

Srovnání schopnosti adaptace kmenů *Candida* k recirkulovaným melasovým záparám při semikontinuální kultivaci

ALENA ČEJKOVÁ, Výzkumný ústav lihovarského a konzervářenského průmyslu, Praha

663.14.031.234

663.14.038

Při výrobě krmného droždí na melase se používá k přípravě roztoků suroviny a živin jako zředovací kapaliny vody. Po skončeném kvasném cyklu se kvasinky oddělují od zralé zápary a supernatant se vypouští bez dalšího využití do odpadních vod. Při tomto způsobu odpovídá množství odpadních vod přibližně množství použité čerstvé vody, tj. asi 260 m³ na 1 tunu sušeného krmného droždí, z toho 120 m³ silně závadných odpadních vod s BSK₅ 660 kg O₂ [1].

Pro snížení podílu odpadních vod byl zaveden ve výrobě krmného droždí technologický periodický postup, využívající odseparované prokvašené zápary jako ředící tekutiny při přípravě melasového roztoku [2]. Recirkulaci prokvašených zápar navrhoval *Kirnbauer* [3] při výrobě pekařského droždí, kdy se do kvasného cyklu vracela pouze část odseparované zápary.

Ve výrobě krmného droždí se recirkulace prokvašené zápary opakuje až do max. dosažitelné hodnoty sušiny v zápaře, kdy se ještě podstatně nesnížuje výtěžek kvasničné biomasy. Po dosažení této hodnoty, tj. max. 7,0 °Bg [4] se odseparovaná zápara odvádí na odparku ke konečnému zahuštění. Tímto způsobem se koncentrují v zápaře balastní neasimilovatelné látky. Je to výhodné z hlediska jejich dalšího využití nebo likvidace. Do veřejných toků se za těchto podmínek vypouštějí pouze vody mycí a splachovací, tj. vody nezávadné, v množství 5 až 6 m³ (t sušeného droždí [1]). Nahromaděné neasimilovatelné látky však brzdí růst kvasničné populace a dovolují růst pouze kultuře, která se v průběhu kvasného cyklu částečně adaptovala k postupně se zvyšujícím koncentracím těchto látek. Přesto výtěžek biomasy klesá úměrně se zvyšující se hustotou zápary. Maximální výtěžek sušiny bio-

masy *T. utilis* činil v jednom kvasném provozním cyklu (vlastní pozorování v období leden až únor 1960) 11,08 g/l ve 14. h kvašení při hustotě vrácené zápary 2,8 °Bg, pak klesal na 8,29 g/l ve 22. h při 3,2 °Bg; 7,35 g/l ve 28. h při 3,9 °Bg; 6,95 g/l ve 34. h při 4,4 °Bg; 6,3 g/l ve 44. h při 5,3 °Bg; 6,09 g/l ve 60. h při 6,8 °Bg. Se zvyšující se hustotou stoupal podíl zbytkových redukujících látek na 0,167 až 0,200 %. Měnila se také morfologie kvasnišných buněk: od 25. h kvašení se vytvářely řetězce dlouhých vláknitých buněk.

Nelze přesně definovat faktory, zpomalující růst kvasničné populace v prostředí s vrácenými odseparovanými záparami. Bylo však zjištěno, že nepříznivý vliv je způsoben nahromaďujícími se neasimilovatelnými látkami, jako je betain, zbytkové redukující látky a minerální soli, jejichž koncentrace stoupají s každým vrácením odseparované zápary [5].

Práce byla věnována otázce nutnosti výběru kvasničné kultury pro kultivaci v prostředí s recirkulovanými záparami. Pokusy byly provedeny s pěti kulturami *Candida*, vybranými na základě provedeného screeningu z kolekce 42 kultur kvasinek [5], u nichž byla sledována schopnost adaptovat se v krátkém časovém úseku semikontinuální kultivace k vráceným odseparovaným záparám.

