

Krmná bílkovina na syntetických substrátech

JANA VERNEROVÁ, JANA BĚLOUŠKOVÁ, Výzkumný ústav lihovarského a konzervářského průmyslu, Praha

612.398

Průmyslová výroba kvasničné bílkoviny napomáhá našemu hospodářství řešit problém nedostatku bílkovinných krmiv. Pro plánovaný velký objem výroby je třeba zajistit odpovídající surovinovou základnu. Melasa, i když z hlediska složení je jako substrát pro kvasinky jedním z nejvýhodnějších, je k dispozici jen v omezeném množství. Je proto snaha nahradit tuto surovinu látkami jinými, jako např. sulfidovými výluhy, hydrolyzáty dřeva a zemědělských odpadů, melasovými lihovarskými výpalky v kombinaci s melasou či samotnými odpadními louhy z citronového kvašení apod. U těchto surovin se využívá jako uhlíkatého zdroje nejen asimilovatelných cukrů (pentóz a hexóz), ale i jiných uhlíkatých látek, např. glycerolu a organických kyselin.

O schopnosti kvasinek asimilovat necukerné uhlíkaté zdroje pojednává ve svých pracích Fink [1], který pěstoval kvasinky *Torulopsis utilis* na různých necukerných substrátech jako kyselině mléčné, pyrohroznové, acetaldehydu, ethylalkoholu, kyselině octové a dalších. Vzhledem k požadavkům kladeným na krmné droždí, tj. dostatečný obsah bílkovin, rychlý růst a dostatečnou výtěžnost, staví se tyto necukerné substráty aktuálními.

Byly proto provedeny pokusy s pěstováním krmného droždí pomocí kvasinek *Candida utilis* a *Candida tropicalis* (kmeny ze sbírky VÚLK) na syntetických substrátech, kde jako zdroj uhlíku byl dávován ethylalkohol a kyselina octová. Během pokusů byla sledována nejen schopnost růstu kvasinek na těchto substrátech a maximální výtěžnost, ale i složení napěstovaných kvasinek, množství bílkovin a obsah aminokyselin v bílkovinných hydrolyzátech.

Studiem obsahu aminokyselin v bílkovinných hydrolyzátech mikroorganismů se zabývali četní autoři. Reusser a kolektiv [2] zkoumal přítomnost deseti nepostradatelných aminokyselin v hydrolyzátech různých mikroorganismů. Kocková-Kratochvílová [3] uvádí obsah aminokyselin u kvasinek po jejich autolýze; zjistila, že stanovení jednotlivých aminokyselin závisí na způsobu autolýzy. Malkov [4] studoval aminokyseliny v bílkovinném

hydrolyzátu kvasinek *Torulopsis utilis* a *Candida species*. Kurth a Cheldelin [5] ve své práci uvádí složení kvasničné bílkoviny toruly pěstované na dřevných hydrolyzátech. Výsledky z literatury shrnuje tabulka 1.

Experimentální část

Kultivace byla provedena na syntetických substrátech s celkovým obsahem alkoholu, event. kyseliny octové, dávované jako octan amonný kolem 2 %. Celý kultivační pokus byl veden exponenciálním přítokovým schématem, živiny byly dávkovány ve formě diamonfosfátu a síranu amonného nebo čpavku.

K propagaci a postupné adaptaci kvasinek bylo použito třepaček a Kluyverových válců. Vlastní kultivace byla provedena v nerezovém fermentoru s větracím systémem typu Vertex. Konečný objem substrátu se pohyboval kolem 10 l. Množství vzduchu bylo regulováno rotametrem a měřeno vodním plynoměrem. Teplota ve fermentoru byla vodní lázní udržována na 29 až 30 °C. Napropagované kvasinky byly odděleny na separátoru, přičemž se sušina odseparovaného droždí pohybovala mezi 22 až 24 %. Doba kultivace byla 8 až 11 hod.

