



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204 593

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 16 03 79
(21) PV 1759-79

(51) Int. Cl. C 12 N 1/18

(40) Zveřejněno 31 07 80
(45) Vydáno 01 06 83

(75)

Autor vynálezu FABIÁN JOSEF ing. CSc., PRAHA
BERAN JOSEF
HAVLÍK STANISLAV, LIBÁŇ

(54) Způsob výroby pekařského droždí

1

Vynález se týká způsobu výroby expedičního droždí jednorázovou přítokovou kultivací na normálních "řídých" nebo koncentrovaných, tzv. "hustých" melasových záparách, s dobrou trvanlivostí, vysokým obsahem buněčného glykogenu a trehalosy. Toto droždí je zvláště vhodné jako výchozí materiál pro výrobu aktivního sušeného droždí.

Klasické způsoby výroby droždí přítokovou kultivací, dnes všeobecně používané, jsou založeny na plynulém přísunu živin, nezbytných pro růst kvasinek, více méně podle růstové rychlosti, po celou dobu fermentace. Pokud se dávkuje minerální dusík odděleně od melasové zápary, zpravidla se jako přídavek ukončí 1 až 2 hodiny před koncem hlavního kvašení. Toto opatření spolu s následující periodou dokvašení kádě, která trvá 1/2 až 1 hod. po zastavení přítoku všech živin, má na konci fermentace vésti k dostatečnému "vyzrání" droždí a zvýšení jeho trvanlivosti. Ve skutečnosti však droždí takto připravené obsahuje stále ještě relativně vysoký, od fermentace k fermentaci kolísající podíl nevyzrálých, pučících buněk. Také nejlépe "vyzrálé" násadní droždí obsahuje malé procento dělicích se buněk, nehledě na to, že všechny buňky se nenacházejí ve stejném vývojovém stadiu během jednoho generačního cyklu. Tím je i zapříčiněna jejich rozdílná citlivost vůči sušení, což prakticky znamená, že použití normálního lisovaného droždí pro přípravu aktivního sušeného droždí vede k získání produktu s velmi nízkou mohutností kynutí (ČSN 56 6810) a s vysokým obsahem mrtvých buněk.

Mimoto při nedostatku sacharidů v zápaře během "zrání" droždí na konci fermentace vzniká nebezpečí, že kvasinky spotřebují buněčné zásobní látky (glykogen, trehalosu), takže droždí je pak méně trvanlivé. Byly proto hledány různé způsoby úprav fermentačních postupů, umožňujících získat na konci kvasného procesu z hlediska vývoje vyrovnanou, synchronizovanou buněčnou populaci, s ukončením dělením buněk.

Tak např. podle britského patentu č. 1 174 733 se musí při kvašení přesně po prvním generačním cyklu na dobu 1 hodiny silně zbrzdit přítok živin a vzduchu ko kvasící zápary. Přesné určení vhodného okamžiku k dočasnému přerušení kvašení není však v provozním měřítku snadné, takže očekávaného efektu nemusí být dosaženo.

Přídavek inhibitorů růstu, např. biomycinu (SSSR pat. 207 189) do kvasící zápary na konci fermentace může vzbudit oprávněné námitky se strany hygieniků, neboť je známo, že buňky kvasinek inklinují k hromadění cizorodých látek, ať již jako takových nebo po metabolické transformaci.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob výroby pekařského droždí s vysokým obsahem glykogenu a trehalosy, zvýšenou trvanlivostí a odolností k dehydrataci podle vynálezu, jehož podstat spočívá v tom, že kmen kvasinek, izolovaný z buněčné populace podrobené selekčnímu tlaku opakovaného vysušení a rehydratace, se použije k přípravě násadního droždí, z něhož se vyrábí expediční droždí tak, že veškeré množství živin obsahujících minerální dusík a fosfor, které odpovídá očekávanému výtěžku droždí, je postupně přidáváno v nadbytku jen asi do konce první poloviny celkové doby kvašení. Melasová zápara je v této době dávkována obvyklým vzestupným způsobem až do max. hodinového přítoku melasové zápary (asi 8 až 10 % celkového množství melasy). Fermentace pak dále pokračuje pouze za konstantního přítoku maximálních hodinových dávek čisté melasové zápary, takže v druhé polovině kvašení je postupně do kvasící zápary přítokováno zbývajících nejméně 50 % celkového množství spotřebované melasy. Toto opatření má příznivý vliv na fyziologickou aktivitu buněk, neboť v druhé polovině kultivace expedičního droždí při stoupající růstové křivce se živění dusíkem stává postupně limitujícím (tab. 1), ale přísun exogenních uhlíkatých zdrojů (melasa) při intenzivním vzdušnění fermentované zápary stačí nejen pro dokončení růstu, ale i pro další kumulaci rezervních látek (trehalosa, glykogen), významných pro trvanlivost, v nučkách s ukončeným dělením (obr.1). Změny frakcí sacharidů v kvasinkách, sledované během fermentace podle vynálezu a znázorněné na obr. 1 byly stanoveny metodami podle TREVELYNA, upravenými P.R. STEWARTEM (Analytical Methods for Yeasts, in Methods in Cell Biology XII,; D.M. Prescott, editor, Acad. Press, N.Y., 1975, s. 111 - 147).

