ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

251 726

(11) (B1)

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 19 07 85
(21) PV 5350-85

(51) Int. Cl.[4]
C 12 N 1/16,
C 12 C 11/02

(40) Zveřejněno 18 12 86
(45) Vydáno 01 10 88

(75)
Autor vynálezu

KÁŠ JAN ing. CSc., PRAHA,
PRŮCHA PAVEL ing.,
HODAŇ JAROSLAV ing., PLZEŇ

(54) Způsob dekontaminace násadního inokula kvasinkových kultur

Způsob dekontaminace násadního inokulu kvasinkových kultur při výrobě piva, vína, lihu, pekařského a krmného droždí spočívá v tom, že na kvasničné inokulum se působí lysozymem, izolovaným například z vaječných bílků, v dávce 1 až 200 mg.l^{-1} kvasničného inokula, popřípadě lysozymem a kyselinou ethylendiaminotetraoctovou v množství 1 až 1 000 mg.l^{-1} kvasničného inokula, při teplotě 4 až 30 °C, při pH 5,0 až 7,5, po dobu 2 až 72 h a po expozici lysozymem se kvasničné inokulum propere vodou.

251 726

Vynález se týká postupu dekontaminace násadního inokula kvasinkových kultur při výrobě piva, vína, lihu, pekařského a krmného droždí.

Dosavadní způsoby čištění kvasničného inokula od bakteriálních kontaminantů jsou založeny na baktericidním účinku nízkého pH 2 až 3 na kvasničné suspenze po dobu 2 až 24 h, po přidání kyseliny sírové, fosforečné nebo kyseliny vinné. Další používané postupy využívají kombinovaného oxidačního a kyselého efektu, dosahovaného použitím persíranu sodného nebo amonného v prostředí kyseliny sírové nebo fosforečné. Uvedené postupy však mají i negativní fyziologické účinky na vlastní kvasinky, jež obvykle po chemickém čištění vykazují zhoršené prokvašování - nižší kvasnou mohutnost, popřípadě změněné flokulační schopnosti. Pro zlepšení dekontaminačních postupů pro kvasničná inokula byla navržena i aplikace antibiotik, například polymyxinu, tyro-thricinu, penicilinu, neomycinu a dalších. Tento postup však přináší dva rizikové faktory, spočívající jednak v potenciálním nebezpečí vývoje kmenů bakterií, odolných vůči antibiotikům, a jednak v citlivosti konzumentů na residua antibiotik, která mohou zůstat v hotovém výrobku, například pivu, vínu nebo pekařském droždí. Tyto okolnosti byly důvodem, proč v některých zemích není použití antibiotik pro čištění kvasničného inokula povoleno.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob dekontaminace násadního inokula kvasinkových kultur, jehož podstata spočívá v tom, že na kvasničné inokulum se působí lysozymem, izolovaným například z vaječných bílků, v dávce 1 až 1 000 $mg.l^{-1}$ kvasničného inokula, s výhodou 100 až 200 $mg.l^{-1}$ při teplotě 0 až 50 °C,

s výhodou 5 až 30 °C při pH 4,0 až 8,0, s výhodou 6,0 až 7,0 po dobu 2 až 72 h podle výše teploty, druhu kvasinek a úrovně kontaminace, po expozici lysozymu se kvasničné inokulum propere vodou a použije pro zakvašení substrátu, s příznivými efekty na vlastní fermentaci. Bakteriolytický efekt lysozymu se zvyšuje v přítomnosti kyseliny ethylendiaminotetraoctové, která se dávkuje v množství 1 až 1 000 $mg.l^{-1}$ kvasničného inokula.

