

## Kultivace kvasinek *Candida utilis* na etanolovém substrátu

### II. Vliv některých biogenních a stopových prvků na růst při kultivaci ve třepacích baňkách

532.232.232  
576.8.093.3

Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha,  
Doc. Ing. KAREL PECKA, CSc., VŠCHT, katedra technologie ropy a petrochemie, Praha.

Růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu je stimulován přidavkem malého množství melasových lihovarských výpalků, přičemž se výtěžnost kvasničné sušiny z dodaného substrátu zvyšuje až o 10 % [1]. Při zkoumání příznivého účinku výpalků bylo stanoveno, že značný podíl na stimulaci vykazuje anorganická složka, reprezentovaná popelem výpalků, ve kterém se nachází řada prvků. Tato skutečnost vede k předpokladu, že výpalky, resp. popel výpalků, zvyšuje v živném médiu obsah některých prvků nebo dodává další, které se příznivě uplatňují při asimilaci etanolu. V předcházející práci [2] bylo zjištěno, že přidavkem výpalků se živné médium obohacuje o sodík, železo, mangan, hliník, vápník, draslík, měď, zinek a hořčík. Bilančními pokusy bylo dokázáno, že většina uvedených prvků je využita kvasinkami při stavbě buněčné hmoty, pouze sodík, vápník a hliník zůstávají z velké části v médiu. Stupeň využití prvků je ovlivněn přítomností výpalků v tom směru, že kvasinky kultivované s výpalky obsahují více železa, manganu, draslíku a hořčíku a méně sodíku, mědi, hliníku, vápníku a zinku ve srovnání s kontrolními kvasinkami.

V další části výzkumu stimulačního účinku výpalků bylo sledováno, který prvek nebo prvky obsažené v popelu výpalků se rozhodujícím způsobem uplatňují při růstu kvasinek z etanolu nebo jsou pro daný proces nezbytné. Výsledky výzkumu jsou uvedeny v předložené práci.

#### MATERIÁL A METODIKA

##### Mikroorganismus

Byl použit kvasničný kmen *Candida utilis* č. 49 ze sbírky VÚKPS, Praha.

##### Příprava a udržování produkčního kmene

Pro pokusné účely byla kvasničná kultura vyhledově na několikanásobným pasážováním v laboratorním fermentoru v minimálním živném médiu. Kvasničná biomasa oddělená separací se uchovávala ve formě pasty v chladnici při 5 °C a v 7 až 10denních intervalech byla

připravována čerstvá. Inokulační pasta pro vlastní pokusy byla připravována kultivací ve třepacích baňkách v minimálním živném médiu bezprostředně před použitím.

##### Složení minimálního živného média

1 litr minimálního živného média obsahoval 0,54 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,20 g močoviny, 0,76 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 20 ml 90,67% čistého etanolu (tj. 14,8 g abs. alkoholu); k rozpouštění živných solí p. a. byla použita redestilovaná voda ze skleněného přístroje. Před doplněním na konečný objem bylo upraveno pH na 4,5 (5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p. a. nebo 5%  $\text{KOH}$  p. a.) a přidána inokulační pasta v množství odpovídajícím 2 g kvasničné sušiny, popřípadě byly dávkovány zkoušené látky.

##### Kultivační postup

Kultivace byly provedeny v 500 ml varných baňkách opatřených dvěma protilehlými zářezy ve stěně ke zvýšení přestupu kyslíku. Baňky byly plněny 50 ml živného média, uzavřeny uzávěrem z filtračního papíru a umístěny na rotační třepačku. Rychlost rozpouštění kyslíku, stanovená siřičitanovou metodou, byla 220 mmol  $\text{O}_2$ /l h při 240 ot/min a teplotě 30 °C. Kultivace byly vedeny 12 hodin.

##### Příprava roztoku popela výpalků

2 g popela získaného spálením zahuštěných melasových lihovarských výpalků v elektrické peci při 500 až 550 °C bylo rozpuštěno ve 100 ml konc.  $\text{HCl}$  p. a. a doplněno redestilovanou vodou na 250 ml.

##### Příprava roztoků zkoušených prvků

Pro přípravu roztoků jednotlivých prvků byly použity jednoduché minerální soli vesměs p. a. a k rozpouštění byla použita redestilovaná voda (tabulka 1).

##### Analytické metody

pH bylo měřeno pH-metrem.

Sušina kvasničné biomasy: byla stanovena vážkově po filtraci 5 ml vzorku přes skleněný filtrační kelímek  $\text{S}_4$ ,



po promytí dest.  $H_2O$  ( $2 \times 10$  ml) a po dvou hodinách sušení při  $105^\circ C$ .

#### Etanol

a) v kultivačním médiu byl stanoven oxidometricky po vydestilování alkoholu do roztoku dvojchromanu draselného v konc.  $H_2SO_4$ ;

b) obsah alkoholu v čistém etanolu byl stanoven pyknometricky.

**Výtěžnost:** byla počítána z přírůstku kvasničné sušiny z dodaného etanolu a vyjádřena v %hm.

**Stanovení prvků v popelu výpalků:** bylo provedeno semi-kvantitativní emisní spektrometrií a atomovou absorpční spektrometrií [AAS].