Stanovení aminokyselin v kvasničné bílkovině bylo provedeno po kyselé hydrolyze jednorozměrnou papírovou chromatografií. Kvasničné buňky byly hydrolyzovány 50násobným přebytkem 6 N kyseliny solné při 10 °C po dobu 25 hod. Hydrolyzát byl odpařen v evakuovaném exikátoru s náplní KOH a přebytká kyselina solná byla odstraněna opakovaným rozpouštěním a odpařováním hydrolyzátu do sucha. Nakonec byl odparek rozpuštěn v malém množství vody za přidání 20% izopropanolu a tento roztok byl ve vyzkoušeném množství nanášen na chromatogram [6]. K chromatografii bylo použito rozpouštědlové soustavy n-butanol : kyselina octová : voda.

Při hledání nejvhodnějšího poměru jednotlivých složek směsi byly vyzkoušeny tyto poměry: směs o složení 4 : 1 : 5 při vzestupném i sestupném uspořádání, směs o složení 144 : 13 : 43 [7] a 4 : 1 : 1. Tato poslední směs dávala při vzestupném uspořádání nejlepší výsledky a proto se jí používalo pro další práci. Pro chromatografii byl zvolen papír Whatman č. 1, vzorky byly na start nanášeny obvyklým způsobem a chromatogram vyvíjen ve skleněném akváriu o rozměrech 30 × 50 cm vzestupným způsobem se čtyřnásobným opakováním. Detekce byla provedena protažením papíru v 0,25 % roztoku ninhydrinu v bezvodém acetonu a sušením 20 min při 60 °C. Nestálé ninhydrinové skvrny byly stabilizovány protažením papíru v roztoku dusičnanu měďnatého [6]. K identifikaci skvrn aminokyselin analyzovaných hydrolyzáty bylo použito současně chromatografované směsi standardních aminokyselin o předem zjištěném pořadí.

Tabulka 1

Torulopsis utilis Synt. půda [2]	Torulopsis utilis Hydrol. dřeva [4]	Candida species sulf. výluh [4]	Torula dřev. hydrol. [5]
lysín	lysín	lysín	lysín
—	cystin	cystin	—
histidin	histidin	histidin	histidin
arginin	arginin	arginin	arginin
—	kys. asparag.	kys. asparag.	—
tryptofan	tryptofan	tryptofan	tryptofan
—	kys. glutamová	kys. glutamová	—
treonin	treonin	treonin	treonin
—	alanin	alanin	—
—	hydroxyprolin	hydroxyprolin	—
—	prolin	prolin	—
valín	valín	—	valín
metionin	metionin	metionin	metionin
fenylalanin	fenylalanin	fenylalanin	fenylalanin
isoleucin	—	—	isoleucin
leucin	leucin	—	leucin

Dosažené výsledky

Při pěstování kvasinek na alkoholu bylo dosaženo výtěžnosti 66 % (sušiny kvas. hmoty na alkohol), při obsahu hrubé bílkoviny 47 %. Za použití octanu amonného jako zdroje uhlíku bylo dosaženo výtěžnosti 30 % (sušiny kvas. hmoty na kys. octovou) při obsahu bílkoviny 74 %.

Výsledky chromatografického sledování obsahu aminokyselin v hydrolyzátech podávají obr. 1 a 2.

