

Vliv těkavých organických kyselin v melase na lihové kvašení a produkci kvasničné biomasy

663.5 664.151.2
663.14 663.14.036

Ing. JAROSLAVA LANGPAULOVÁ, Výzkumný ústav koncernu Konzervárny a lihovary, Praha

Klíčová slova: melasa, lihové kvašení, ethanol, kyselina octová, kyselina mravenčí, kyselina máselná, prahová hodnota, kvasinky, citlivost, inhibitor, fermentace.

Jakost melasy jako základní suroviny pro výrobu lihu a droždí je ovlivňována složením jejího necukerného podílu, který tvoří asi 30 % hm. melasy. Relativně malá část necukerného podílu je kvasinkami asimilovatelná a potřebná pro kvasný proces, zbývající část tvoří látky balastní, z nichž některé při vyšších koncentracích mohou působit jako inhibitory kvasných procesů. Jde o látky, které se do melasy dostávají jednak z řepy, dále v průběhu technologického procesu v cukrovaru, popř. v důsledku činnosti kontaminujících mikroorganismů. Mezi tyto složky melasy patří také těkavé kyseliny.

Tabulka 1

Kampaň	Obsah těkavých kyselin v melase [v hm. % CH ₃ COOH]		
	min.	max.	průměr
1979/80	0,62	1,20	0,77
1980/81	0,58	1,28	0,90
1981/82	0,85	1,20	1,50
1982/83	1,50	1,50	1,23
1983/84	0,67	1,12	0,89
1984/85	0,90	1,20	1,02

V rámci několikaletého průzkumu složení tuzemské melasy z hlediska výroby droždí a lihu byl sledován i obsah těkavých kyselin. Při statistickém vyhodnocení jejich celkového obsahu ve vztahu k výtěžkům finálních produktů byla zjištěna korelace s výtěžky kvasničné biomasy. Vliv na produkci ethanolu nebyl jednoznačný, projevilo se pouze v souvislosti se zvýšenou kontaminací melas baktériemi kyselinotvornými, jejichž počet se výrazně zvyšoval od hranice 1 % hm. těkavých kyselin v melase [1]. Celkový obsah těkavých kyselin v tuzemských melasách od r. 1979 uvádí tab. 1. V průměru se jejich obsah pohybuje kolem 1 % hm. v melase, rozdíly mezi různými melasami činí až 120 %. Vzhledem k tomu, že účinky jednotlivých kyselin na kvasinky nejsou ekvivalentní, je důležitá i znalost jejich poměrného zastoupení v melase.

Tabulka 2

Kyselina	Obsah kyselin v melasách z kampaň 1984/85 [hm. %]		
	min.	max.	průměr
mravenčí	0,280	0,419	0,329
octová	0,389	0,575	0,456
propionová	0,023	0,057	0,040
isomáselná	stopa	0,030	0,015
máselná	0,042	0,083	0,067
isovalerová	stopa	0,030	0,016
valerová	stopa	0,020	0,012
hexanová	stopa	0,027	0,008

V tab. 2 jsou uvedeny obsahy těkavých organických kyselin v tuzemských melasách z kampaň 1984/85, které stanovilo analytické oddělení našeho VÚ ve spolupráci s katedrou chemie a technologie sacharidů VŠCHT [2].

Obsah těkavých kyselin v melase a jejich vliv na produkční kmeny kvasinek byl studován v řadě prací [3, 4, 5, 6, 7]. Značný význam je přisuzován obsahu kyseliny mravenčí a máselné v melase, jako možným inhibitorům fermentačních procesů. Schiweck [3] zjistil např. v jiho-německých melasách zvýšení obsahu kyseliny mravenčí až o 33 % v důsledku používání vyššího množství formaldehydu při difuzi v cukrovarech.

Na základě zjištěných koncentrací organických těkavých kyselin v tuzemských melasách a citovaných údajů o jejich inhibičních účincích na kvasinky byly pro podrobnější studium zvoleny kyseliny mravenčí, octová a máselná.