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Vliv popela výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu

Vliv přísadků popela výpalků, resp. jednotlivých prvků nacházejících se v popelu na růst kvasinek, byl sledován kultivacími ve třepacích baňkách v minimálním médiu, tj. v prostředí s vyloučením vedlejších zdrojů zkoušených prvků. Pokusy byly provedeny s kvasničným kmenem podrobeným vyhladovění vzhledem ke zkoušeným prvkům s výjimkou draslíku a hořčíku, které jsou stálou součástí živného média.

Ve vzorku popela melasových lihovarských výpalků použitým v této práci byly stanoveny metodami semi-kvantitativní emisní spektrometrie a AAS tyto prvky: K, Na, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, B, Co, Al a Pb. Podle analýzy popela výpalků bylo vypočteno množství jednotlivých prvků vnášených do média optimálním přídatkem popela (tabulka 2) a bylo sestaveno modelové médium analogické minimálnímu médiu s přídatkem popela. Optimální přídatek popela výpalků odpovídal 800 mg/l média a byl stanoven v dřívějších pokusech [3]. U prvků stanovených semikvantitativní analýzou (Na, Ca, Mg, Al, B a Pb) bylo zvoleno množství, odpovídající přibližně středu koncentračního rozsahu.

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky kultivace kvasinek na etanolu v minimálním živném médiu, dále vliv optimálního přídatku popela výpalků a kultivace v modelovém médiu. Výsledky jsou průměrem hodnot získaných z pěti nezávislých pokusů a jsou vztaheny na 12hodinovou kultivaci, což je doba potřebná k využití dodaného substrátu v médiu s přídatkem popela výpalků. V minimálním živném médiu vykazovaly kvasinky velmi slabý růst, který odpovídal výtěžnosti 26,4 %. Přídatkem popela se výtěžnost zvýšila na 55,6 % a v modelovém médiu byla 62,4 %.

### Vliv zkoušených prvků na růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu

Značné zvýšení výtěžnosti, které bylo stanoveno v modelovém médiu, potvrzuje předpoklad, že účinek popela výpalků spočívá v dodání minerálních látek, resp. některých prvků. Popel výpalků obsahuje vedle typických biogenních a stopových prvků další prvky, jejichž význam není plně objasněn ve vztahu k tvorbě biomasy nebo může být spíše negativní. K vytypování prvků nejúčinněji působících na růst kvasinek z etanolu bylo provedeno několik sérií kultivačních pokusů, při nichž byla použita eliminační metoda výběru prvků, tj. z modelového živného média byly postupně vylučovány prvky nebo skupiny prvků na základě dosažených výsledků. V každé pokusné řadě byly kombinovány tři prvky a složení média, u kterého byla stanovena nejvyšší výtěžnost, bylo použito jako základ pro další práci; v některých případech byla vzata v úvahu i jiná kritéria.

Tabulka 1. Přehled roztoků zkoušených prvků

Prvek	Sůl*	g soli/l roztoku	mg prvku/l roztoku
K	KCl	1,423	1 000
Na	NaCl	1,487	1 000
Ca	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	3,662	1 000
Mg	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	10,134	1 000
Fe	$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	0,483	100
Zn	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,044	10
Cu	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,039	10
Mn	$MnCl_2 \cdot 7 H_2O$	0,036	10
Mo	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	0,228	10
B	$H_3BO_3$	0,035	10
Co	$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,134	10
Al	$AlCl_3 \cdot 6 H_2O$	0,089	10
Pb	$PbSO_4$	0,022	5

\* všechny použité chemikálie byly p. a.

Tabulka 2. Množství jednotlivých prvků vnášených do živného média optimálním přídatkem popela výpalků (800 mg/l)

Prvek	mg/l média	Prvek	mg/l média
draslík	228	olovo	0,356
sodík	35	zinek	0,336
vápník	35	mangan	0,152
hořčík	3,5	molybden	0,136
hlinitík	3,5	měď	0,0336
železo	1,273	kobalt	0,0266
bor	0,35		

Tabulka 3. Vliv přídatku popela výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu

Médium	Přírůstek kvasničné sušiny g/l	Výtěžnost %
minimální médium	3,89	26,4
minimální médium s popelem výpalků	8,23	55,6
modelové médium	9,24	62,4

Tabulka 4. Výsledky pokusné řady I.

V minimálním médiu byly obsaženy K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Co, Al a kombinovány Mn, Mo, B.

Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  25,2 %,  $V_2$  55,4 %.

Médium č.	Co	Al	Pb	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
1	+	+	+	62,3	37,1	6,9
2	+	+	—	67,3	42,1	11,9
3	+	—	+	59,8	34,6	4,4
4	—	+	+	66,0	40,8	10,6
5	+	—	—	64,0	38,8	8,6
6	—	+	—	66,6	41,4	11,2
7	—	—	+	61,4	36,2	6,0
8	—	—	—	64,8	39,6	9,4

Výsledky kultivačních pokusů jsou uspořádány v tabulkách 4 až 12. Zajištění stejné kvality inokulačního materiálu pro dlouhodobé pokusy je obtížné i přes zachování zvolených podmínek jeho přípravy. Aby byly výsledky v tomto směru co nejméně ovlivněny, byla v každé pokusné řadě nasazována kontrolní kultivace v minimálním živném médiu (kontrolní kultivace č. 1). Pro porovnání vlivu prvků vzhledem k vlivu popela výpalků byla dále prováděna kontrolní kultivace č. 2.