Materiál a metodika

Kultury:

Candida utilis var. *major* 156/VÚLK; Nat. Coll.

Yeast Culture, Surrey, 168. Kafrová mutanta (*Thayesen a Morris*, 1943); zaslána v r. 1961, ČSAV 653/20.

Candida tropicalis 117/VÚLK; Sokolovskij celjulozno-bumažnyj kombinát, CK-4; dovezena v r. 1958.

Candida utilis 138/VÚLK; ČSAV 653/6.

Candida tropicalis 114/VÚLK; Lochvinskij gidroliznyj zavod L-2/54; dovezena v r. 1958.

Candida tropicalis 84/VÚLK.

Všechny kultury byly uchovávány na sladidlovém (8,0 °Bg) šikmém agaru.

Substrát:

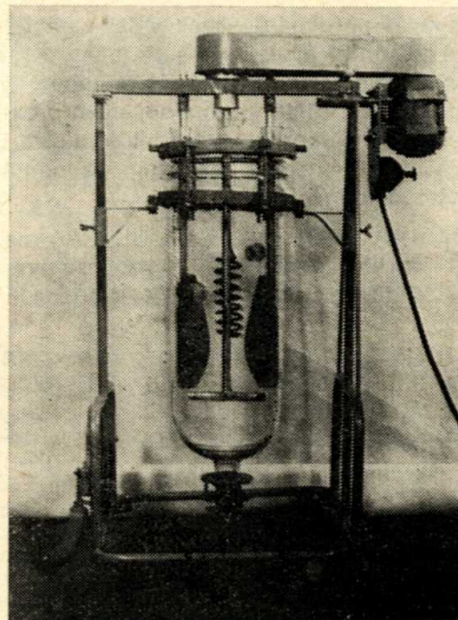
Zápary, použité ve všech pokusech, byly připraveny z jednoho vzorku řepné melasy. Základní zápara o hustotě 4,2 °Bg byla připravena pro předpokládanou 50% výtěžnost (na vnesený cukr) s 1 % sušiny obsahující 8,0 % N a 3,0 % P_2O_5 ; (dávky do 1 l vodovodní vody) melasa 42,6 g; $(NH_4)_2SO_4$ 3,3 g; $(NH_4)_2HPO_4$ 0,6 g; pH 5,5.

Kultivace:

Periodická a semikontinuální kultivace byly provedeny ve 20 l zápary ve 30 l fermentoru se samonasávacím větracím zařízením typu Waldhof s přestupem kyslíku 3,5 g/l h^{-1} (obr. 1). Fermentor byl umístěn v kóji temperované na $30 \pm 1^\circ C$.

Inokulum:

Kultury ze šikmého sladidlového agaru byly převedeny do třepacích baněk s melasovou záparou, po 24 h kultivace byly obsahy 10 baněk přidány ke 2 l melasové zápary v Bartově fermentoru obsahu 6 l.



Obr. 1. Fermentor se samonasávacím větracím zařízením

Po 48 h byl obsah fermentorů použit jako zásev 14 l melasové zápary ve $\frac{1}{4}$ provozním fermentoru. Sušina zákvasu odpovídala asi 0,2 % objemu zápary.

Aerobní respirace:

Byla měřena ve Warburgově respirometru při $30^\circ C$ za třepání o amplitudě 2,5 cm po dobu 120 min při pH 6,5. Kvasničná biomasa byla 2krát promyta fyziologickým roztokem a suspendována v čerstvém fyziologickém roztoku. 0,5 ml suspenze (sušina 5 až 7 mg) bylo pipetováno do hlavní části manometrické nádoby, obsahující 1 ml 0,15 mol KH_2PO_4 a 0,8 ml fyziologického roztoku; komínkové nádoby byl plněn 0,2 ml 2 n KOH a složeným filtračním papírkem. Do postranního ramínka nádoby bylo pipetováno 0,5 ml 0,2 mol glukózy. Nádoby byly temperovány 15 min, pak byl přidán substrát do hlavní části nádoby a bylo zahájeno měření.