Tabulka 1

Průběh fermentace expedičního droždí (IIIG) podle vynálezu v provozních podmínkách

Doba fermentace (h)	Zápara během kvašení					Droždí v zápare		
	Teplota (°C)	Bg°	pH	Etanol (1) (obj. %)	Amoniakální + Amidický dusík (mg/l)	kg D ₂₇ (2)	Celkový dusík (% suš.)	P ₂ O ₅ (% suš.)
0	29	1,1	5,4	0,40	151,2	965	7,68	3,8
1	29	1,0	5,5	0,42	123,2	1010	7,28	3,8
2	31	1,2	5,5	0,37	151,2	1489	8,96	4,5
3	29	1,3	5,1	0,35	126,0	1563	9,31	4,7
4	30	1,5	4,9	0,33	72,8	2106	8,68	5,3
5	30	1,6	4,8	0,28	44,8	2201	9,52	4,5
6	31	1,8	4,9	0,18	28,0	2297	9,24	4,2
7	30	2,0	5,0	0,17	28,0	2393	8,60	3,7
8	29	2,1	5,1	0,12	28,0	2904	8,40	3,2
9	31	2,3	5,2	0,15	28,0	3159	8,40	3,4
10	31	2,5	5,2	0,28	28,0	3276	7,90	3,2
11	30	2,5	5,1	0,41	22,4	3393	7,20	3,1
12	30	2,5	5,2	0,45	22,4	3472	6,54	2,6

Vysvětlivky k tabulce 1

(1) SOBCZAK, E.: Modifikace chemické metody stanovení etanolu

Prezm.ferm.i rolny, 19, 1975, 5, č. 8/9Překlad Potravinářské aktuality STI Praha, 19, 1976, 51, ř.F č.2(2) D₂₇ = droždí o sušině 27 % (KLEINZELLER, A.: Centrifugační metoda pro stanovení koncentrace kvasničné hmoty. Kvasný prům., 1, 1955, 41

Přesun živin fosforem a minerálním dusíkem podle vynálezu jen do první poloviny kvašení má vliv na počáteční vysoký obsah celkového dusíku, fosforu a glykogenu v droždí. V druhé polovině kvašení nastává však pokles dusíku i fosforu v droždí na normální hodnoty (tab.1). V polovině kvasného procesu se postupně ustavují optimální podmínky pro aerobní glykolysu s vysokou energetickou hladinou buněk a pozvolně nastupujícím nedostatkem asimilovatelného dusíku v zevním prostředí. Vysoká energetická hladina metabolismu buněk za aerobiosy pak také asi umožňuje zpětnovazebnou inhibici aktivity enzymu fosfofruktokinasy, prostřednictvím citrátu a ATP (adenosintrifosfát). Díky této inhibici zvyšuje se pak koncentrace glukoso-6-fosfátu ve prospěch syntézy zásobních polysacharidů. Vedle toho allosterická aktivace buněčné isocitrátdehydrogenasy pomocí AMP (adenosinmonofosfát) je patrně bržděna, takže koncentrace buněčného citrátu, který se dále může zapojovat do syntézy lipidů, stoupá. Biosyntéza membránových lipoproteinů v kvasinkách může nepochybně mít vliv na rigiditu buněčné stěny a tím i působit na rezistenci buněk, vystavených nepříznivým účinkům dehydratace.

204 593

Proto výhodou postupu podle vynálezu je možnost výroby suchého pekařského droždí, které si během sušení a skladování podstatně lépe zachovává biologickou aktivitu (mohutnost kynutí těsta - viz tab. 2) než droždí normální.