Tabulka 5. Výsledky pokusné řady II.

V minimálním médiu byly obsaženy K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Co, Al a kombinovány Mn, Mo, B.  
Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  24,6 %,  $V_2$  53,5 %.

Médium č.	Mn	Mo	B	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
2	+	+	+	65,0	40,4	11,5
9	+	+	+	61,6	37,0	8,1
10	+	+	+	64,6	40,0	11,1
11	+	+	+	56,9	32,3	3,4
12	+	+	+	62,2	37,6	8,7
13	+	+	+	56,6	32,0	3,1
14	+	+	+	54,2	29,6	0,7
15	+	+	+	57,2	32,6	3,7

Tabulka 6. Výsledky pokusné řady III.

V minimálním médiu byly obsaženy K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu a kombinovány Mn, Mo, B.  
Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  26,2 %,  $V_2$  53,2 %.

Médium č.	Mn	Mo	B	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
8	+	+	+	64,0	37,8	10,8
16	+	+	+	61,4	35,2	8,2
17	+	+	+	65,7	39,5	12,5
18	+	+	+	63,7	37,5	10,5
19	+	+	+	64,0	37,8	10,8
20	+	+	+	63,9	37,7	10,7
21	+	+	+	68,7	42,5	15,5
22	+	+	+	64,7	38,5	11,5

Tabulka 7. Výsledky pokusné řady IV.

V minimálním médiu byly obsaženy K, Na, Ca, Mg, Zn a kombinovány Fe, Cu, B.  
Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  25,3 %,  $V_2$  55,0 %.

Médium č.	Fe	Cu	B	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
21	+	+	+	66,4	41,1	11,4
22	+	+	+	68,5	43,2	13,5
23	+	+	+	69,6	44,3	14,6
24	+	+	+	63,1	37,8	8,1
25	+	+	+	22,7	2,6	32,3
26	+	+	+	23,5	1,8	31,5
27	+	+	+	23,5	1,8	31,5
28	+	+	+	24,1	1,2	30,9

Tabulka 8. Výsledky zkrácené pokusné řady IV.

V minimálním médiu byly obsaženy K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn a kombinovány Cu a B.  
Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  26,4 %,  $V_2$  54,0 %.

Médium č.	Cu	B	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
21	+	+	65,6	39,2	11,6
22	+	+	66,5	40,1	12,5
23	+	+	70,2	43,8	16,2
24	+	+	63,4	37,0	9,4

v minimálním živném médiu s přidavkem popela výpalků. Všechny kontrolní a pokusné kultivace byly vedeny nejméně ve třech paralelních bankách. Vliv prvků byl posuzován jednak hodnotou zvýšení výtěžnosti  $ZV_1$  ve srovnání s výtěžností  $V_1$  kontrolní kultivace č. 1, jednak hodnotou zvýšení výtěžnosti  $ZV_2$  proti výtěžnosti  $V_2$  kontrolní kultivace č. 2.

a) *Pokusná řada I.* V této pokusné řadě byly zkoušeny kombinace Co, Al a Pb v kompletním modelovém médiu (č. 1, tabulka 4). Je zajímavé, že v některých případech byly dosaženy vysoké výtěžnosti v přítomnosti Al a Pb; např. v médiu č. 4 bylo  $ZV_2$  10,6 % a v médiu č. 6 11,2 %.

b) *Pokusná řada II.* Pro tuto řadu bylo zvoleno médium č. 2, které poskytlo nejlepší výsledek a byly obměňovány prvky Mn, Mo a B. Z tabulky 5 je vidět zřejmá závislost výtěžnosti na přidavku Mn; v médiích, v nichž tento prvek chybí, nepřesahuje výtěžnost 60 %. Za přítomnosti Mn byly získány hodnoty  $ZV_2$  8,1 až 11,5 %, bez Mn  $ZV_2$  0,7 až 3,7 % bez zřetele na zastoupení Mo a B. Přidavek B se projevil příznivě v přítomnosti Mn (médium č. 2 se  $ZV_2$  11,5 % a č. 10 se  $ZV_2$  11,1 %).

c) *Pokusná řada III.* V médiu č. 8, tj. s vyloučením Co, Al a Pb byly kombinovány opět prvky Mn, Mo a B (tabulka 6). Nejvyšší výtěžnost byla stanovena u média č. 21 bez přidavku Mn a Mo v přítomnosti B, a to 68,7 %, odpovídající  $ZV_2$  15,5 %. V této pokusné řadě nebyl pozorován stejný vztah mezi výtěžností a přidavkem Mn jako v řadě II. Příznivější účinek vykazoval B bez zřetele na Mn a Mo, jak je vidět z hodnot zvýšení výtěžnosti u média č. 8 se  $ZV_2$  10,8 %, č. 17 se  $ZV_2$  12,5 % a č. 21 se  $ZV_2$  15,5 %.