Sušina biomasy kvasinek:

Byla stanovena vázkově ve váženkách s pískem. 10 ml zápary bylo odstředěno po dobu 10 min, supernatant slit, biomasa 2krát promyta destilovanou vodou a kvantitativně převedena do vysušených zvážených hliníkových misek s pískem.

Předsušení: 15 min pod infralampou. Dosušení: 1 h při $105^\circ C$.

Zbytkové redukující látky byly stanoveny v záparách podle Somogyi [6].

Amonný dusík byl stanoven rozkladem amonných solí MgO za varu.

pH bylo stanoveno potenciometricky s chinhydronovou elektrodou.

Přestup kyslíku byl stanoven širčitanovou metodou podle Coopera, Fernstroma a Millera [7].

Výsledky

U každé studované kultury byla sledována růsto-

vá křivka v jednorázové kultivaci po dobu 12 h. Každou hodinu byl sledován přírůstek biomasy, úbytek redukujících látek a amonného dusíku, změna pH a mikroskopicky byl sledován stav buněk.

Z průběhu jednorázových kultivací byla stanovena specifická růstová rychlost μ podle vztahu [8]

$$\mu = \frac{1n X - 1n X_0}{t}$$

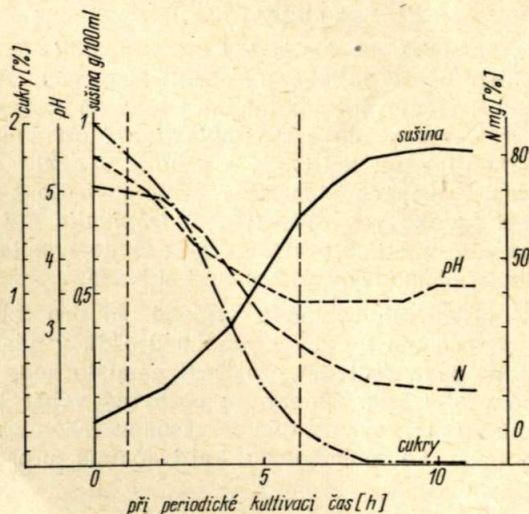
kde X_0 je počáteční množství sušiny biomasy kvasinek,

X — množství sušiny biomasy kvasinek za dobu t .

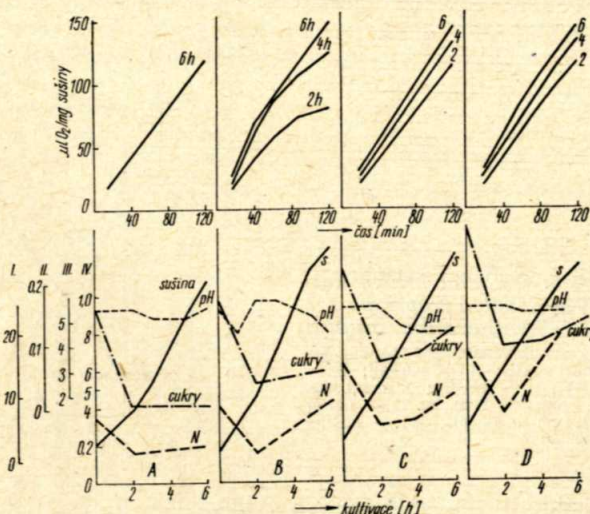
Hodnota specifické růstové rychlosti, udávající rychlost růstu biomasy v závislosti na čase, byla použita při sestavení přítokového schématu semikontinuální kultivace v pracovní etapě s vrácenými odseparovanými záparami.