Tabulka 2

Candida utilis (melasová půda) V ₂	Candida tropicalis	
	(syntetická půda s etanolem) V ₁	(syntetická půda s octanem amon- ným) V ₃
lysín	lysín	lysín
histidin (malé množství)	histidin (malé množství)	—
arginin	arginin	arginin
neznámá aminokyselina	—	nezn. aminokys.
kys. asparagová + serin	kys. asparagová + serin	kys. asparagová + serin
glycin	glycin	glycin
kys. glutamová + treonin	kys. glutamová + treonin	kys. glutamová + treonin
alanin	alanin	alanin
prolin	prolin	prolin
tyrosin	tyrosin	tyrosin
valin	valin	valin
fenylalanin	fenylalanin	fenylalanin
isoleucin + leucin	isoleucin + leucin	isoleucin + leucin

Závěr

Kvasničné bílkoviny zauímají střední místo mezi bílkovinami rostlinnými a živočišnými. Jejich stravitelnost je podmínkou jejich biologické hodnoty a je v souvislosti s kvalitativním a kvantitativním zastoupením jednotlivých aminokyselin. Z hlediska výživy užitkových zvířat představuje kvasničná bílkovina vysoce hodnotnou surovinu k doplnění rost-

linného krmiva. Provedenými pokusy byla sledována otázka využití necukerných uhlíkatých látek jako zdroje uhlíku k tvorbě buněčné hmoty.

1. Jako zdroje uhlíku bylo použito kyseliny octové a ethylalkoholu. Po adaptaci kvasinek na tyto substráty došlo ke zvýšení jejich výtěžnosti a zkrácení kultivační doby.

2. Obsah dusíku v napěstované *Candidě* byl závislý na množství dusíku dodaného živinám a byl ze substrátu plně využíván. Množství hrubé bílkoviny stanovené v sušině buněčné hmoty se pohybovalo na substrátu s etanolem přes 50 % a na substrátu s octanem amonným kolem 70 %.

3. Bylo srovnáno aminokyselinové složení bílkovinných hydrolyzátů kvasinek *Candida* pěstovaných na melasovém a syntetickém substrátu. Z uvedených chromatogramů je patrné, že kvalitativní zastoupení aminokyselin ve zkoumaných hydrolyzátech je přibližně stejné.

4. V melase byly výše uvedenou metodou stanoveny v souhlase s literaturou tyto aminokyseliny [8]: lysin, kyselina glutamová, γ -amino-máselná, glycin, serin, valin, glutamin, kyselina asparagová, alanin, asparagin, tyrosin, arginin, fenylalanin, leucin a isoleucin. Synteticky připravené substráty použité při pokusech neobsahovaly na rozdíl od melasové půdy žádné aminokyseliny a přesto bylo nalezeno téměř shodné aminokyselinové složení hydrolyzátů kvasinek z obou druhů půd. Z toho plyne, že kvasinky, mají-li uhlíkatý prekursor, tvoří aminokyseliny bez ohledu na jejich přítomnost v substrátu.

5. Ve všech třech zkoumaných hydrolyzátech byly nalezeny téměř všechny nepostradatelné aminokyseliny. Nebyl nalezen methionin, kterého obsahuje kvasničná bílkovina vždy jen malé množství a tryptofan, jenž se použitou kyselou hydrolyzou ničí. Byl nalezen poměrně vysoký obsah lysinu, který pro svou značnou nutriční hodnotu je velmi důležitý ve výživě.

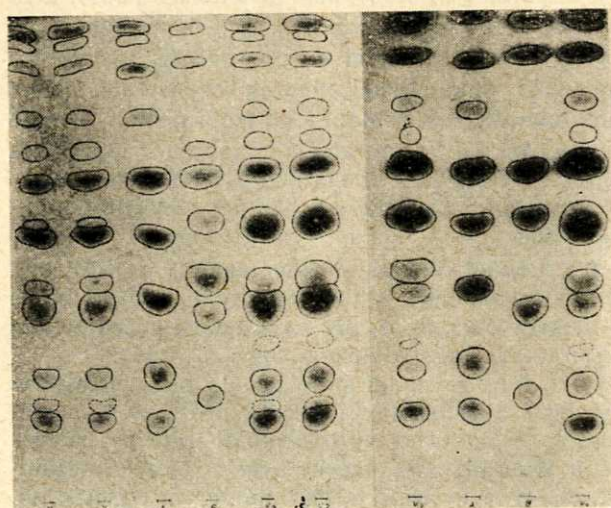
6. Z vizuálního pozorování chromatogramů je patrné, že větší kvantitativní zastoupení aminokyselin je u kvasinek pěstovaných na půdě s octanem amonným než etanolem. Toto zjištění je v souhlase s výše uvedeným analytickým stanovením obsahu bílkovin v napěstovaných kvasinkách.

