

Mikrobiální kontaminace při výrobě krmných kvasnic z petrochemických surovin

863.127

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

Ve všech nesterilně vedených kultivacích se vyskytují vedle produkční kultury cizí mikroorganismy, označované souborně jako kontaminace. Kontaminující mikroorganismy jsou do média primárně vnášeny vzduchem, vodou, živinami a pomocnými látkami. K výživě mohou využívat jednak stejné živiny jako produkční kultura, jednak metabolity, popřípadě produkty lýze produkčních buněk. Další příčinou kontaminace v provozu bývá nedokonalé provádění sanitace. Přitom se silným zdrojem kontaminujících mikrobů stávají především ta místa provozního zařízení, která jsou těžko přístupná a kde zůstávají delší dobu zbytky kultivačního média. Na nich se snadno zachycují a rozmnožují hlavně hnilobné a proteolytické bakterie a znečišťují přiváděné čerstvé médium. Tato sekundární kontaminace může působit větší závady vzhledem k svému charakteru než kontaminace primární.

Škodlivost kontaminujících mikroorganismů při mikrobiálních výrobcích závisí na jejich množství a kvalitativním zastoupení a lze ji posuzovat ze dvou hledisek. Z hlediska technologického ohrožují kontaminující mikrobi rozvoj produkční kultury a tím zhoršují parametry kultivace a mohou snižovat jakost výrobku. Z hygienického hlediska může způsobovat kontaminace zdravotní závadnost výrobku a v krajním případě ohrožovat zdraví pracovníků bezprostředně zúčastněných ve výrobním procesu.

Při výrobě krmných kvasnic se mikrobiologické čistotě nevěnuje tak velká pozornost jako např. při výrobě pekařského droždí nebo v pivovarství. Je to především proto, že krmné kvasnice se na konci výrobního procesu podrobují tepelnému zpracování a to má za následek usmrcení vegetativních forem všech přítomných mikroorganismů. Při dodržení technologie sušení lze získat zdravotně nezávadný výrobek, ovšem za podmínky, že kontaminující mikrobi nepřetrvávají během výroby ve sporotvorném stavu. Proto je nutno věnovat kontaminaci větší pozornost, neboť mimo to, jak bylo uvedeno, může způsobovat technologické potíže, zvláště při kontinuálně vedených kultivacích.

Podrobný průzkum kontaminace při výrobě krmných kvasnic byl proveden v několika závodech zpracovávajících klasické suroviny, převážně melasu [1]. Podstatnou část bakteriální kontaminace tvořily gramnegativní, nesporulující, pohyblivé i nepohyblivé tyčinky patřící do čeledi *Pseudomonadaceae*, *Achromobacteriaceae* a *Enterobacteriaceae*. Bylo stanoveno, že nedosáhne-li kontaminace na začátku kvasného cyklu značných hodnot, bývá většinou v průběhu rozvoje produkčních kvasinek silně potlačena. Největším zdrojem kontaminující mikroflóry byla melasa a dále technologická voda. *Žváček aj.* [2] stanovili, že bakteriální kontaminace je překážkou při dlouhodobém kontinuálním lihovém kvašení. Periodické hynutí krmných kvasinek bylo pozorováno při kultivaci na lihovarských melasových výpalcích a současně bylo zjištěno hromadění nitritů v kultivačním médiu [3]. Předpokládanou příčinou akumulace nitritů je zvýšení aktivity enzymu nitrátrereduktázy u kontaminující mikroflóry v podmínkách limitace růstu kyslíkem. Tento nepříznivý vliv kontaminujících bakterií je dobře znám v pivovarské výrobě; bakterie přítomné v mladině tzv. mladinové bakterie, jsou schopny v množství 10^4 /ml redukovat dusičnany na dusitany, které mají letální účinek na kvasinky [4].

Při výrobě krmných kvasnic z petrochemických suro-

vin, z n-alkánů a syntetického ethanolu, se předpokládalo, že nebezpečí kontaminace bude mnohem menší ve srovnání s klasickými výrobami, založenými na zpracování sacharidických surovin. Tento předpoklad se zdál plně oprávněný především u ethanolu, který jednak nepřípadá v úvahu jako zdroj kontaminace a jednak se soudilo, že jeho přítomnost v kultivačním médiu bude redukovat rozvoj cizí mikroflóry, zavlečené do média jinými zdroji. Praxe však ukázala, že kontaminace nastává a při podceňování sanitačních prací může dosáhnout značného rozsahu.