d) *Pokusná řada IV.* Jednoznačná závislost růstu kvasinek na přítomnosti železa v médiu vyplývá z výsledků této pokusné řady (tabulka 7), v níž byly zkoušeny kombinace Fe, Cu a B v médiu č. 21. V nepřítomnosti Fe (média č. 25, 26, 27 a 28) rostly kvasinky velmi špatně bez zřetele na zastoupení dalších zkoušených prvků a příslušné  $ZV_2$  se pohybovaly od -32,3 do -30,9 %. V médiích s přidavkem Fe byla stanovena závislost výtěžnosti na kombinaci prvků Cu a B. Nejlepší výsledek  $ZV_2$  14,6 % poskytlo médium č. 23 bez přidavku Cu za přítomnosti B. Vysoké  $ZV_2$  13,5 % bylo dosaženo s opačnou kombinací prvků (médium č. 22). Nižší výtěžnosti byly nalezeny v přítomnosti Cu a B (médium č. 21 se  $ZV_2$  11,4 %) a bez obou prvků (médium č. 24 se  $ZV_2$  8,1 %).

Jelikož výsledky kultivací v předcházející řadě (III.) vykazovaly opačnou závislost výtěžnosti na přítomnosti B než v řadě IV., byl vzájemný vztah Cu a B na růst kvasinek sledován v dalších třech samostatných pokusech a z jejich výsledků byly vypočteny průměrné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 8. Vztahu mezi Cu a B byla věnována zvýšená pozornost z důvodů eventuální aplikace výsledků při kultivacích ve větším měřítku ať v laboratorních fermentorech či v provozních podmínkách, neboť bylo zjištěno, že v těchto případech je nutno počítat vždy s přítomností většího množství Cu v kultivačním prostředí korozí fermentačního zařízení. Výsledky v tabulce 8 potvrzují, že optimální složení vykazuje médium č. 23 bez Cu a s přidavkem B, dosažené  $ZV_2$  bylo 16,2 %. Opačná kombinace způsobila  $ZV_2$  12,5 %, tj. také vyšší hodnota než v přítomnosti obou prvků [ $ZV_2$  11,6 %] nebo bez nich [ $ZV_2$  9,4 %]. Ze zjištěných závislostí vyplývá, že v přítomnosti Cu se přidavek B neprojevuje příznivě, proto byl B z uvedených důvodů z dalších pokusů vyloučen.

e) *Pokusná řada V. a VI.* V těchto pokusných řadách byl sledován vliv prvků K, Na, Ca a Mg. V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky získané kombinováním K, Na a Mg v médiu č. 22. Hodnoty výtěžností jsou velmi vyrovnané, přičemž  $ZV_2$  většinou přesahují 10 %. Při výběru média pro další práci byl vzat v úvahu poměr množství těchto čtyř prvků dávkovaných do 1 litru minimálního média k množství, které je vnášeno popelem výpalků, resp. které je modelováno přidavkem roztoků



Tabulka 9. Výsledky pokusné řady V.

V minimálním médiu byly obsaženy Ca, Fe, Zn, Cu a kombinovány K, Na, Mg.

Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  21,3 %,  $V_2$  48,8 %.

Médium č.	K	Na	Mg	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
22	+	+	+	60,6	39,3	11,8
29	+	+	+	60,9	39,6	12,1
30	+	+	+	60,9	39,6	12,1
31	+	+	+	60,5	39,2	11,7
32	+	+	+	60,9	39,6	12,1
33	+	+	+	60,4	39,1	11,6
34	+	+	+	59,7	38,4	10,9
35	+	+	+	60,0	38,7	11,2

Tabulka 10. Výsledky pokusné řady VI.

V minimálním médiu byly obsaženy Fe, Zn, Cu a kombinovány K, Na, Ca.

Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  25,5 %,  $V_2$  54,3 %.

Médium č.	K	Na	Ca	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
29	+	+	+	63,5	38,0	9,2
36	+	+	+	61,4	35,9	7,1
32	+	+	+	65,2	39,7	10,9
34	+	+	+	69,7	44,2	15,4
37	+	+	+	63,6	38,1	9,3
38	+	+	+	63,5	38,0	9,2
35	+	+	+	59,3	33,8	5,0
39	+	+	+	61,6	36,1	7,3

Tabulka 11. Výsledky pokusné řady VII.

V minimálním médiu byly obsaženy Na, Ca, Fe a kombinovány Zn, Cu, Mn.

Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  18,3 %,  $V_2$  48,1 %.

Médium č.	Zn	Cu	Mn	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
40	+	+	+	61,6	43,3	13,5
34	+	+	+	62,1	43,8	14,0
41	+	+	+	65,7	47,4	17,6
42	+	+	+	47,2	28,9	-0,9
43	+	+	+	64,1	45,8	16,0
44	+	+	+	51,8	33,5	3,7
45	+	+	+	38,6	20,3	-9,5
46	+	+	+	36,5	18,2	-11,6

Tabulka 12. Výsledky pokusné řady VIII.