Semikontinuální systém byl sestaven z několika za sebou následujících přítokových kultivací: k 17,5 l vody s 0,2 % zákvasu přepočteno na sušinu byly živiny přidávány podle přítokového schématu hodinově ve formě 40 °Bg melasy, 10% roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10% roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nebo 2,5% roztoku NH_3 . Během kultivace byl fermentor doplněn na 20 l přítoky živin. Kultivace probíhala 6 až 9 h v závislosti na použitém kmenu, až sušina dosáhla 1 % objemu zápary; pak byl obsah válce odstředěn. 17,5 l odseparované zápary se převedlo do vymytého fermentoru a část získaného droždí byla v množství 0,2 % obj. zápary použita k zákvasu. Hodinové přítoky živin byly stejné jako v předcházejícím cyklu, kde ředícím prostředím byla voda. Vrácení zápar popsaným způsobem se opakovalo bezprostředně za sebou 2 až 4krát v závislosti na chování studované kultury.

V průběhu kultivace byl v hodinových intervalech sledován přírůstek biomasy a hodnota pH. Každé dvě hodiny byl sledován úbytek cukrů a amonného dusíku. Fyziologická aktivita kvasinek byla sledována podle intenzity dýchání na glukóze. Mikroskopicky byl sledován vývoj kultur každou hodinu.



Obr. 2. Růstová křivka *Candida utilis* var. *major* 156 při jednorázové kultivaci v melasové zápare o hustotě 4,2 °Bg



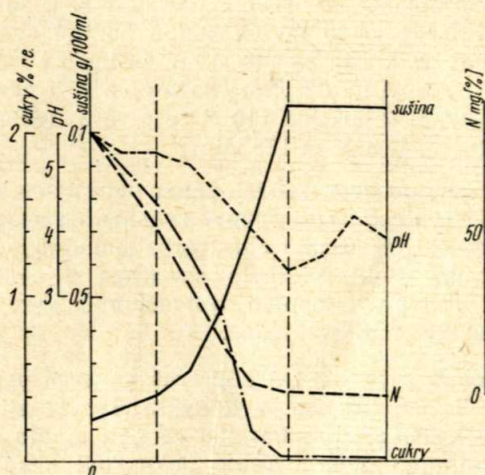
Obr. 3. Základní křivky kultivace *Candida utilis* var. *major* 156 v semikontinuálním systému a poutání O_2 na glukóze v jednotlivých fázích kultivace

Hustota odseparované zápary na konci cyklu: A-2,0 °Bg; B-2,6 °Bg; C-4,0 °Bg; D-5,1 °Bg; I — amonný N mg%; II — cukry % r. l.; III — pH; IV — sušina g/100 ml

V obr. 2 je znázorněn průběh růstové křivky *C. utilis* var. *major* 156 v jednorázové kultivaci, v obr. 3 růst kultury v semikontinuálním systému s vrácenými odseparovanými záparami. Hodnota růstové rychlosti, zjištěná v periodické kultivaci v logaritmické fázi, odpovídá $\mu = 0,28$.

Podle údajů chemické analýzy stoupá v každém cyklu semikontinuální kultivace hustota odseparované zápary z 2,0 °Bg (cyklus A) na 2,6 °Bg (B), 4,0 °Bg (C) a 5,1 °Bg (D). Zvyšuje se podíl zbytkových redukujících látek, které jsou pro kulturu nedostupné [5]. Část dodávaného amonného dusíku zůstává v zápare nevyužita.