MATERIÁL A METODIKA

Byly testovány dva průmyslové kmeny kvasinek, uchovávané ve sbírce kvasinek VÚKL:

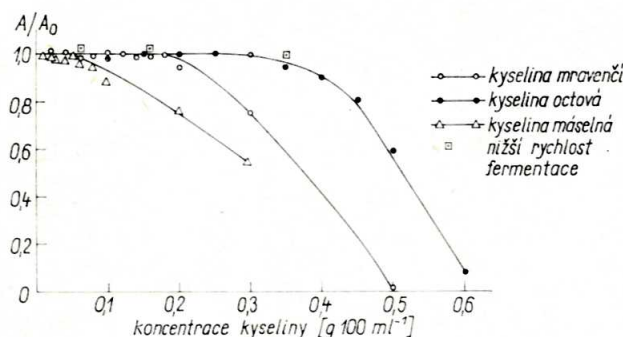
Saccharomyces cerevisiae LK 01/1 — lihovarský kmen, lihovar Kolín
Saccharomyces cerevisiae 03/26 (hybrid) droždářský kmen, droždárna Nýřany.

Vliv koncentrace kyseliny mravenčí, octové a máselné na kvasinky byl hodnocen laboratorními fermentačními zkouškami používanými při stanovení výtěžků droždí a lihu z melas [1]. Zkoušky byly prováděny jednak na syntetické půdě podle *Zaunera* [4] v modifikaci s 12,5 % sacharosy pro anaerobní fermentaci a s 5 % sacharosy pro aerobní kultivaci na třepacím stroji. Do sterilní půdy byly přidávány jednotlivé kyseliny v odstupňovaných koncentracích, pH substrátu bylo podle potřeby upraveno kyselinou sírovou na počáteční hodnotu 4,5 pro anaerobní fermentaci a 5,1 pro aerobní kultivaci. Druhá série zkoušek byla provedena na melasových půdách z melas různého složení se standardními přísadkami 0,01 až 0,10 g kyseliny mravenčí na 100 ml půdy. Pro lihové kvašení byly použity nesterilní melasové půdy s koncentrací 0,08 g . 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí ve výchozí půdě, pro droždářskou fermentaci byla půda povařena 1/2 hodiny při pH 4,8 a pH půdy dodatečně upraveno hydroxidem sodným, koncentrace kyseliny mravenčí v původní půdě odpovídala asi 0,02 g . 100 ml⁻¹.

Při fermentačních zkouškách byla sledována rychlost tvorby ethanolu na základě vývinu CO₂, výtěžek alkoholu, nárůst kvasničné biomasy, pH a zbytkový cukr v prokvašené půdě v porovnání s kontrolní fermentací, tj. na půdě bez přísadky kyselin jako inhibičního faktoru. Alkohol byl stanoven pyknometricky, vývin CO₂ podle úbytku váhy, kvasničná sušina vázkově po odstředění a promytí destilovanou vodou vysušením při 105 °C do konst. váhy, pH elektrometricky, zbytkový cukr metodou podle *Schoorla* [9].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vliv stoupajících koncentrací kyseliny mravenčí, octové a máselné v substrátu na lihovarský kmen kvasinek byl hodnocen na základě rychlosti kvašení, výtěžku alkoholu po 72 hodinách fermentace — A [mla/100 g sacharosy] a nárůstu kvasničné biomasy B [g kvasničné sušiny/100 g sacharosy] v poměru k substrátu bez přídavku kyselin jako inhibičního faktoru — A_0 , B_0 . Pro pokusy byla záměrně zvolena varianta pH substrátu v kyselejší oblasti podle provozních podmínek kvašení, kde se při přítokovém způsobu dávkování melasy pohybuje pH v rozsahu 4,0 až 5,1. Na pH prostředí závisí stupeň disociace kyselin a tím i jejich inhibiční účinek. Na obr. 1 jsou graficky znázorněny „inhibiční křivky kvašení“. Z průběhu křivek je zřejmé, že do určité prahové hodnoty je výtěžek alkoholu konstantní, potom postupně klesá. Snížení rychlosti kvašení v počáteční fázi kvašení bylo

