulce 1. Izolované kultury II-2, III-5 a III-6 vykazovaly dosti podobné charakteristiky při jednotlivých kultivacích, výrazně se odlišovalo chování izolátu I-1.

Při kultivaci v základním syntetickém médiu se podle očekávání akumulovala ve značné míře kyselina octová; u izolátů II-2 a III-5 dosáhlo její množství na konci kultivace 1 g/l média, u izolátu III-6 1,8 g/l média. Nejmenší množství bylo nalezeno u izolátu I-1, a to 500 mg kyseliny octové/l média. Výtěžnostní koeficienty byly vesměs nižší — 0,62 a 0,63 u izolátů I-1, II-2 a III-6, pouze

Tabulka 1. Výsledky testování izolovaných kultur kulti-
vací ve fermentoru

	Izolovaná kultura			
	I-1	II-2	III-5	III-6
Kultivace v zá- kladním synte- tickém médiu				
$Y_{x/s}$	0,62	0,63	0,67	0,62
μ, h^{-1}	0,39	0,36	0,42	0,39
Kyselina octo- vá, g/l	0,50	1,0	1,0	1,8
N, %hm. v kvas- ničné sušině	—	10,19	9,26	9,26
Kultivace v mé- diu s výpalky				
$Y_{x/s}$	0,67	0,65	0,74	0,74
μ, h^{-1}	0,42	0,42	0,44	0,46
Kyselina octo- vá, g/l	0,50	0,40	0,40	0,40
N, %hm. v kvas- ničné sušině	—	9,42	8,80	8,56
Kultivace v mé- diu s prvky Ca a Fe				
$Y_{x/s}$	0,69	0,67	0,72	0,70
μ, h^{-1}	0,40	0,43	0,46	0,46
Kyselina octo- vá, g/l	0,50	0,40	0,40	0,40
N, %hm. v kvas- ničné sušině	—	10,32	9,31	10,00
Morfologie buněk				
tvar	oválné	oválné protáhlé	oválné protáhlé	oválné protáhlé
rozměry, μm	2,7—4 X X 4—8	4—5,4 X X 8—9,5	4—5,4 X X 6,7—8	4—5,4 X X 6,7—8
uspořádání	rozvět- vené řet- ízky	jednotli- vé a po 2	jednotli- vé a po 2	jednotli- vé a po 2

u izolátu III-5 byl stanoven $Y_{x/s} = 0,67$; u tohoto izolátu byla stanovena také vyšší specifická růstová rychlost $\mu = 0,42 h^{-1}$, než u ostatních izolovaných kultur.

V dalších testech se projevil příznivě vliv přidavku výpalků a také prvků vápníku a železa na potlačení akumulace kyseliny octové, jejíž obsah se v médiích na konci kultivace pohyboval většinou mezi 300 až 400 g/l média. Výjimku činila izolovaná kultura I-1, neboť vytvářela v průběhu kultivace na obou médiích více kyseliny octové než v základním syntetickém médiu; na konci kultivace bylo její množství stejné jako v základním médiu, tj. 500 g/l média. U této kultury není zcela přesné hovořit pouze o kyselině octové, neboť silná esterová vůně indikovala další vedlejší metabolity, pravděpodobně octan etylnatý. Zde je třeba poznamenat, že produkční kultura, pěstovaná v médiu s výpalky, rovněž vytvářela estery, resp. octan etylnatý. Z tohoto zjištění vyplývá, že producentem esterů v produkční kultuře byl izolát I-1. U ostatních izolátů nebyla tvorba esterů zaznamenána.

V závislosti na snížení obsahu kyseliny octové v kultivačním médiu kultur II-2, III-5 a III-6 se zkrátila doba kultivace (ze 7—7,5 na 5,5—6 hodin), zvýšila se specifická růstová rychlost a zvýšil se výťažnostní koeficient. Kultury III-5 a III-6 poskytly vysoké hodnoty výťažnostních koeficientů, a to 0,74 v médiu s výpalky a 0,70—0,72 v médiu s přidavkem prvků. U izolátu II-2 měl naopak

příznivější účinek přidavek vápníku a železa ($Y_{x/s} = 0,67$) než výpalků ($Y_{x/s} = 0,65$). Stejná závislost byla stanovena u izolátu I-1, ale příslušné koeficienty byly vyšší (0,69, resp. 0,67) ve srovnání s izolátem II-2.

Součástí hodnocení izolovaných kultur bylo také stanovení obsahu dusíku v kvasničné biomase. Množství dusíku se lišilo jednak mezi jednotlivými izoláty a jednak se měnilo podle složení živného média. Relativně nejvyšší obsah celkového dusíku byl zjištěn u všech izolátů vyrostlých v živném médiu s přidavkem melasových lihovarských výpalků, a to 8,56—9,43 % hm. N v sušině biomasy. Ze vzájemného porovnání množství dusíku v jednotlivých izolovaných kulturách vyplývá, že izoláty III-5 a III-6 obsahují téměř stejný obsah, a to 9,25 až 9,31 % hm. N v sušině s jednou výjimkou — 10 % hm. N v sušině u izolátu III-6, vyrostlém v médiu s vápníkem a železem. Izolovaná kultura II-2 měla ve všech kultivačních testech obsah dusíku vyšší až o 1 % hm. ve srovnání s ostatními izoláty. Izolovaná kultura I-1 nebyla podrobena analýze.