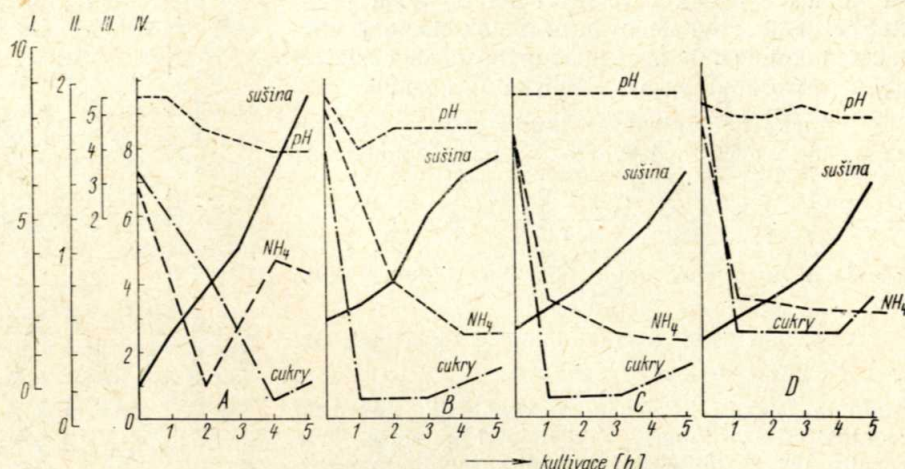
Z křivek grafů je zřejmé, že kultura je schopna se adaptovat k vráceným odseparovaným záparám v podmínkách semikontinuální kultivace. Ve srovnání s periodickou kultivací přítokový semikontinuální systém zintenzivňuje nahromadování kvasničné biomasy. Při hodnocení růstových rychlostí μ



Obr. 4. Růstová křivka *Candida tropicalis* 117 při jednorázové kultivaci v melasové zápare o hustotě 4,2 °Bg

Obr. 5. Základní křivky kultivace *Candida tropicalis* 117 v semikontinuálním systému

Hustota odseparované zápary na konci cyklu: A — 2,6 °Bg; B — 3,8 °Bg; C — 4,9 °Bg; D — 6,1 °Bg. I — amonný N mg%; II — cukry % r. l.; III — pH; IV — sušina g/100 ml



v jednotlivých kultivačních cyklech (A, B, C, D) se však projevuje nepříznivý vliv vrácených zápar, přesto, že přítoková kultivace pozitivně ovlivňuje hodnotu μ : v cyklu A bez vrácených zápar hodnota μ (0,28) odpovídá růstové rychlosti, zjištěné v logaritmické fázi jednorázové kultivace; v cyklu B hodnota μ stoupá na 0,32 a dosahuje maxima; v dalším cyklu se již projevuje nepříznivý vliv vrácených zápar poklesem růstové rychlosti na $\mu = 0,29$. V cyklu D je hodnota růstové rychlosti nižší (0,26) hodnoty μ jednorázové kultivace.

Nepříznivý vliv vrácených zápar se dále projevuje ve fyziologické aktivitě, vyjádřené dýcháním na glukóze, která na začátku nového kultivačního cyklu klesá, ale dosahuje hodnoty předcházející kultivace již za 6 h růstu.

Na obr. 4 a 5 jsou znázorněny růstové křivky *C. tropicalis* 117 v jednorázové a semikontinuální kultivaci. V tomto případě je pokles růstové rychlosti vlivem vrácených zápar velmi patrný. Aktivita aerobní respirace buněk z cyklů s vrácenými záparami klesla ve srovnání s respirací buněk z cyklu A o $\frac{1}{3}$, dosáhla však určité vyrovnanosti bez velkých výkyvů na začátku nových kultivačních cyklů.

Obdobný průběh byl zjištěn u kultury *C. utilis* 133, u níž se v cyklu D snížilo množství sušiny nahromaděné biomasy na 0,681 g/100 ml v 6. h ve srovnání s 0,852 g/100 ml ve stejné hodině cyklu A. Spotřeba O_2 klesla ze 148 μ l/mg sušiny za 120 min v 6. h cyklu A na 82 μ l/mg sušiny ve 2. h cyklu B; v 6. h cyklu B dosáhla 110 μ l O_2 a ve 2. cyklu C — 98 μ l O_2 /mg sušiny za 120 min.