Tabulka 2

Změny v biologické aktivitě (mohutnosti kynutí těsta) během skladování aktivního sušeného droždí (ASD), připraveného z normálního lisovaného droždí a droždí podle vynálezu

Doba skladování (počet dnů)	M o h u t n o s t k y n u t í v m i n u t á c h							
	ASD z normálního lisovaného droždí				ASD z lisovaného droždí podle vynálezu			
	výrobní šarže č.				pokusná šarže			
	234	248	V	257	19	22	23	24
0	93	87	89	84	57	57	60	61
30	113	115	115	95	64	60	60	67
60	120	128	141	123	74	65	74	80
90	150	142	174	140	78	71	78	83
120	174	160	ne-	159	81	76	80	85
150	neky-	183	ky-	170	95	90	84	99
180	ne	205	ne	191	109	105	112	118

Vysvětlivky k tabulce 2

ASD - aktivní sušené droždí, připravené sušením droždí v provozní fluidní sušárně při teplotě 30 ± 2 °C na sušinu 93 až 94 %. ASD bylo skladováno v sáčcích z laminované hliníkové fólie SVITAL/PE, bez inertní atmosféry, při normální teplotě (20 ± 2 °C).
 Mohutnost kynutí - mírou mohutnosti kynutí droždí v těstě je doba (v min.) potřebná k tomu, aby za podmínek metody (ČSN 56 0188 Metody zkoušení droždí) působením droždí těsto vykynulo na určitý, konstantní objem.

Také čerstvé lisované droždí podle vynálezu má výhodné vlastnosti, kterými předčí normální droždí. Vedle vysoké trvanlivosti (tabulka 3) je to významný obsah zásobních sacharidů - trehalosy a glykogenu) (obr.1). Izolace těchto látek chemickou cestou z droždí vyrobeného podle vynálezu je nesporně výhodná, neboť dává předpoklady k nejméně dvojnásobným výtěžkům oproti izolaci z droždí normálního. Další výhodou způsobu podle vynálezu je zkrácení doby fermentace o závěrečnou "dozrávací" fázi kvašení bez přítoku záparu. Jak je zřejmé z obr. 1, není ani žádoucí, s ohledem na zachování maxima zásobních látek v droždí, fermentační proces dále prodlužovat. Prokvašená zápara je na konci fermentace na živiny chudá, takže u droždí, které je vysoce metabolicky aktivní, pak dochází k utilizaci vnitrobuněčných zásob.

Tabulka 3

Mohutnost kynutí a trvanlivost normálního lisovaného droždí v porovnání s lisovaným droždím podle vynálezu z výroby v droždárně Libáň

Normální lisované droždí			Lisované droždí podle vynálezu		
Výrobní šarže č.	Mohutnost kynutí (min.)	Trvanlivost (h při 35 °C)	Pokusná šarže č.	Mohutnost kynutí (min.)	Trvanlivost (h při 35 °C)
44	70	96	10	62	120
79	65	72	38	66	144
91	65	72	63	60	122
117	65	96	99	58	148

Vysvětlivky k tabulce 3

Mohutnost kynutí - viz vysvětlivky k tabulce 2

Trvanlivost při 35 °C - trvanlivostí se rozumí doba (počet hodin), po kterou droždí nejeví při 35 °C příznaky rozkladu (ztekucení) (ČSN 56 0188 - Metody zkoušení droždí)

V následujících příkladech provedení je objasněn způsob výroby droždí podle vynálezu, aniž se jimi jakkoliv omezuje.

Příklad 1

Výchozím materiálem pro výběr produkčního kmene kvasinek bylo normální lisované droždí, připravené z běžných droždářských kultur Tk+L. Droždí bylo nejdříve usušeno v provozní fluidní sušárně při teplotě 30 ± 2 °C na sušinu 92 %. 0,5 kg suchého droždí jsme vložili na dobu 64 hodin do termostatu, vyhřívaného na $46 \pm 0,5$ °C. U vzorku suchého droždí jsme pak během 30 minut provedli rehydrataci rozmícháním droždí ve 3 l destilované vody, ochlazené na + 5 °C. Po odstředění byla kvasničná pasta vlisována pomocí laboratorního plachetkového lisu na sušinu 29 %. Z droždí byly znovu připraveny granule, které byly sušeny v laboratorní fluidní sušárně vzduchem, předehřátým na $30 \pm 0,5$ °C, po dobu 9 hodin. Z droždí o sušině 96 % vznikla rozmícháním ve sterilní destilované vodě suspence, kterou jsme po provedení postupného stovkového a desítkového ředění asepticky pipetovali do sterilních Petriho misek s následujícím přelivem a rozmícháním ve slabé vrstvě sladinového agaru. Agarové plotny byly pak inkubovány při 28 °C. Nejrychleji rostoucí, avšak dobře izolované kolonie byly po mikroskopické kontrole přeočkovány roztěrem na plotnách s melasovým agarem následujícího složení :

melasa (50 °S)	310 g
superfosfát	2 g
voda	1000 ml
H ₂ SO ₄ (96 %)	0,5 ml

204 593

vařit jednu hodinu a přidat

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 4 g

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 3 g

pH upravit na 6,0, zahřát v autoklávu na 116 °C, doplnit vodou na 1000 ml, zfiltrvat, přidat 20 g agaru a sterilizovat 20 min. při 121 °C.