7. Na základě dosažených výsledků při pěstování krmných kvasinek na syntetickém etanolu a octanu amonném, který je odpadem v chemickém průmyslu, nabízejí se další možnosti pro jejich získávání.

Literatura

- [1] Fink H., Just F.: Biochem. Ztschr. **312**, 390 (1942).
- [2] Reusser F. a sp.: Canadian J. Microbiology **3**, 721 (1957).
- [3] Kocková-Kratochvílová A.: Kvasinky. SNTL, Bratislava 1957.
- [4] Malkov A. M.: Proizvodstvo drožže z nepiščevovo syrja. Moskva 1953.
- [5] Kurth E. F., Cheldelin V. H.: Ind. Eng. Chem. **38**, 617–619 (1946).
- [6] Hais I. M., Macek K.: Papírová chromatografie, NČSAV, Praha 1959.
- [7] Mikeš O. a kol.: Příručka lab. chromat. metod, SNTL, Praha 1961.
- [8] Vavruš I.: Listy cukrovnické **67**, 211 (1951).

Došlo do redakce 30. 3. 1962.



Obr. 1. V₁ (10 μ l, 15 μ l) — hydrolyzát kvasničných buněk pěstovaných na syntetické půdě s etanolem

A, B standardní směs aminokyselin: Směs A: lysin, arginin, serin, kyselina glutamová, alanin, tyrosin, methionin, fenylalanin, leucin. Směs B: histidin, kyselina asparagová, glycin, treonin, alanin, prolin, valin, isoleucin. V₂ (5 μ l, 15 μ l) hydrolyzát kvasničných buněk pěstovaný na melasovém substrátu.

Obr. 2. V₃ (10 μ l, 15 μ l) hydrolyzát kvasničných buněk pěstovaný na syntetické půdě s octanem amonným

A, B — standardní směs aminokyselin jako u obr. 1, chybí glycin, prolin, fenylalanin. Škrtny nutno čísti zdola nahoru. Nalezené aminokyseliny jsou shrnuty v tabulce 2.

ПРОИЗВОДСТВО КОРМОВОЙ
БЕЛКОВИНЫ НА БАЗЕ
СИНТЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

В статье перечисляются аминокислоты, присутствие которых было установлено хроматографическими методами в кормовой белковине полученной путем разведения некоторых штаммов семейства *Candida* на субстратах с содержанием спирта или уксусной кислоты, служивших в качестве источника углеродистых веществ. Хроматограммы показывают, что содержание аминокислот во всех изучаемых случаях остается примерно одинаковым.

FUTTEREIWEISS AUF SYNTHETISCHEN SUBSTRATEN

Der Artikel bringt eine Übersicht der Aminosäuren, die chromatographisch in Hefeeiweissmustern bestimmt wurden, welche durch die Kultivation einiger Stämme *Candida* auf Alkohol- und Essigsäure-haltigen (als Kohlenstoffquelle) Substraten gewonnen wurden. Die Chromatogramme zeigten, daß die Vertretung der Aminosäuren in allen verfolgten Fällen ungefähr die gleiche war.

APPLICATION OF SYNTHETIC SUBSTRATES IN PRODUCTION OF HIGH PROTEIN FOOD

The article deals with the results of chromatographic analyses aimed at identification of aminoacids, which are present in yeast protein produced by some strains of *Candida* group grown on substrates containing alcohol or acetic acid as source of carbon compounds. The chromatographs indicate that the proportion of aminoacids in all the investigated samples is roughly equal.