Jiný vliv odseparovaných zápar byl zjištěn u kultury *C. tropicalis* 114: růstová rychlost se nesnížila, byla však silně stimulována tvorba mohutného pseudomycelia. Kultivace byla skončena v cyklu B, ačkoli aktivita aerobního systému byla vyrovnána a přírůstek biomasy vysoký.

Obdobně byla kultivace přerušena v případě *C. tropicalis* 84, kdy ve 2. h cyklu B byly zjištěny shluky kvasinek, přecházející ve 4. h tohoto cyklu v aglutinující útvary. Tento pokus byl několikrát opakován se stejnou aglutinací buněk již na začátku kultivace s vrácenými záparami.

Závěr

Provedené pokusy ukázaly na odlišné chování jednotlivých kultur kvasinek v přítomnosti vrácených odseparovaných zápar, tj. v prostředí s nahromaděnými vlastními metabolity, minerálními solemi a řadou neasimilovatelných organických látek.

U všech kultur se snížila vlivem tohoto nepříznivě se uplatňujícího prostředí růstová rychlost buď již při prvním vrácení odseparované zápar, nebo později v závislosti na schopnosti kultury adaptovat se ke změněným podmínkám prostředí.

Semikontinuální způsob kultivace zvýšil u *Candida utilis* var. major 156 hodnotu μ ve srovnání s jednorázovou kultivací a pouze v posledním cyklu převládla nepříznivý vliv vrácené zápar. O velké adaptační schopnosti této kultury svědčí rychlé vyrovnávání respirační aktivity, které nastává již v průběhu 6 h kultivace v každém cyklu.

Rychlý pokles v intenzitě nahromadování biomasy byl pozorován u kultur *C. tropicalis* 117 a *C. tropicalis* 138 již při prvním vrácení odseparované zápar. Není však vyloučeno, že prodloužením doby jednotlivých kultivačních cyklů u obou kultur anebo mírnějším zvyšováním hustoty zápar v jednotlivých cyklech, by se dosáhlo stejného výsledku jako v pokuse s *C. utilis* var. major 156.

U kmenů *C. tropicalis* 114 a *C. tropicalis* 84 bylo zjištěno zcela odlišné působení vrácených zápar: pomalé oddělování dceřinných buněk od buňky mateřské, pozorované u *C. tropicalis* 84 při zahájení semikontinuální kultivace s přítoky v cyklu A, se vlivem vrácených zápar stupňovalo až vedlo k aglutinaci řetězkových útvarů; u *C. tropicalis* 114 vrácené zápar stimulovaly tvorbu pseudomycelia, vyvolanou přítokovým způsobem kultivace.

Ze získaných výsledků vyplývá, že pro technologický postup výroby krmného droždí, v němž se používá jako ředícího prostředí namísto vody vrácené prokvašené zápary, je nezbytný výběr kvasničné kultury, vyznačující se vysokou schopností se adaptovat ke změněnému kultivačnímu prostředí.

Souhrn

Pro snížení množství odpadních vod při výrobě krmného droždí na melase je zaveden technologický

ký postup, v němž se používá namísto vody jako ředící tekutiny vrácené, prokvašené, odstředěné zápary. V práci byl sledován vliv těchto recirkulovaných zápar na chování 5 kultur kvasinek rodu *Candida* při semikontinuální kultivaci, kdy se postupným vrácením zápar koncentrují balastní neasimilovatelné látky v prostředí a zvyšuje se hustota kultivačního prostředí. U všech studovaných kultur se vlivem vrácené zápary snížila hodnota růstové rychlosti μ ve srovnání s jednorázovou kultivací buď již při prvním vrácení prokvašené zápary, nebo později, v závislosti na schopnosti kultury adaptovat se ke změnám podmínek prostředí. Zatímco *Candida utilis* var. *major* 156 se vyvíjela bez snížení výtěžku biomasy až do určitého stupně hustoty zápary a *C. tropicalis* 117 a *C. utilis* 138 vyžadovaly pomalou adaptaci již k prvním vráceným záparům, byly kultury *C. tropicalis* 114 a 84

pro tento způsob kultivace nevyhovující pro zvýšenou tvorbu pseudomycelia a aglutinaci, vyvolané změnám prostředím.