Po nárůstu kolonií se u paralelních ploten kontroluje homogenita jednotlivých izolátů kultur přelivovou metodou s TTC (trifenyltetrazolium chlorid) na výskyt respiračně deficietních mutantů a u vybraných izolátů se provedou nezbytné biochemické testy (KOCKOVÁ - KRATOCHVÍLOVÁ, A. Katalog kultur kvasinek, Veda, Bratislava, 1977, s.201): Nepřítomnost ureasy, asimilace dusičnanů (negativní), zkvašování maltosy, sacharosy, galaktosy a rafinosy. Mimoto provedeme sporulační test na agaru s octanem draselným (ŠILHÁNKOVÁ, L., DEMNEROVÁ, K. OBDRŽÁLEK, V. : Laboratorní návody pro cvičení z mikrobiologie, skriptum VŠCHT, SNTL, Praha 1974) a kontrolu morfologie askospór.

Užší výběr produkčního kmene pak provedeme na základě schopnosti syntézy glykogenu a trehalosy za N-limitních podmínek aerobní respirace, např. v laboratorní modifikaci příkladu 2 nebo 3.

Příklad 2

K výrobě expedičního droždí III. generace podle vynálezu se použije 100 000 l kvasná kádě, která se po vyčištění a sterilizaci naplní 45 000 l pitné vody 30 °C teplé. Do kádě se dále načerpá 1 200 l melasové zápary 20 °Bg a po přidání 20 kg síranu amonného, 6 kg síranu hořečnatého a nastavení slabého přívodu vzduchu se provede zakvašení kádě násadním droždím II. generace, které bylo připraveno obvyklým způsobem za použití produkčního kmene kvasinek. Na očekávaný netčovýtěžek 2 500 kg droždí o sušině 27 % (D_{27}) se použije 600 až 700 kg násadního droždí ve formě kvasničného mléka. Počáteční hodnota pH se upraví přidávkou kyseliny sírové. Nato začíná fermentace přítokem živin podle fermentačního schématu (tab. 4). V první hodině kvašení se do kvasné kádě přidá D-biotin, za horka (60 až 70 °C) rozpuštěný ve 3 litrech vody. Od druhé hodiny fermentace se postupně zvyšuje intenzita vzdušnění kvasné kádě až do maxima okolo čtvrté až páté hodiny, při němž se setrvává až do konce fermentace (trubkový větrací systém). Jakmile skončí přítok melasové zápary, vzdušnění kvasné kádě se okamžitě sníží na minimum, které stačí pouze k slabému míchání obsahu kádě. Prokvašená zápara se současně intenzivně ochladí a droždí se neprodleně ze zápary odseparuje. Výtěžek droždí je v průměru asi o 200 kg vyšší než předpoklad. Zvýšení zřejmě ovlivňuje užití biotinu, který se normálně do kvašení nepřidával. Průběh fermentace a jakost droždí odpovídá výsledkům, uvedeným v tab. 1, 2, 3.

Tabulka 4

Suroviny a schéma kvašení III. expediční generace droždí podle vynálezu (normální "řídka" melasová zápara - drožďárna Libáň

Pro přípravu zápary : 3 500 kg melasy M50 se zředí vodou na celkový objem asi 15 000 l (19 až 20 °Bg), pH se upraví pomocí H_2SO_4 na hodnotu 5,0 (cca 18 až 22 l konc. H_2SO_4), var 1 hod.				
Doba fermentace (hod)	Přítok melasové zápary (obj.díly)	Síran amonný (kg)	Fosforečnan amonný stř. (kg)	Čpavková voda (l)
0	10	20	-	-
1	-	-	-	-
2	5	10	15	-
3	7	10	-	20
4	9	10	-	25
5	10	-	15	20
6	11	-	-	15
7	12	-	-	-
8	12	-	-	-
9	12	-	-	-
10	12	-	-	-
11	12	-	-	-
12	12	-	-	-
V 1. hodině kvašení se přidá : 0,75 g D-biotin 6,0 kg síran hořečnatý				