V minimálním médiu byly obsaženy Na, Ca, Fe, Zn a kombinovány Mg, Cu, Mn.

Výtěžnosti kontrolních kultivací:  $V_1$  20,0 %,  $V_2$  50,2 %.

Médium č.	Mg	Cu	Mn	V %	ZV <sub>1</sub> %	ZV <sub>2</sub> %
47	+	+	+	68,6	48,6	18,4
31	+	+	+	63,3	43,3	13,1
48	+	+	+	66,1	46,1	15,9
40	+	+	+	64,2	44,2	14,0
49	+	+	+	65,2	45,2	15,0
34	+	+	+	64,5	44,5	14,3
41	+	+	+	66,8	46,8	16,6
43	+	+	+	65,2	45,2	15,0

příslušných prvků. Množství K vnášené popelem zvyšuje jeho obsah v médiu dvojnásobně (z 217 mg na 455 mg K). Na a Ca se v minimálním médiu nevyskytují a jejich přidavek 35 mg je podstatný. Přidávané množství 3,5 mg Mg je vzhledem k obsahu v minimálním médiu (25 mg) velmi malé. Proto bylo pro další pokusy zvoleno médium bez přídavku Mg, ve kterém byly kombinovány K, Na a Ca.

Výtěžnosti dosažené v pokusné řadě VI. (tabulka 10) jsou na rozdíl od výsledků pokusné řady V. více ovliv-

něny přítomností kombinovaných prvků. Nejlepší výsledek byl získán s médiem č. 34 bez přídavku K, dosažené ZV<sub>2</sub> odpovídalo 15,4 %. Příznivý vliv na růst kvasinek lze pozorovat dále u médií obsahujících Ca. Porovnávali-li se vždy dvě stejná média lišící se pouze přítomností Ca (média č. 29 a 36, č. 32 a 37, č. 34 a 38, č. 35 a 39), je vidět, že ve třech případech jsou výtěžnosti u médií s Ca vyšší.

f) *Pokusná řada VII.* V pokusné řadě VII. byly kombinovány prvky Zn, Cu a dále Mn, jehož přídavek poskytoval některé velmi dobré výsledky v prvních pokusech. Výsledky kultivací (tabulka 11) ukazují příznivý vliv Zn na růst kvasinek. Přídavek Zn do médií č. 40, 34, 41 a 43 poskytl ZV<sub>2</sub> 13,5 až 17,6 %. Dále je patrná určitá závislost mezi Cu a Mn v přítomnosti Zn, podobná vztahu mezi Cu a B. Nejvyšší výtěžnost byla nalezena v médiu č. 41, tj. s přídavkem Mn bez Cu (ZV<sub>2</sub> 17,6 %). Bez přídavku obou prvků byla hodnota ZV<sub>2</sub> rovněž vysoká, a to 16,0 %. Poněkud nižší výtěžnosti byly zaznamenány v přítomnosti Cu bez Mn, ZV<sub>2</sub> 14,0 % v médiu č. 34 a s oběma prvky, ZV<sub>2</sub> 13,5 % v médiu č. 40.

g) *Pokusná řada VIII.* V poslední pokusné řadě byly sledovány kombinace prvků Cu, Mn a Mg v médiu č. 47 (tabulka 12). Opět se projevil stejný vztah mezi Cu a Mn jako v předcházející pokusné řadě, bez zřetele na přídavek Mg. Lepší výsledky poskytovala média obsahující Mn (médium č. 48 se ZV<sub>2</sub> 15,9 % a médium č. 41 se ZV<sub>2</sub> 16,6 %) než média s přídavkem Cu (médium č. 31 se ZV<sub>2</sub> 13,1 % a médium č. 34 se ZV<sub>2</sub> 14,4 %). V médiích bez Mn a Cu bylo dosaženo ZV<sub>2</sub> 15,0 % (médium č. 49 s přídavkem Mg a médium č. 43 bez přídavku Mg). Avšak značný vliv přídavku Mg na zvýšení výtěžnosti byl zaznamenán v médiu č. 47 obsahujícím Cu a Mn, u kterého hodnota ZV<sub>2</sub> dosáhla 18,4 % na rozdíl od hodnoty ZV<sub>2</sub> 14,0 % v médiu č. 40.

Téměř všechny zkoušené kombinace sledovaných prvků způsobily zvýšení výtěžnosti proti kontrolním kultivacím vedeným v minimálním živném médiu, tj. všechny hodnoty ZV<sub>1</sub> byly kladné s výjimkou pokusů, u nichž bylo z média vyloučeno Fe. Dále bylo zjištěno, že přídavky jednotlivých prvků v různých kombinacích rovněž vykazovaly větší účinek na růst než přídavek popela výpalků, což ukazují hodnoty ZV<sub>2</sub>, které byly ve většině také kladné, kromě pokusů s vyloučením Fe nebo Zn. Nejvyšší zvýšení výtěžnosti, ZV<sub>2</sub> 18,4 %, bylo dosaženo v minimálním živném médiu s přídavkem Na, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn a Mg (médium č. 47). Obsah sledovaných prvků v 1 litru tohoto média: 217 mg K (ze základního živění), 28,5 mg Mg (ze základního živění a přídavek 3,5 mg), 35 mg Na, 35 mg Ca, 1,272 mg Fe, 0,336 mg Zn, 0,0366 mg Cu a 0,152 mg Mn.