Během kultivačních testů ve fermentoru byly pozorovány ještě další rozdíly v chování a vlastnostech vybraných izolovaných kultur. Při kultivaci izolátu I-1 se ve všech pokusech tvořilo značné množství pěny, což vyžadovalo další a častější odpěňování, než u ostatních kultur. K dalším odlišným znakům izolátu I-1 patří tvorba pigmentu, neboť všechna odseparovaná média byla zbarvena růžově, nejintenzivněji při kultivaci s výpalky. U ostatních izolovaných kultur byla odseparovaná média bezbarvá.

Poslední markantní rozdíl izolátu I-1 od ostatních izolovaných kultur byl nalezen v morfolo-
gii buněk. Buňky izolátu I-1 byly oválné, drobnější, o rozměrech 2,7—4 X 5,4—8 μm a rostly převážně v útvarech rozvětvených řetězků. Ostatní tři izolované kultury měly navzájem podobné buňky, oválné protáhlého tvaru o rozměrech 4 X 6,7—8 μm . Izolovaná kultura II-2, která byla vypěstována z kultury typu II, vyznačující se protáhlým tvarem buněk při růstu na sladidlovém agarovém médiu, vytvářela při první kultivaci ve fermentoru mírně protáhlé buňky. Po dalších pasážích se buňky zkrátily, takže se nelišily od tvaru buněk izolátů III-5 a III-6. Všechny tyto tři kultury tvořily řetězky, buňky byly většinou spojeny po dvou, max. po čtyřech a ojediněle vytvářely útvary čtyř buněk, připomínající „čtyřlístky“.

Získané izolované kultury, otestované kultivací ve fermentoru, byly podrobeny identifikaci v Chemickém ústavu SAV u Doc. Kockové-Kratochvílové, DrSc. Výsledky identifikačních testů, které jsou podrobně popsány v jiném sdělení [9] ukázaly, že izolované kultury I-1, II-2 patří k druhu *Candida utilis*, které se mezi sebou liší v rámci přirozené variability. Izoláty III-5 a III-6 neodpovídaly žádnému standardnímu popisu a bylo konstatováno, že se jedná o nový druh kvasinek rodu *Candida*. Izoláty byly nazvány *Candida ethanolica* a jsou uchovávány ve sbírce CCY (CCY 29-83-1 a CCY 29-83-2). Vlastnosti izolátů se dále prověřují s výjimkou izolátu I-1, jehož nepříznivé technologické vlastnosti, např. silné pěnění, nedávají předpoklady pro průmyslové využití.

Původně byly za kontaminaci produkční kultury považovány kvasinky, vytvářející rozvětvené řetězky, které jsou charakteristické pro vyizolovanou kulturu I-1. Její nahromadění v produkční kultuře bylo v přímé souvislosti se zavedením výpalků do živného média. Výsledky identifikace izolátů III-5 a III-6 ukazují, že i zde se jedná o kontaminující kvasinky. Poslední z izolátů — izolovaná kultura II-2 — je pravděpodobně odvozena od původního výchozího sbírkového kmene *Candida utilis*, z něhož byla vypěstována produkční kultura.

Z výsledků práce dále vyplývá, že pro udržování produkční kultury ve formě kvasničné pasty není vhodné

přidávat do média melasové výpalky ani jiné podobné komplexní stimulatory organické povahy, ale že je nutné používat čisté syntetické médium. Doporučuje se médium s přidavkem vápníku a železa, které má podobný účinek na růst kvasinek na etanolu jako melasové výpalky. Dále je třeba provádět v určitých časových intervalech mikrobiologické ověření kmenové homogenity takto udržované produkční kultury kvasinek.

Literatura

- [1] PAG Guideline 12 on the production of single cell protein for human consumption. PAG Bulletin 2, 1972, s. 21.
- [2] GRÉGR, V.: Chemie a technologie droždí, SNTL, 1957.
- [3] RUT, M., ADÁMEK, L.: Výroční zpráva VÚKPS, Praha, 1973. kysých hydrolyzátů na mikroorganismy. XII. výroční konference o kvasinkách, Smolenice 1980
- [4] ADÁMEK, L., RUT, M., ŠTROS, F.: Kvas. prům. 22, 1976, s. 153.
- [5] MOSTECKÝ, J., ŠTROS, F., AUNICKÝ, Z., ADÁMEK, L., KRUMPHANZL, V., RUT, M., HRUBAN, A.: AO 169 587, 1975.
- [6] RYBÁŘOVÁ, J., ADÁMEK, L., PEČKA, K.: Kvas. prům. 24, 1978, s. 106.
- [7] RYBÁŘOVÁ, J.: Kvas. prům. 26, 1980, s. 156.
- [8] SYHOŘOVÁ, V., ŠTROS, F.: Kvas. prům. 1, s. 202, 1955.
- [9] RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F., KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Zeitschr. Allg. Mikrobiol. 20, 1980, č. 9, s. 579.