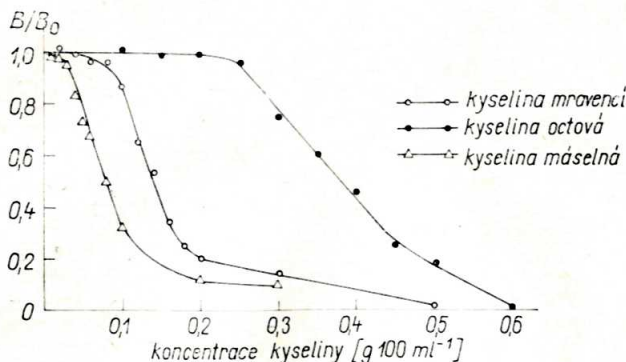


Obr. 1. Vliv koncentrace těkavých kyselin na produkci ethanolu (lihovarský kmen kvasinek LK 01/1, pH 4,5–4,2)

u kyseliny mravenčí zaznamenáno již při nižší koncentraci než pokles výtěžku alkoholu. Mezní koncentrace testovaných kyselin, při kterých nebyla ještě ovlivněna rychlost kvašení a výtěžek ethanolu, odpovídají 0,14 g. 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí, 0,30 g. 100 ml⁻¹ kyseliny octové a 0,05 g. 100 ml⁻¹ kyseliny máselné v substrátu.

Obrázek 2 vystihuje závislost růstu lihovarských kvasinek na koncentracích testovaných kyselin. Je zřejmé, že růst je inhibován silněji než kvašení, zejména u kyseliny mravenčí a máselné. Inhibiční křivky růstu mají také poněkud jiný průběh. V první fázi inhibiční křivka mírně klesá, v druhé fázi má lineární průběh a prudce klesá až do určité hodnoty, od které se snižuje podstatně pomaleji, než by se očekávalo.

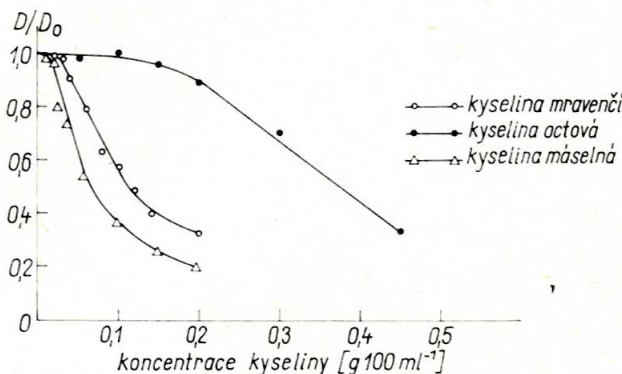
Tento jev zjistil Röcker [8] u kyseliny mléčné a octové a vysvětluje to nižším obsahem alkoholu a tím vyšším



Obr. 2. Vliv koncentrace těkavých kyselin na růst lihovarských kvasinek (lihovarský kmen kvasinek LK 01/1, pH 4,5–4,2)

obsahem cukru, který působí jako ochrana kvasinek před působením kyseliny. Prahové hodnoty nebyly tak výrazné jako u kvasných křivek. Prokazatelné ovlivnění růstu kvasinek bylo zaznamenáno od koncentrací vyšších než 0,08 g. 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí, 0,25 g. 100 ml⁻¹ kyseliny octové a 0,03 g. 100 ml⁻¹ kyseliny máselné v substrátu. V lihovarské technologii pracující s recirkulací kvasničné biomasy se sice za normálních technologických podmínek počítá pouze s omezeným nárůstem kvasinek nezbytným pro jejich doplnění a obnovení, dlouhodobější inhibice jejich růstu se však projeví v dalších kvasných cyklech nedostatečným množstvím kvasinek a tím i enzymového systému nutného pro zkvašení přítomného cukru, popř. zhoršením jejich fyziologického stavu. Pro přepočítání odpovídajícího obsahu kyselin na melasu je třeba vycházet z ředění melasových zápar v průmyslových lihovarech. Minimální ředění melasy v průběhu celého kvasného cyklu je asi 3,3násobné, nárůst kvasničné biomasy probíhá asi do 7 % obj. ethanolu při minimálním ředění melasy asi 4,5násobném, v další fázi se kvasinky již nerozmnožují. Z těchto údajů vyplývají pro melasu mezní koncentrace 0,36 % hm. kyseliny mravenčí, 1 % hm. kyseliny octové a 0,14 % hm. kyseliny máselné. V porovnání s hodnotami stanovenými v melasách z kampaně 1984/85 [2] obsah kyseliny octové a máselné se nachází mimo oblast inhibičního vlivu, na hranici inhibice z hlediska růstu je obsah kyseliny mravenčí. Pro podchycení komplexního působení i ostatních složek necukerného podílu melas byly provedeny zkoušky na přirozených melasových substrátech z melas různých složení se standardními přídavky kyseliny mravenčí. Výsledky shrnuje obr. 4.