Kontaminaci v provozu výroby krmných kvasnic z petrochemických surovin, resp. z n-alkánů popisuje ve svých pracích řada sovětských autorů. V roce 1967 izolovali z provozu *Kvasnikov aj.* [5] několik bakteriálních kmenů a zjistili, že jeden z kmenů *Pseudomonas pyocyanea* vykazuje antibiotické účinky na produkční kvasinky. *Grigorjeva a Šubina* [6] stanovily při výrobě krmných kvasnic z n-alkánů $6,8 \cdot 10^6$ — $7 \cdot 10^8$ bakteriálních zárodků/1 ml média; z tohoto množství bylo 70–90 % enterobakterií. Modelová kultivace v laboratorních podmínkách ukázala nepříznivý vliv metabolitů izolovaných bakterií na výtěžnost produkčních kvasinek. V provozu se nepříznivý vliv bakteriální kontaminace projevil snížením výroby a špatným fyziologickým stavem kvasinek, které nabývaly myceliální formy a aglutinovaly.

Naproti tomu uvádějí *Gradova a Kovalskij* [7], kteří se rovněž zabývali stanovením bakterií při výrobě krmných kvasnic, že mezi produkčními kvasinkami a bakteriemi nejsou žádné aktivní antagonistické vztahy. Množství kontaminujících bakterií se pohybovalo od 10^7 do 10^9 zárodků/1 ml média. Autoři stanovili, že při ustálení parametrů kontinuální kultivace kvasinek se ustáluje množství kontaminujících, podle autorů doprovodné mikroflóry na určité hladině. Tímto okamžikem získává pojem doprovodná mikroflóra jiný smysl, neboť se stává součástí biocenózy průmyslového fermentoru. Ekosystém fermentoru pak představuje biologicky organizovanou jednotku, která sestává z organismů vzájemně se ovlivňujících. Sledováním nutričních vztahů mezi produkční kulturou a doprovodnou mikroflórou byly zjištěny některé typy vzájemného metabolického působení. Například v podmínkách kultivace limitované kyslíkem je vzájemný vztah kvasinek a doprovodné mikroflóry regulován konkurencí o kyslík a tento vztah nazývají autoři pasivní antagonismus.

Jiný vztah mezi produkční kulturou a kontaminujícími mikroorganismy uvádějí při kultivaci kvasinek *Lodderomyces elongisporus* na n-alkánech *Hedlich aj.* [8]. Zjistili, že cizí mikroflóra, rovněž označovaná jako doprovodná, má na kvasinky stimulační účinky, neboť produkuje růstové látky pro kvasinky potřebné.

Při výrobě krmných kvasnic ze syntetického ethanolu byla několikrát sledována mikrobiologická čistota provozu a výsledky ukázaly značný rozsah bakteriální kontaminace. Mesofilních bakterií bylo nalezeno až 10^8 zárodků/1 ml a koliformních až 10^6 zárodků/1 ml média. Bakteriální znečištění je nepříznivé z hygienického hlediska, neboť mezi kontaminanty se vyskytovaly podmíněně patogenní i patogenní bakterie [12]. Výskyt koliformních bakterií je závažný, neboť ukazuje nedostatky v sanitačních pracích. K prevenci výskytu kontaminace je nutno systematicky dodržovat provozní sanitaci, pravidelně kontrolovat

nezávadnost především technologické vody a násadních kvasnic a důsledně odstraňovat ohniska kontaminace. Zatím nejsou přímé podklady pro hodnocení vlivu bakterií z hlediska technologického. V provozu sice dochází k výskytu prodloužených a řetízkujících kvasničných buněk, což může být způsobeno podle Grigorjevy a Šubiny [6] účinkem metabolitů produkovaných přítomnými bakteriemi. Avšak, jak bude uvedeno, řetízkující kvasinky byly několikrát z provozu izolovány a identifikace ukázala, že jde o jiné druhy, než je produkční kultura. Z výsledků série laboratorních nesterilně vedených kontinuálních kultivací, ve kterých bylo nalezeno různé množství bakterií včetně koliformních, lze usuzovat, že přítomnost kontaminace neovlivnila nepříznivě základní parametry kultivace [10].