Většina těchto prvků, Fe, Zn, Cu a Mn, patří mezi obecně známé stopové prvky a jejich význam pro mikrobiální metabolismus je hlavně v aktivaci různých enzymů. Fe aktivuje cytochromový systém a citrátový cyklus [4] a je nutné pro růst kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Torulopsis utilis* [5, 6]. Nezbytnost Fe pro růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu byla potvrzena, neboť za jeho nepřítomnosti byly výsledky stejné jako v minimálním médiu. Značné zhoršení růstu nastalo také při vyloučení Zn, který je součástí alkoholové dehydrogenázy [7] a kromě toho, že zvyšuje růst [8], zvyšuje také obsah proteinů v biomase [9].

Další stopové prvky, Cu a Mn, nemají na sledovaný proces tak výrazný vliv jako Fe a Zn, neboť za jejich nepřítomnosti bylo dosaženo rovněž dobrých výsledků, vyjádřeno hodnotou zvýšení výtěžnosti ZV<sub>2</sub> 15,0 až 17,6 %. Požadavky na množství Cu leží pro mnohé mikroby velice nízko [4], pro *Torulopsis utilis* byl stanoven nutný přídavek 3 µg Cu/l [5], což je množství 10krát nižší než v médiu optimálního složení (č. 47). Je prav-



děpodobné, že stopy Cu se nacházely i v minimálním médiu, neboť nebyly provedeny žádné speciální úpravy k absolutnímu odstranění sledovaných prvků. Přítomnost Mn v malém množství stimuluje růst kvasinek [10] a podobně jako Zn ovlivňuje Mn akumulaci bílkovin v buňkách [9]. Naopak podle výsledků jiných autorů nemá Mn na růst kvasinek žádný vliv [5]. Zde je třeba zmínit se také o příznivém účinku B, jehož přítomnost v médiu obsahujícím dále přídavek K, Na, Ca, Mg, Fe a Zn, umožnila dosažení  $ZV_2$  16,2 %. Avšak vedle tohoto příznivého vlivu byl zjištěn antagonistický účinek mezi B a Cu, proto nebyl B dále přidáván. Podle literatury B buď nemá na výtěžnost kvasinek žádný vliv [5], nebo působí negativně a snižuje dále obsah dusíku, resp. proteinů v kvasničných buňkách [9].

Zbývající prvky, které podporují maximální zvýšení výtěžnosti biomasy z etanolu, Ca, Na a Mg, se řadí mezi biogenní prvky. Přesto, že Mg je stálou součástí minimálního média [25 mg Mg/l], jeho přídavek 3,5 mg se projevil příznivě. Mg je obecný enzymový aktivátor [11], aktivuje např. glutaminsyntetázu krmných kvasinek *Candida tropicalis* [12]; ve vztahu k utilizaci etanolu má nesporný význam, jelikož je kofaktorem důležitých enzymů, acetylCoA-syntetázy a izocitritázy [13, 14]. O významu Ca pro kvasinky se vyskytují protichůdné údaje. Příznivý vliv na růst byl stanoven u *Saccharomyces pastorianus* [8], *Sacch. cerevisiae* [15] a *Sacch. carlsbergensis* [16]. Na druhé straně bylo zjištěno, že nemá žádný vliv na výtěžnost kvasinek [5], je netoxický [17] nebo lehce inhibuje [18, 19]. Pro kvasinky *Candida utilis* rostoucí z etanolu se přídavek vápníku projevuje příznivě, neboť snižuje tvorbu kyseliny octové [20]; kyselina octová se tvoří jako vedlejší nežádoucí metabolit při asimilaci etanolu [21]. Úloha Na při tvorbě kvasničné biomasy není zcela jasná. Podobně jako jiné jednomocné ionty (K, Rb,  $NH_4$  a Cs) stimuluje Na aktivitu fosfatáz, ale působí jinak než např. K; pro rozmnožování kvasinek má být draslík v přebytku proti Na [22]. Při využití etanolu pro růst kvasinek *Candida utilis* bylo v některých případech rovněž pozorováno snížení tvorby kyseliny octové v přítomnosti Na [3].

Provedenými pokusy byly určeny prvky, které se podílejí na stimulačním účinku popela výpalků při tvorbě biomasy kvasinek *Candida utilis* z etanolu, přičemž bylo zjištěno, že účinek vybraných prvků (znázorněný výtěžností 68,7 % v médiu č. 47) byl vyšší než vliv všech prvků stanovených v popelu výpalků (výtěžnost 62,4 % v modelovém médiu). Podobně stimulace růstu směsí prvků modelující médium s přídavkem popela byla větší než účinek přídavku samotného popela výpalků (výtěžnost 55,6 %, tabulka 3). Rozdíl mezi výtěžností dosaženou v médiu s přídavkem popela výpalků a v modelovém médiu může být způsoben jednak tím, že koncentrace některých prvků (Ca, Na, Mg, Al, B a Pb) v modelovém médiu není totožná s koncentrací těchto prvků dodávaných do média ve formě popela a jednak popelem mohou být do média vnášeny ještě další prvky, které nebyly zjištěny použitými analytickými metodami. Podstatné však je, že zastoupení prvků v modelovém médiu je pro růst kvasinek z etanolu vhodnější a že se podařilo další úpravou, resp. vyložením některých prvků z modelového média, dospět k optimálnímu složení, které poskytlo vysokou výtěžnost v daných kultivačních podmínkách.