Způsob enzymové dekontaminace bakteriálních kontaminantů v inokulačním materiálu kulturních kvasinek rodu Saccharomyces cerevisiae Hansen /uvarum/ a Saccharomyces cerevisiae při výrobě piva, lihu a pekařského droždí a kvasinek Torulopsis utilis při výrobě krmného droždí, spočívá v aplikaci aktivního enzymu lysozymu. Lysozym /Muramidase; Mucopeptide - N-acetylmuramohydroláza/ EC 3.2.1.17 je enzym ze skupiny hydroláz, mající schopnost štěpit β - 1→4 glykosidické vazby v glykoproteinech /mukopolysacharidech/, které jsou stavební komponentou buněčných stěn bakterií. Jeho aplikací při ošetření inokulačních médií kvasinkových kultur před jejich nasazením do substrátu lze významně snížit počet vždy přítomných kontaminujících bakterií a tím dosáhnout zlepšení vlastního fermentačního procesu. Použití lysozymu pro eliminaci kontaminujících mikroorganismů u násadního kvasinkového inokula se promítne do vyšší mikrobiologické čistoty s následnými příznivými dopady na biologickou stabilitu, senzorický charakter i výtěžnost kvasného procesu.

Lysozym je přírodní látka, která se nachází v rostlinách, například v latexu tropické rostliny Caryca Papay; i tkáních živočichů, například ve vaječném bílku, slzách a mateřském mléku člověka. Lysozym, izolovaný v potřebném stupni čistoty, je z hygienického i potravinářského hlediska zcela nezávadnou látkou. Použití lysozymu jako dekontaminačního prostředku pro násadní kvasničné inokulum před jeho použitím pro fermentační výrobu piva, vína, lihu, pekařského droždí anebo krmného droždí, nebylo v dostupné literatuře domácího i zahraničního původu zjištěno.

Ošetření kvasničného inokula lysozymem, které je předmětem tohoto vynálezu, se může provádět následujícím způsobem.

Příklad 1 251 726

Technický stav: Srovnávací postup bez enzymové dekontaminace

1 l husté suspenze várečných kvasinek Saccharomycea uvarum /S. carlsbergensis Hansen/ byl uchováván 24 hodin pod vodou při teplotě 7 °C. Potom byla kvasničná suspenze přelita do 2 l studené vody o teplotě 10 °C a dokonale byla homogenizována. Teplota po homogenizaci činila 11,4 °C, pH 5,5. Po 16 hodinách v chladícím boxu při 6,2 °C byly kvasinky dobře usazené. V této fázi byl odebrán vzorek pro stanovení kontaminace. Fyziologicko-technologické vlastnosti kvasinek byly stanoveny ve vzorku, odebraném po dvojnásobném vyprání kvasničné suspenze vodou a následné sedimentaci.

Parametry kvasinek, nalezené rozborem, jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1

koliformní zárodky		25 000 v 1 g sušiny
mléčné bakterie		1 600 000 v 1 g sušiny
kvasničná sušina		11,60 % hmotnostních
kvasná mohutnost	po 1 h	4,3 ml CO_2
	po 2 h	19,2 ml CO_2
	po 3 h	33,4 ml CO_2
sedimentace		36,5 ml
aglutinace		3,05 ml
podíl mrtvých buněk		6,7 %

1 l téže husté suspenze várečných kvasinek Saccharomyces uvarum /S. carlsbergensis Hansen/ byl uchováván 24 h pod vodou při teplotě 7 °C. Kvasničná suspenze byla potom přelita do 2 l studené vody o teplotě 10 °C. K suspenzi byl přidán roztok lysozymu v dávce, odpovídající 20 mg . l^{-1} kvasničné suspenze. Směs byla dokonale homogenizována. Teplota po homogenizaci činila 11,6 °C. Po 16 h působení lysozymu při teplotě 6,2 °C, v chladícím boxu, byly kvasinky dobře usazené. V této fázi byl odebrán vzorek pro stanovení kontaminace. Před stanovením fyziologicky-technologických vlastností ošetřených kvasinek byl lysozym z kvasničné suspenze odstraněn dvojnásobným vypráním kvasničné

hmoty ve studené vodě. Při rozboru byly zjištěny parametry, uvedené v tabulce č. 2.