Kromě bakteriální kontaminace byla v provozu výroby krmných kvasnic ze syntetického ethanolu zjišťována i přítomnost cizích kvasinek. V různém časovém období byly pozorovány kvasničné buňky morfologicky odlišné od produkční kultury, např. drobné kulaté buňky nebo naopak obří buňky nepravidelných tvarů nebo protáhle buňky, vytvářející rozvětvené řetízky až pseudomycelium. V roce 1975 [11] byly v provozu izolovány kvasinky rostoucí v řetízcích a byly identifikovány jako *Candida mycoderma* (*C. valida*). V laboratorních pokusech bylo stanoveno, že tyto kvasinky asimilují ethanol, ale nárůst biomasy odpovídal pouze 20–25 % nárůstu produkční kultury, kterou tehdy byly kvasinky *Candida utilis*. To znamená, že tato kontaminace byla z hlediska produkce značně nevýhodná. Za běžných podmínek kultivace, týkajících se především zachování homogenity kultivačního média, není kvasinková kontaminace schopná konkurovat produkční kultuře kvasinek. V nehomogenních fermentorech se spodním odtahem zralého média se však uměle v důsledku flotace akumuluje v horní části fermentoru a nabývá převahu nad produkční kulturou.

Identifikace kvasinek izolovaných z provozu výroby krmných kvasnic ze syntetického ethanolu v roce 1981 ukázala, že vedle produkční kultury *Torulopsis ethanolitolerans* [9] se ve fermentoru vyskytovaly další kvasničné kmeny, a to *Torulopsis candida* a *Candida utilis* [12]. Jeden z kmenů *Candida utilis* vykazoval růst v rozvětvených řetízcích. Při dalším velmi podrobném mikrobiologickém rozboru kvasinkové kontaminace v provozu, provedeném v témže roce pracovištěm SAV pod vedením RNDr. A. Kockové-Kratochvílové, DrSc. bylo nalezeno kromě kvasinek *Torulopsis ethanolitolerans* 6 dalších kvasničných kultur: *Candida utilis* (1 kmen), *Candida tropicalis* (2 kmeny), *Candida mogii* (1 kmen), *Torulopsis azyma* (3 kmeny), *Geotrichum candidum* (1 kmen) a jeden kmen dosud nepopsaného druhu rodu *Candida*. Schopnost růstu v rozvětvených řetízcích byla zjištěna u kvasinek *Candida tropicalis* a *Candida mogii* [13].

Jak již bylo zmíněno, kvasinky s uspořádáním buněk do rozvětvených řetízků nejsou v provozu žádané, neboť při jejich tendenci udržovat se v pění se při spodním odtahu hromadí v kultivačním médiu. Tím se ve fermentoru zvyšuje podíl zpěněného média, které působí potíže při separaci a takto kontaminovanou kultivaci je nutno předčasně ukončit. Kvasničná kontaminace přináší takto více problémů z technologického hlediska než kontaminace bakteriální a to souvisí úzce s konstrukcí fermentoru a typem odtahu zralého média. Je pravděpodobné, že většina kvasničných kontaminantů má horší růstové parametry vzhledem k ethanolu ve srovnání s produkční kulturou, jak bylo stanoveno v případě kontaminace kvasinkami *Candida mycoderma*. Z hygienického hlediska je dále nepříznivá přítomnost kvasinek *Candida tropicalis*, které jsou považovány za podmíněně patogenní, přestože v některých státech je jejich používání k výrobě krmných kvasnic povoleno.