Ze značného rozptýlu hodnot je zřejmý vliv celkového složení melas. U vzorků č. 2 a 7, které vykazovaly horší technologickou jakost (nižší rychlost tvorby ethanolu, nižší výtěžek ethanolu), nastala inhibice již při nižších koncentracích kyseliny mravenčí v porovnání s ostatními

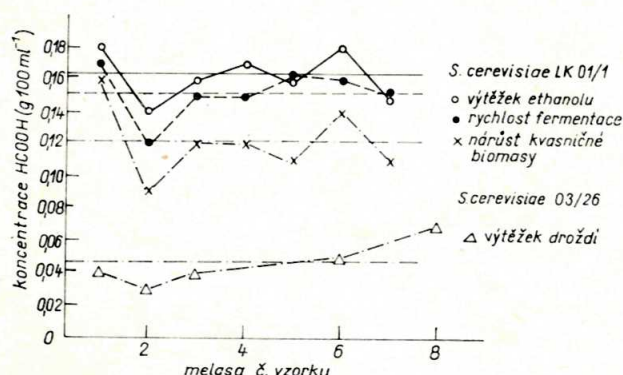


Obr. 3. Vliv koncentrace těkavých kyselin na produkci kvasničné biomasy (produkční kmen kvasinek 03/26, pH 5,1–4,5, přestup kyslíku 1 mmol 100 ml⁻¹ h⁻¹)

vzorky melas. Celkově se potvrdily výsledky získané na syntetické půdě, tj. růst byl brzděn silněji než kvašení. U většiny melas se inhibice růstu lihovarských kvasinek projevila v koncentraci nad 0,1 % kyseliny mravenčí v substrátu.

Na obr. 3 je graficky znázorněn vliv testovaných kyselin na drožděnský kmen kvasinek při aerobní kultivaci. Byl hodnocen poměr výtěžku kvasničné biomasy D [g kvasničné sušiny/100 g sacharosy] při stoupajících koncentracích kyseliny mravenčí, octové a máselné k výtěžku D_0 , tj. bez přídavku kyseliny jako inhibičního faktoru. Inhibiční křivky růstu mají obdobný průběh jako inhibiční křivky růstu lihovarských kvasinek. Pokles výtěžku droždí byl zjištěn při koncentracích vyšších než 0,03 g. 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí, 0,15 g. 100 ml⁻¹ kyseliny octové a 0,02 g. 100 ml⁻¹ kyseliny máselné v substrátu. Za předpokladu mín. 7násobného ředění melas při drožděnské technologii používající „husté zápary“, od-

povídá těmto koncentracím obsah 0,21 % hm. kyseliny mravenčí, 1,1 % hm. kyseliny octové a 0,14 % hm. kyseliny máselné v melase. Z porovnání s nalezenými obsahy kyselin v tuzemských melasách [2] vyplývá, že již v oblasti inhibičního vlivu se nachází obsah kyseliny mravenčí, jejíž přípustná koncentrace v melase pro droždářský kmen kvasinek vychází nižší než pro lihovarské kvasinky. Mezní koncentrace kyseliny octové a máselné v přepočtu na melasu jsou přibližně stejné jako pro kvasinky lihovarské, jejich zjištěný obsah v analyzovaných melasách byl pod touto hranicí. Zkoušky se standardními přídávky kyseliny mravenčí k melasovým půdám z různých melas vykazovaly určitý rozptyl hodnot inhibičního účinku; jak zachycuje obr. 4, jejich průměrná hodnota odpovídá výsledkům na syntetické půdě.