Příklad 3

Výroba expedičního droždí III. generace podle vynálezu s užitím koncentrované ("husté") melasové zápary byla provedena v 100 000 l kvasné kádě, vybavené míchadlem s aeračním systémem typu FRINGS, podle fermentačního schématu, znázorněného v tab. 5. Kalkulace živin vycházela z předpokládaného výtěžku 12 000 kg droždí o sušině 27 %. Pro fermentaci se použilo v přepočtu na sušinu 27 % 2 093 kg násadního droždí II. generace. Objem předlohy s násadním droždím a živinami na začátku fermentace činil 47 200 l. Po 15ti hodinách kvašení se zvětšil objem zápary s droždím na 84 000 l. Podobně jako při fermentaci na normálních zředěných záparách skončilo kvašení kádě v 15. hodině, tj. když byl dokončen přítok sladké melasové zápary.

Výtěžek droždí činil 11 167 kg D_{27} . Obsah 0,3 % etanolu v prokvašené zápaře v přepočtu na droždí (1 ml etanolu odpovídá 3,732 g droždí D_{27}) doplňuje celkový výtěžek

204 593

na předpokládanou hodnotu 12 000 kg. Droždí mělo výbornou mohutnost kynutí (49 min.) i trvanlivost (144 hodin při 35 °C).

Sušením lisovaného droždí na provozní fluidní sušárně (3 h při 30 ± 2 °C) bylo získáno aktivní sušené droždí s obsahem sušiny 94 % a mohutností kynutí těsta 60 min. Suché droždí mělo údržnost více než 1 rok při 5 ± 2 °C, půl roku při 20 ± 2 °C po zabalení v sáčcích z laminované hliníkové folie typu Svital/PE, bez vakua nebo inertní atmosféry. Skladováním pod dusíkem nebo ve vakuu lze jeho trvanlivost prodloužit asi na dvojnásobek uvedených hodnot.

Tabulka 5

Suroviny a schéma kvašení III. expediční generace droždí podle vynálezu (koncentrovaná "hustá" melasová zápara - droždárna Olomouc

Příprava zápary : Melasa, předeřtá na 60 °C se ředí vodou na 35 °Bé. Při této hodnotě odpovídá 1 kg melasy s 80 % sušinou 2 l zápary. Ve směšovací nádrži se současně roztok melasy okyseluje pomocí kyseliny sírové na pH 4,5 a sterilizuje v deskovém výměníku zátřevem na cca 120 °C po dobu 30 sekund. Vyvločkové koloidy a jiné nečistoty se odstraní z hotové zápary po jejím zchlazení na 30 °C kalovou odstředivkou.					
Doba fermentace (h)	pH fermentace	melasová zápara 35 °Bé (l/h)	čpavková voda (l/h)	kyselina fosforečná (75 %) (l/h)	kyselina sírová konc. (l/h)
0	5,0	730	40	20	-
1	4,1	-	-	-	-
2	4,9	670	55	10	-
3	5,4	920	70	20	-
4	5,3	1040	80	10	-
5	5,5	1220	100	10	-
6	5,6	1440	110	20	-
7	5,5	1560	120	25	15
8	5,5	1720	110	-	15
9	5,3	1800	-	-	-
10	5,0	1800	-	-	-
11	5,3	1800	-	-	-
12	5,5	1800	-	-	-
13	5,6	1800	-	-	-
14	5,6	1800	-	-	-
15	5,6	1600	-	-	-
V 1. hodině kvašení se přidá : 2,6 g D-biotin 20,0 kg síran hořečnatý					

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby pekařského droždí s vysokým obsahem glykogenu a trehalosy, zvýšenou trvanlivostí a odolností k dehydrataci, vyznačený tím, že produkční kmen kvasinek, izolovaný z buněčné populace, která byla vystavena selekčnímu působení zvýšené teploty, opakovaného vysušení a rehydratace, se použije k přípravě násadního droždí pro fermentační proces, řízený tak, že veškeré minerální dusíkaté a fosforečné živiny se v množství odpovídajícím celkovému výtěžku droždí, přivádějí do kvasné kádě v prvních hodinách kvašení a jejich přídavek skončí nejpozději do první poloviny celkové doby fermentace, takže během dalšího kvašení nejsou do kádě přiváděny jiné živiny než čistě melasová zápara, jejíž přítok ukončuje kvasný proces, aniž je nutná perioda dokvašení bez přítoku živin.

1 výkres