Tabulka 2

Dávka: 20 mg lysozymu na 1 litr kvasničného inokula		
Aktivita enzymu: 5 300 U . mg^{-1}		
koliformní zárodky		9 400 v 1 g kvasničné sušiny
mléčné bakterie		550 000 "
kvasničná sušina		11,44 % hmot.
kvasná mohutnost	po 1 h	4,4 ml CO_2
	po 2 h	16,8 ml CO_2
	po 3 h	32,7 ml CO_2
sedimentace		36,0 ml
aglutinace		3,05 ml
podíl mrtvých buněk		6,2 %

Příklad 2

1 l suspenze kvasinek Saccharomyces uvarum totožných jako v příkladu 1, byl ošetřen 2 l vody o teplotě 20 °C s obsahem lysozymu, přičemž výsledná koncentrace lysozymu ve zředěné suspenzi kvasinek činila 100 mg/l, pH suspenze bylo upraveno na 6,5. Po homogenizaci byla suspenze uchovávána při 15 °C po dobu 10 h. Hodnoty mikrobiologického rozboru a přehled fyziologicko-technologických vlastností kvasinek, podrobených dekontaminačnímu účinku lysozymu jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3

Dávka: 100 mg lysozymu na 1 litr kvasničného inokula		
Aktivita enzymu: 5 300 U . mg^{-1}		
koliformní zárodky		6 050 v 1 g kvasničné sušiny
mléčné bakterie		105 000 "
kvasničná sušina		11,44 % hmot.
kvasná mohutnost	po 1 h	4,2 ml CO_2
	po 2 h	15,5 ml CO_2
	po 3 h	31,1 ml CO_2
sedimentace		36,5 ml
aglutinace		3,0 ml
podíl mrtvých buněk		6,1 %

Vzorky lysozymem ošetřených i neošetřených kvasinek Saccharomyces uvarum byly použity k modelovému kvašení 10 % mladiny. V průběhu pokusu byla sledována teplota, úbytek extraktu a mikroskopický obraz kvasinek.

Parametry mladého piva, uvedené v tabulce č. 4, doplňují údaje o indiferentním vlivu lysozymu na fyziologicko-technologické vlastnosti lysozymem ošetřených pivovarských kvasinek.

Tabulka 4

Mladina zakvašena kvasinkami, ošetřenými dávkou lysozymu mg . l^{-1}	Parametry mladého piva po 11 dnech kvašení zdánlivý extrakt % hm	teplota °C	vyčeření
0,0	3,4	7,8	dokonalé
20,0	2,7	7,6	"
100,0	3,3	7,8	"

Příklad 3

1 l suspenze kvasinek Saccharomyces uvarum stejných jako v příkladu 1 byl ošetřen 2 l vody s lysozymem a kyselinou ethylendiamintetraoctovou /EDTA/ o teplotě 5 °C. Výsledná koncentrace zředěné suspenze byla 150 mg/l a 100 mg kyseliny EDTA na 1 l, pH bylo upraveno na 6,0 a kvasinky po homogenizaci byly ponechány při teplotě 5 °C po dobu 60 h. Po promytí suspenze klesla kontaminace následovně:
koliformní zárodky na 4 000 v 1 g kvasničné sušiny,
mléčné bakterie na 80 000 v 1 g kvasničné sušiny.
Ostatní parametry odpovídaly hodnotám v příkladu 2.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

251 726

Způsob dekontaminace násadního inokula kvasinkových kultur při výrobě piva, vína, lihu, pekařského a krmného droždí, vyznačující se tím, že na kvasničné inokulum se působí lysozymem, izolovaným například z vaječných bílků, v dávce 1 až 200 $mg.l^{-1}$ kvasničného inokula, popřípadě lysozymem a kyselinou ethylendiaminotetraoctovou v množství 1 až 1 000 $mg.l^{-1}$ kvasničného inokula, při teplotě 4 až 30 °C, při pH 5,0 až 7,5, po dobu 2 až 72 h a po expozici lysozymem se kvasničné inokulum propere vodou.

Vytiskly Moravské tiskařské závody,
střed. 11 100, tř.Lidových milicí 3, Olomouc Cena: 2,40 Kčs