Obr. 4. Inhibiční koncentrace kyseliny mravenčí na melasových půdách různého složení

U melasy č. 8, kde se inhibiční vliv projevil při relativně vysoké koncentraci 0,07 g. 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí v substrátu, byl zjištěn vysoký obsah asimilovatelného N a nejvyšší výtěžek droždí v kontrolní půdě v porovnání s ostatními melasami, jejichž výtěžky byly srovnatelné. Pro posouzení obsahu těkavých kyselin v melase a droždářských melasových záparách je třeba vzít v úvahu i to, že v droždářské technologii se melasové zápary na rozdíl od lihovarů tepelně upravují. Bylo však zjištěno, že při vaření a kyselém čiření se snižuje obsah těkavých kyselin v průměru asi o 10 %, což není vždy dostačující.

Zjištěné inhibiční koncentrace kyseliny mravenčí, octové a máselné na lihové kvašení a produkci kvasničné biomasy u vybraných průmyslových kmenů kvasinek ukazují na reálnou možnost negativního ovlivnění technologické jakosti melas a tím i výtěžků finálních produktů v důsledku vysokého obsahu těkavých kyselin, především kyseliny mravenčí. Vzhledem k tomu, že v minulých letech se vyskytovaly dokonce dodávky melas s obsahem těkavých kyselin až o 50 % vyšším než u melas hodnocených v této práci, je třeba hledat cesty pro zlepšení jakosti melas z hlediska těchto složek a věnovat celkově zvýšenou pozornost složení melas určených pro fermentační zpracování i podmínkám pro jejich přejímku zpracovatelskými závody.

Lektoroval Ing. Jan Jílek

Literatura

- [1] LANGPAULOVÁ, J.: Průzkum jakosti melas pro výrobu droždí a lihu dílní závěrečná zpráva VÚKL, Praha 1983.
- [2] PROCHÁZKA, L., KVASNIČKA, F., ŠTECHOVÁ, A.: Stanovení těkavých mastných kyselin v melase. Kvas. prům. 32, 1986, s. 33 až 38.
- [3] SCHWECK, H., HABERL, L.: Brauereiwirtschaft 113, 1973, s. 76–82.
- [4] ZAUNER, E. et al.: Brauereiwirtschaft 119, 1979, s. 154–160.
- [5] FIEDLER, A. et al.: Brauereiwirtschaft 121, 1981, s. 202–203.
- [6] ROSE, H., HARRISON, J. S.: The Yeasts, Vol. 3, 1970.
- [7] ŠVEC, V. H., GORODNIKOV, A. H.: Ferment. i spirt. prom. 1978, č. 6, s. 40–43.

[8] RÖCKEN, W.: Brauereiwirtschaft 116, 1976, s. 3–5.

[9] GREGR, V., RYCHTERA, M.: Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie, Skripta VŠCHT, SNTL, Praha 1986.

Langpaulová, J.: Vliv těkavých organických kyselin v melase na lihové kvašení a produkci kvasničné biomasy. Kvas. prům., 32, 1986, č. 5, s. 103–105.

Byl studován vliv kyseliny mravenčí, octové a máselné na lihové kvašení a produkci kvasničné biomasy u vybraných průmyslových kmenů kvasinek. Pro lihovarský kmen LK 01/1 byly nalezeny prahové koncentrace max. 0,08 g. 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí, 0,25 g. 100 ml⁻¹ kyseliny octové a 0,03 g. 100 ml⁻¹ kyseliny máselné v substrátu, při kterých ještě nebyl ovlivněn výtěžek alkoholu ani růst kvasinek. U droždářského kmene 03/26 byla zjištěna větší citlivost na testované kyseliny a prahové hodnoty činily max. 0,03 g. 100 ml⁻¹ kyseliny mravenčí, 0,15 g. 100 ml⁻¹ kyseliny octové a 0,02 g. 100 ml⁻¹ kyseliny máselné v substrátu z hlediska produkce kvasničné biomasy. Porovnáním prahových hodnot s obsahy těchto kyselin v tuzemských melasách byl zjištěn relativně vysoký obsah kyseliny mravenčí, která za určitých technologických podmínek již může působit jako inhibitor fermentačních procesů.