Literatura

- [1] ČEJKOVÁ, A., NĚMČANSKÁ, H., VINTIKA, J.: Kvas. prům. 8, s. 272, 1962.
- [2] ZVÁČEK, O., BARTA, J., VINTIKA, J.: Čs. mikrobiologie 2, s. 292, 1957.
- [3] ILINA, L. D., LEVINA, L. Š., SEREDA, L. A.: Mikrobiol. ž. 42, s. 34, 1980.
- [4] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., ŠATAVA, J.: Kvas. prům. 22, s. 268, 1976.
- [5] KVASNIKOV, E. I., MELNIČENKO, L. A., SUMNEVIČ, M. T., PETRENKO, O. F.: Prikl. biochim. mikrobiol. 3, s. 653, 1967.
- [6] GRIGORJEVA, N. A., ŠUBINA, L. N.: Gidrol. lesochim. prom. č. 6, s. 4, 1981.
- [7] GRADOVA, M. B., KOVALSKIJ, J. V.: Mikrobiologija XVII, s. 259, 1978.
- [8] HEDLICH, R., FLEMING, I., WÜNSCHE, L.: Investigation of the biocoenosis in an unprotected fermentation process with the yeast *Lodderomyces elongisporus*. Tri-lateral conference on yeasts, Budapest, 27–31. July, 1981.
- [9] RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROUS, F., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Zeitschr. Allg. Mikrobiol. 21, s. 739, 1981.
- [10] ŠESTÁKOVÁ, M., RYBÁŘOVÁ, J., RUT, M., ŠTROUS, F.: Technologie velkovýroby kvasnic ze syntetického ethanolu s produkcí 100 kt/rok. Záv. zpr. VÚKPS, Praha, 1982.
- [11] ŠTROUS, F., AUNICKÝ, Z. a kol.: Kontinuální kultivace kvasinek na ethanolu s recirkulací odstředěného média. Záv. zpr. VÚKPS a Kolipjektu, Praha, 1976.
- [12] RYBÁŘOVÁ, J., ADÁMEK, L., RUT, M.: Racionalizace výroby krmných kvasnic v závodě Seliko-Kojetín. Záv. zpr. VÚKPS, Praha 1981.
- [13] RUT, M., RYBÁŘOVÁ, J., ADÁMEK, L., KARNET, J.: Racionalizace výroby krmných kvasnic v závodě Seliko-Kojetín. Záv. zpr. VÚKPS, Praha, 1982.

Rybářová, J.: Mikrobiální kontaminace při výrobě krmných kvasnic z petrochemických surovin. Kvas. prům., 29, 1983, č. 10, s. 225–227.

Při výrobě krmných kvasnic se vyskytuje nejčastěji kontaminace bakteriální a kvasinková, kontaminace plísněmi je většinou zanedbatelná. Podle literárních údajů, týkajících se výroby krmných kvasnic z petrochemických surovin, resp. z n-alkánů, může se vliv bakteriální kontaminace projevit některým z následujících způsobů. Kontaminující bakterie, resp. jejich metabolity mají buď inhibiční nebo stimulační vliv na kvasinky nebo jsou bez vlivu. Z dosud získaných výsledků sledování bakteriální kontaminace při kontinuální výrobě krmných kvasnic ze syntetického ethanolu vyplývá, že bakterie nemají žádný nepříznivý vliv na technicko-ekonomické parametry kultivace. Větším problémem z technologického hlediska se jeví kontaminace cizími kvasinkami, která se za určitých podmínek může ve fermentoru akumulovat ve značném rozsahu. Je pravděpodobné, že většina kvasničných kontaminantů má horší růstové parametry vzhledem k ethanolu než produkční kvasinky, což je z ekonomického hlediska nepříznivé. Z hygienického hlediska je však přítomnost bakteriálních kontaminantů nežádoucí, neboť se mezi nimi vždy vyskytují podmíněně patogenní i patogenní zárodky. To platí, i když v menší míře, o kvasničné kontaminaci. Proto je třeba věnovat mikrobiologické čistotě i při výrobě krmných kvasnic větší pozornost a provádět takové sanační opatření, které by kontaminaci co nejvíce omezovalo.

Рыбаржова, Я.: Микробные загрязнения при производстве кормовых дрожжей из нефтехимического сырья. Квас. прум. 29, 1983, № 10, стр. 225–227.