Poznatky o vlivu prvků na růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu, získané v minimálním živném médiu s kvasničným kmenem podrobeným vyhladovění vzhledem ke sledovaným prvkům, jsou zvláště cenné pro perspektivní výrobu krmného droždí postupem kontinuální kultivace s recirkulací odseparovaného média. Za

těchto podmínek se prvky postupně vyčerpávají, pokud nejsou součástí živných solí a jejich nedostatek může být jednou z příčin zhoršení parametrů kultivace. Podle získaných znalostí o vlivu prvků bude možno předejít jejich nedostatku vhodnou úpravou živění s přihlédnutím k dalším zjištěným skutečnostem, především k uvolňování některých prvků do živného média korozí fermentačního zařízení a také k obsahu některých prvků ve formě doprovodných nečistot technických živných solí a pomocných látek.

## Literatura

- [1] MOSTECKÝ, J., ŠTROS, F., AUNICKÝ, Z., ADÁMEK, L., KRUMP-HANZL V., RUT, M., HRUBAN A.: Způsob výroby kvasničných bílkovin z etanolu AO 169 587, 1975
- [2] RYBÁŘOVÁ, J., ADÁMEK, L., PECKA K.: Kvas. prům. 24, 1978, s. 108
- [3] ADÁMEK, L.: nepublikováno.
- [4] ELVEHJEM, C. A., HART, E. B.: J. Biol. Chem. 90, 1931, s. 37
- [5] OLSON, B. H., JOHNSON, M. J.: J. Bacter., 57, 1949, s. 235.
- [6] FENCLE, Z., ZALABÁK, V., BENEŠ, J.: Folia Microbiol., 19, 1974, s. 489.
- [7] VALLEE, B. L., HOCH, F. L.: J. Inst. Brew., 61, 1955, s. 271.
- [8] LOMANDER, L.: Physiol. Plant., 18, 1965, s. 153.
- [9] PEČIULIS, J., AUGUSTAIENĖ, E., PAKARSKYTĖ, K., VALAVICIUS, J.: Ant. Leew., 35, suppl. Yeast Symposium G. 13, 1989.
- [10] MCHARGUE, J. S., CALFEE, R. K.: Pl. Physiol., Lancaster, 6, 1931, s. 559.
- [11] ROSE, A. H., HARRISON, J. S., The Yeasts, Vol. 2, London, 1971.
- [12] SEREBRENNIKOV, V. M., AUERMAN T. L.: Mikrobiologija, 43, 1974, s. 613.
- [13] ABBOTT, B. J., LASKIN, A. I., MCCOY C. J.: Appl. Microbiol., 25, 1973, s. 787.
- [14] MOR, J. R., FIECHTER, A.: Biotechnol. Bioeng., X, 1968, s. 159.
- [15] CARAFOLI, E., BALCAVAGE, W. X., LEHNINGER, A. L., MATTOON, J. R.: Biochim. Biophys. Acta, 205, 1970, s. 18.
- [16] LOTAN, R., BERDICEVSKY, I., MERZBACH, D., GROSSOWICZ, N.: J. Gen. Microbiol., 92, 1976, s. 76.
- [17] WHITE, J., MUNNS, D. J.: J. Inst. Brew., 57, 1951, s. 175.
- [18] ATKIN, L., GRAY, P. P.: Archs. Biochem., 15, 1947, s. 305.
- [19] THORNE, R. S. W.: J. Inst. Brew., 60, 1954, s. 227
- [20] RYBÁŘOVÁ, J.: nepublikováno
- [21] ADÁMEK, L., ŠTROS, F., RUT, M.: Kv. prům., 22, 1976, s. 153.
- [22] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky, SVTL, Bratislava, 1957.

**Rybářová J., Štros F., Pecka K.: Kultivace kvasinek *Candida utilis* na etanolovém substrátu II. Vliv některých biogenních a stopových prvků na růst při kultivaci ve třepacích baňkách.** Kvas. prům. 24, 1978, č. 9, s. 202—207.

Růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu je stimulován přídavkem popela melasových lihovarských výpalků. V popelu výpalků byly stanoveny metodou semikvantitativní emisní spektrometrie a AAS prvky K, Na, Ca, Mg, Al, Fe, B, Pb, Zn, Mn, Mo, Cu a Co. Kultivačními pokusy v minimálním živném médiu s vyhladovělou kvasničnou kulturou byly vytypovány prvky, které se podílejí na stimulačním účinku popela výpalků. Ze stopových prvků se uplatňují hlavně Fe a Zn, z biogenních prvků je nutná přítomnost Na a především Ca; přídavek Mg se projevuje hlavně za současné přítomnosti Cu a Mn. Provedenými pokusy byl podpořen předpoklad, že příznivý účinek popela výpalků na růst kvasinek *Candida utilis* z etanolu závisí v dodání, popřípadě zvýšení prvků, které jsou pro daný proces potřebné. Výsledky o vlivu prvků, získané v daných kultivačních podmínkách, bude možno použít při optimalizaci živného prostředí pro kontinuální způsob výroby krmného droždí s recirkulací odseparovaného média.