Лангпаулова, Я.: Влияние летучих органических кислот в мелассе на спиртовое брожение и получение дрожжевой биомассы. Кvas. прум. 32, 1986, № 5, стр. 103–106.

Изучалось влияние муравьиной, уксусной и масляной кислот, оказываемое на спиртовое брожение и продукцию дрожжевой биомассы для избранных промышленных штаммов дрожжей. Для спиртового штамма ОК 1/1 были найдены пороговые концентрации макс. 0,08 г. 100 мл⁻¹ муравьиной кислоты, 0,25 г. 100 мл⁻¹ уксусной кислоты и 0,03 г. 100 мл⁻¹ масляной кислоты в субстрате, при которых еще не оказывалось влияние на выход спирта и рост дрожжей. В случае штамма 03/26 дрожжевого производства была установлена большая чувствительность к исследуемым кислотам и пороговые величины составляли максимально 0,03 г. 100 мл⁻¹ муравьиной, 0,15 г. 100 мл⁻¹ уксусной и 0,02 г. 100 мл⁻¹ масляной кислот. Сопоставление пороговых величин с содержанием этих кислот в отечественных мелассах установило, что в них находится относительно высокое содержание муравьиной кислоты, которая при определенных условиях технологического процесса может действовать как ингибитор ферментативных процессов.

Langpaulová, J.: Effects of Volatile Organic Acids in Molasses on an Alcoholic Fermentation and Yeast Biomass Production. Kvas. prům. 32, 1986, No. 5, pp. 103–106.

The effect of formic, acetic and butyric acid on an alcoholic fermentation and biomass production with selected industrial yeast strains was tested. For the production strain LK 01/1 the following maximum limit concentrations were found: 0,08 g. 100 ml⁻¹ of formic acid, 0,25 g. 100 ml⁻¹ of acetic acid and 0,03 g. 100 ml⁻¹ of butyric acid in the substrate.

At these concentrations, both the biomass yield as well as the yield of alcohol were not yet affected. The strain 03/26 of the baker's yeast was more sensitive to the acids tested and the maximum limit concentrations were as follows: 0,03 g. 100 ml⁻¹ of formic acid, 0,15 g. 100 ml⁻¹ of acetic acid and 0,02 g. 100 ml⁻¹ of butyric acid in the substrate with respect to the biomass production. Comparing these inhibitory concentrations with those found in domestic molasses shows that the concentration of formic acid is too high in some molasses and therefore can inhibit the fermentation processes.

Langpaulová, J.: Der Einfluß der flüchtigen organischen Säuren in der Melasse auf die Alkoholgärung und Produktion der Hefebiomasse. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 5, S. 103–106.

Es wurde der Einfluß der Ameisen- Essig- und Butter-säure auf die Alkoholgärung und Produktion der Hefebiomasse bei ausgewählten industriellen Hefestämmen

studiert. Die Autoren ermittelten für den Brennereistamm LK 01/1 die Schwellenkonzentrationen max. 0,08 g.100 ml⁻¹ Ameisensäure, 0,25 g.100 ml⁻¹ Essigsäure und 0,03 g.100 ml⁻¹ Buttersäure im Substrat, bei denen noch die Alkoholausbeute und das Hefewachstum nicht beeinflußt wurde. Bei dem Hefeproduktionsstamm 03/26 wurde eine höhere Empfindlichkeit auf die testierten Säuren festgestellt und die Schwellenwerte betrugen max.

0,03 g.100 ml⁻¹ Ameisensäure, 0,15 g.100 ml⁻¹ Essigsäure und 0,02 g.100 ml⁻¹ Buttersäure im Substrat aus dem Standpunkt der Hefebiomasseproduktion. Beim Vergleich der Schwellenwerte mit dem Gehalt dieser Säuren in inländischen Melassen wurde ein relativ hoher Ameisensäuregehalt festgestellt. Diese Säure kann unter bestimmten technologischen Bedingungen als Inhibitor der Fermentationsprozesse wirken.