При производстве кормовых дрожжей чаще всего встречается загрязнение бактериальное и дрожжевое; загрязнение плесенью обычно пренебрежимо. По литературным данным, касающимся производства кормовых дрожжей на базе нефтехимического сырья, или же из n-алканов влияние бактериальной загрязненности может проявиться некоторым из следующих способов. Контаминирующие бактерии, или же их метаболиты оказывают замедляющее или стимулирующее действие на дрож-

жи, или остаются без влияния. По до сих пор приобретенным данным по исследованию бактериальной контаминации при непрерывном производстве кормовых дрожжей из синтетического этанола вытекает, что бактерии не оказывают никакого неблагоприятного влияния на технико-экономические параметры культивирования. Большой проблемой с технологической точки зрения является контаминация чужеродными дрожжами, которая при определенных условиях может в ферменторе возрасти до значительного объема. Можно считать правдоподобным, что большинство дрожжевых контаминантов отличается худшими параметрами роста в отношении к этанолу чем продуктивные дрожжи, что является с экономической точки зрения неблагоприятным. С гигиенической точки зрения однако наличие бактериальных контаминантов является нежелательным ввиду того, что среди них встречаются условно патогенные и патогенные зародыши. Это справедливо, хотя в меньшей степени и для дрожжевой контаминации. Поэтому необходимо уделять микробиологической чистоте и при производстве кормовых дрожжей большее внимание и проводить такие санитарные мероприятия, которые бы по возможности наиболее органично ограничили контаминацию.

Rybářová, J.: Microbial Contamination of Fodder Yeast Production from Petrochemical Raw Materials. Kvas. prům. 29, 1983, No. 10, p. 225—227.

The most frequent contamination in fodder yeast production are bacteria and yeasts. The contamination by molds can be neglected. According to published results, the effect of bacterial contamination in fodder yeast production from petrochemical raw materials can manifest itself by one of the following manners: Bacteria contaminated and their metabolites resp., have inhibitory or stimulatory effect on yeasts or are without any effect. The present results of the studies of bacterial contamination during continuous production of fodder yeast from synthetic ethanol show that bacteria have no unsuitable effect on economic parameters of the culture. From the standpoint of technology the greater problem seems to be a contamination with wild yeasts. The contaminated yeast can accumulate in the fermenter under the certain conditions. It is probable that the majority of yeast contaminants has worse growth characteristics with respect to ethanol in comparison to the production

strain. This is unsuitable from the standpoint of economy. The presence of bacterial contaminants is unsuitable with respect to the standpoint of hygiene since some of bacterial strains can belong to pathogenes. Almost the same can be said about yeast contaminants. From this follows that more attention must be devoted to the prevention and elimination of these infections in the fodder yeast production.

Rybářová, J.: Mikrobielle Kontamination bei der Produktion von Futterhefe aus petrochemischen Rohstoffen. Kvas. prům. 29, 1983, Nr. 10, S. 225—227.

Bei der Futterhefeherstellung kommt am häufigsten die Kontamination durch Bakterien und Hefen vor, wogegen die Kontamination durch Schimmelpilze meist unbedeutend ist. Nach den Literaturangaben, welche die Futterhefeherstellung aus petrochemischen Rohstoffen, bzw. n-Alkanen betreffen, kann die bakterielle Kontamination auf folgende Weise entstehen. Die kontaminierenden Bakterien, bzw. ihre Metabolite, weisen entweder einen inhibierenden oder stimulierenden Einfluß auf die Hefen auf, oder sie haben keinen Einfluß. Die Ergebnisse der Verfolgung bakterieller Kontamination bei kontinuierlicher Futterhefeherstellung aus synthetischem Äthanol zeigten, daß Bakterien keinen ungünstigen Einfluß auf die technisch-ökonomischen Parameter der Kultivierung haben. Als ein wichtigeres Problem von technologischen Standpunkt hat sich die Kontamination durch Fremdhefen erwiesen, die sich unter bestimmten Bedingungen im Fermenter in einem beträchtlichen Ausmaß akkumulieren kann. Es erscheint als wahrscheinlich, daß die meisten Hefekontaminanten in der Beziehung zu Äthanol schlechtere Wachstumsparameter als die Hefen des Produktionsstammes aufweisen, was als ein ökonomisches Positivum angesehen werden kann. Vom hygienischen Standpunkt ist jedoch die Anwesenheit bakterieller Kontaminanten unerwünscht, weil unter diesen Kontaminanten immer auch bedingt pathogene und auch pathogene Keime vorkommen. Dasselbe gilt, wenn auch in einem begrenzten Ausmaß, auch für die Hefekontaminanten. Man sollte daher der mikrobiologischen Reinheit auch bei der Futterhefeherstellung mehr Aufmerksamkeit widmen und im Betrieb geeignete Sanitations-Maßnahmen für eine womöglich wirksame Kontaminationsbegrenzung durchführen.