**Рыбаржова, Ё. — Штрос, Ф. — Пецка, К.: Культивация дрожжей *Candida utilis* в этаноловой среде. 2-ая часть. Влияние некоторых биогенных и рассеянных элементов на размножение дрожжей, разводимых во встряхиваемых колбах.** Квас. прум. 24, 1978, № 9, стр. 202—207.

Размножение дрожжей *Candida utilis*, культивирован-



ных в этаноловой среде, можно стимулировать путем добавки в среду пепеля паточной барды. Полуколичественный метод анализа с помощью эмиссионной спектрофотометрии и дальнейшее изучение состава пепеля с ААС показали, что в нем находятся следующие элементы: калий, натрий, кальций, магний, алюминий, железо, бор, свинец, цинк, марганец, молибден, медь и кобальт. Стимулирующее влияние отдельных элементов определялось экспериментально посредством разведения голодающих дрожжей в среде с минимальными питательными свойствами. Наиболее эффективно действуют железо и цинк, относящиеся к группе рассеянных элементов. Из биогенных элементов необходимым является присутствие натрия, а в особенности кальция. Влияние магния обнаруживается главным образом при условии присутствия меди и марганца. Из результатов изучения видно, что добавка пепеля барды дает дрожжам *Candida utilis*, разводимым в этаноловой среде, элементы необходимые для процесса их размножения или увеличивает содержание таких элементов в питательной среде. Выведенные заключения могут быть использованы для оптимизации состава питательной среды на заводах, изготавливающих кормовые дрожжи в установках непрерывного действия с рециркуляцией питательной среды.

**Rybářová J., Štros F., Pecka K.: Cultivating *Candida utilis* Yeast in Ethanol Substrate. Part II. Effects of some Biogenic and Trace Elements on the Propagation Rate of Yeast Cultivated in Shaking Bottles.** Kvas. prům. 24, 1978, No. 9, pp. 202—207.

The growth of the *Candida utilis* yeast cultivated in ethanol substrate can be stimulated by ash of molasses distillation residue. By applying semiquantitative emission spectrophotometry and AAS the following elements K, Na, Ca, Mg, Al, Fe, B, Pb, Zn, Mn, Mo, Cu and Co in the ash were determined.

In series of experiments carried out in minimal nutritive medium with starved yeast culture were selected elements with stimulating effect. Of trace elements the most effective are Fe and Zn and from the

group of biogenic elements Na and especially Ca are very important; Mg is efficient mainly if Cu and Mn are present. It can be assumed, that beneficial effect of ash on *Candida utilis* yeast cultivated in ethanol substrate consist in supplying or increasing of elements with stimulating effect.

The results of the research works can be utilized to optimize the composition of culture medium in plants producing fodder yeast in continuously operating installations with recirculation of separated medium.

**Rybářová J., Štros F., Pecka K.: Kultivation der Hefen *Candida utilis* auf Äthanolsubstrat. II. Einfluß einiger biogener und Spurenelemente auf das Wachstum bei der Kultivation in Shüttelkolben.** Kvas. prům. 24, 1978, No. 9, S. 202—207.

Das Wachstum der Hefen *Candida utilis* aus Äthanol wird durch die Zugabe der Asche aus der Brenner-Melasseschlempe stimuliert. In der Asche der Schlempe wurden mittels der Methode der semiquantitativen Emissionsspektrometrie und AAS die Elemente K, Na, Ca, Mg, Al, Fe, B, Pb, Zn, Mn, Mo, Cu und Co festgestellt. In Kultivationsversuchen im Minimal-Nährmedium mit ausgehungerten Hefekultur wurden die Elemente ermittelt, die sich an dem Stimulationseffekt der Schlempeasche beteiligen. Unter den Spurenelementen beteiligen sich hauptsächlich Fe und Zn, aus den biogenen Elementen ist die Anwesenheit von Na und vor allem Ca erforderlich; die Mg-Zugabe zeigte sich als wirksam, wenn zugleich auch Cu und Mn anwesend war. Die Versuchsergebnisse bestätigen die Voraussetzung, daß die positive Wirkung der Schlempeasche auf das Wachstum der Hefen *Candida utilis* aus Äthanol in der Anlieferung, bzw. Erhöhung des Gehaltes der für den gegebenen Prozeß erforderlichen Elemente besteht. Die Erkenntnisse über den Einfluß der Elemente, die in den gegebenen Kultivationsbedingungen der Versuche gesammelt wurden, sind für die Optimalisierung des Nährmilieus bei der kontinuierlichen Futterhefeproduktion mit Rezirkulation des abseparierten Mediums anwendbar.