Literatura

- [1] Hauser, K.: Optimální varianta výroby sušených krmných kvasnic z potravinářských surovin a odpadů. Kand. dis. práce, VŠCHT Praha 1961.
- [2] Grégr, V.-Dyr, J.-Barta, J.: Způsob výroby krmného droždí, pekařských kvasinek a jiných mikroorganismů bez odpadních vod. Patent ČSSR 96374 (1960).
- [3] Kirnbauer, H.: Rak. patent 165437 (1932).
- [4] Grégr, V.-Barta, J.-Zajíc, K.: Výzkum výroby krmného droždí s vrácením prokvašených odstředěných zápar. Záv. zpráva VŠCHT 1959.
- [5] Čejková, A.: Fysiologická adaptace *Candida utilis* k zahuštěným melasovým záparům. Kand. dis. práce, Přírodovědecká fak. University Karlovy, Praha 1962.
- [6] Somogyi, M.: Notes of sugar determination. = „J. Biol. Chem.“, 195, 1952 : 19.
- [7] Cooper, C. M.-Fernstrom, G. A.-Miller, S. A.: Gas-liquid contactor. = „Ind. Eng. Chem.“, 36, 1944 : 504.
- [8] Monod, J.: La technique de culture continue; theorie et application. = Ann. Inst. Pasteur“, 79, 1950 : 390.

Došlo do redakce 24. 1. 1965.

СПРАВНЕНИЕ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ ШТАММОВ СЕМЕЙСТВА *CANDIDA* К УСЛОВИЯМ РЕЦИРКУЛЯЦИИ ПАТОЧНЫХ ЗАТОРОВ ПРИ ПОЛУНЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТИВАЦИИ

В статье приводятся результаты сравнительных испытаний пяти штаммов дрожжей семейства *Candida*, направленных на изучение их поведения в условиях рециркуляции заторов (новая технология, на которую был выдан в Чехословакии патент). Под влиянием рециркуляции у всех штаммов обнаружилось замедление скорости размножения. Меньше всего обнаружилось влияние у штамма *Candida utilis* var. *major* 156. Хотя выход биологической массы уменьшился, это имело место лишь при условии превышения определенного предела густоты затора. Все другие штаммы дали неудовлетворительные результаты.

VERGLEICH DER ADAPTATIONS-FÄHIGKEIT DER CANDIDA-HEFE-STÄMME AUF REZIRKULIERTE MELASSEMAISCHEN BEI SEMIKONTINUIERLICHER KULTIVATION

Es werden Versuche beschrieben, bei denen 5 *Candida-Hefekulturen* in den Bedingungen der „rezirkulierten Maischen“ (tschechoslowakisches Patent) verfolgt wurden. Bei allen Versuchsstämmen wurde die Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt, im geringsten jedoch bei dem Stamm *Candida utilis* var. *major* 156, bei dem die Abnahme der Biomasse-Ausbeute erst nach der Erreichung eines bestimmten Grades der Maischedichte beobachtet wurde. Bei den übrigen Versuchsstämmen zeigten sich viel grössere Mängel.



ADAPTABILITY OF THE CANDIDA STRAINS TO RECIRCULATED MOLASSES MASH AND SEMI-CONTINUOUS CULTIVATION

Five strains of the *Candida* yeast family have been tested to study their behaviour in the new process known as molasses mash recirculation (the process has been recently patented in Czechoslovakia). Recirculation of mash slows down the propagation speed. From five strains selected for comparison *Candida utilis* var. *major* 156 was affected far less than others. The drop in the yield of biologic substance was observed only when the mash density exceeded certain limits. Four other strains failed under the described conditions to give satisfactory results.