Rybářová, J.: Nové kvasničné kmeny pro výrobu krmných kvasnic z etanolu. Kvas. prům., 27, 1981, č. 4, s. 81—89.

Při výzkumu využívání etanolu kvasinkami *Candida utilis* se používá produkční kultura kvasinek, udržovaná ve formě kvasničné pasty, která se obnovuje následnými kultivacemi, při kterých kvasinky z předcházející kultivace slouží jako inokulum pro následující kultivaci. Při zavedení melasových lihovarských výpalků, stimulačních užití etanolu, do základního syntetického živného média byly pozorovány morfologické změny kvasničné populace. Z produkční kultury byly vyizolovány čtyři kmeny kvasinek s rozdílnými charakteristikami. Dva z nich, izoláty III-5 a III-6, byly určeny jako nový druh kvasinek a byly nazvány *Candida ethanolica*; další dva izoláty, I-1 a II-2, patřily ke kvasinkám *Candida utilis*. Izoláty III-5 a III-6 měly lepší růstové vlastnosti vzhledem k etanolu než izoláty I-1 a II-2. Z výsledků dále vyplynulo, že pro vedení produkční kultury ve formě kvasničné pasty v nesterilních podmínkách je nutné používat čisté syntetické živné médium a v určitých časových intervalech mikrobiologicky ověřovat kmenovou homogenitu produkční kultury.

Новые дрожжевые штаммы для производства кормовых дрожжей из этанола.

Рыбаржова, Я. Квас. prům. 27, 1981, № 4, стр. 81—89.

При изучении использования этанола дрожжами *Candida utilis* применяется культура дрожжей, сохраняемая в пастообразной форме, которая восстанавливается последующим культивированием, при котором дрожжи предыдущей культивации служат как инокулум для культивации следующей. При введении паточной барды, стимулирующей утилизацию этанола, в основную синтетическую питательную среду, наблюдались морфологические изменения дрожжевой популяции. Из культуры были изолированы четыре штамма дрожжей с разными характеристиками. Два из них, изоляты III-5 и III-6, были

установлены как новый штамм дрожжей и названы *Candida ethanolica*, следующие два изолята, I-1 и II-2, отнесены к дрожжам *C. utilis*. Изоляты III-5 и III-6 отличались лучшими свойствами при росте в отношении этанола, чем изоляты I-1 и II-2. Из результатов далее вытекает, что для сохранения производящей культуры в форме дрожжевой пасты необходимо применять чистую синтетическую питательную среду и в определенные интервалы проводить микробиологический контроль гомогенности штаммов производящей культуры.

Rybářová, J.: New Yeast Strains for Production of Feed Yeasts from Ethanol. Kvas. prům., 27, 1981, No. 4, pp. 81—89.

Production yeast culture is used for studying of ethanol utilization by the yeast *Candida utilis*. The culture is kept in state of the yeast paste that is renewed by successive culturings. Changes in yeast morphology were observed after addition of molasses stillage distillery slops, which stimulate the utilization of ethanol, into the basic synthetic culture medium. From the production culture four yeast strains with different characteristics were isolated. Two of them (III-5 and III-6) were determined as new yeast species and called *Candida ethanolica*; the others (I-1 and II-2) belonged to the yeast *Candida utilis*. Strains III-5 and III-6 grew better on ethanol in comparison with strains I-1 and II-2. Moreover, it was shown that for culturing of production yeast paste under non-sterile conditions it is necessary to use only synthetic culture medium and to check strain homogeneity of the production culture periodically.

Rybářová, J.: Neue Hefesämme für die Produktion von Futterhefe aus Äthanol. Kvas. prům. 27, 1981, No. 4, S. 81—89.

Bei dem Studium der Ausnützung des Äthanol durch Hefen *Candida utilis* wird eine Produktionshefekultur angewendet, die in der Form von einer Hefepaste erhalten wird. Diese Hefepaste wird erneuert durch nachfolgende Kultivationen, bei denen die Hefen aus der vorherigen Kultivation als Inokulum für die nachfolgende Kultivation dienen. Bei der Einführung der Brenner-Melasseschlempe, welche die Utilisation des Äthanol stimuliert, in das synthetische Grundnährmedium wurden morphologische Änderungen der Hefepopulation beobachtet. Aus der Produktionskultur wurden vier Hefestämme mit unterschiedlicher Charakteristik isoliert. Zwei von ihnen, und zwar die Isolate III-5 und III-6, wurden als eine neue Hefeart mit der Bezeichnung I-1 und II-2, gehörten zu den Hefen *Candida utilis*. Die Isolate III-5 und III-6 wiesen bessere Wachstumseigenschaften mit Hinsicht zu Äthanol als die Isolate I-1 und II-2 auf. Die Ergebnisse zeigten weiter, daß für die Führung der Produktionskultur in Form von Hefepaste in nichtsterilen Bedingungen ein reines synthetisches Nährmedium angewandt werden muß. In bestimmten Zeitintervallen muß weiter die Stammhomogenität der Produktionskultur mikrobiologisch überprüft werden.