

# ***Speciální fermentační procesy***

## **Stimulace růstu kvasinek amoniakálním extraktem získaným z vyrobené biomasy**

### **II. Cirkulace některých součástí kvasničné buňky při aerobní syntéze biomasy z etanolu**

Ing. MILOSLAV RUT, Ing. FRANTIŠEK ŠTROS CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu, odbor mikrobiálních výrob, Praha

#### **1. ÚVOD**

Tento článek navazuje na předcházející práci uveřejněnou v tomto časopise [1]. Při výzkumu výroby kvasničné biomasy se sníženým obsahem nukleových kyselin jsme za optimální řešení považovali snížení obsahu nukleových kyselin amoniakální extrakcí vyrobených kvasinek [2]. V prvních etapách výzkumu jsme při extrakci používali také etanol, jehož aplikace měla určitý význam ve snížení ztrát bílkovin [3]. Obě suroviny pro opracování kvasinek jsou současně základními surovinami při výrobě krmných etanolových kvasnic, a proto bylo nasnadě použít tyto látky v základní výrobě i po jejich využití při potravinářském opracování výrobku. Ekonomickými aspekty takovéto výroby jsme se zabývali v minulé práci [1]. Ukázalo se, že pro dosažení dobré potravinářské kvality výrobku je bezpodmínečně nutné dokonale odstranit zbytky amoniaku a štěpů nukleových kyselin. K tomu je třeba výrobek několikrát prát, přičemž by i prací voda musela obsahovat etanol, aby použití etanolu při amoniakální extrakci neztratilo svoje

oprávnění. Při dokonalém praní výrobku však narůstalo množství potřebného etanolu až nad hranici jeho zpracovatelnosti při kultivaci. Z tohoto důvodu jsme se i za cenu určitých ztrát rozhodli vyloučit etanol z procesu opracování kvasinek, takže se do místa biosyntézy vrací jen amoniakální extrakt z kvasničné hmoty předcházejících generací.

V tomto postupu odpadá možnost ztrát etanolu, na druhé straně však cirkulují v procesu i další látky, které se za přítomnosti etanolu z kvasinek neextrahovaly. V tomto článku se zabýváme využitím amoniakálního extraktu při biosyntéze kvasničné hmoty ze syntetického etanolu.

Amoniakální extrakt je odpad při potravinářském opracování kvasinek, při kterém se získají kvasinky s nízkým obsahem nukleových kyselin (méně než 2 % nukleových kyselin v sušině) a vysokým obsahem čistých bílkovin (více než 50 % čistých bílkovin v sušině). Amoniakální extrakt obsahuje 2–4 % amoniaku, 0,8–1,2 % štěpů nukleových kyselin, 0,5–0,6 % popela a dal-

ší rozpustné, blíže neurčené součásti kvasničné biomasy (1,2–1,5 % sušiny). Tento extrakt by jistě mohl být surovinou pro výrobu řady cenných látek, ale náš výzkum se doposud zaměřil pouze na využití tohoto odpadu jako zdroje uhlíku, dusíku a minerálních látek při biosyntéze kvasničné hmoty ze syntetického etanolu. S tímto výhledem byl zaměřen i způsob odstranění nukleových kyselin [3], tak, aby se krmné i potravinářské kvasinky vyráběly na jednom místě a základní kvasničná hmota byla společná pro oba výrobky.

Při využití etanol-amoniakálního extraktu bylo prokázáno, že působí příznivě na biosyntézu hmoty z etanolu [1]. Výtěžnost se zvyšovala o 6–25 % a produktivita kvasného prostoru až o 35 %. Tyto jevy nelze přičítat jen tomu, že se do procesu biosyntézy zavádí další zdroj uhlíku, dusíku a minerálních látek, ale také tomu, že některé z těchto látek stimulují biosyntézu. Lze předpokládat, že v tomto uspořádání výroby, kdy se do místa biosyntézy vrací všechny látky, které v amoniakálním prostředí procházejí buněčnou stěnou, cirkuluje v systému určitá část nezbytných biologicky účinných látek (nebo jejich fragmentů) a do výrobku přechází jen většina bílkovin a dalších látek, které buněčná blána zadržuje.

## 2. MATERIÁLY A METODIKA

Obtíže při volbě laboratorní metodiky pro řešení problémů kultivace, při které se do procesu vrací extrakt výrobku, jsme diskutovali v minulé práci [1]. Tentokrát jsme metodiku pokusů zjednodušili tím, že jsme sledovali změny výtěžnosti a rychlosti jednorázových nebo kontinuálních kultivací s jednotným, pro všechny pokusy společným amoniakálním extraktem. Při kultivačních pokusech se měnil poměr mezi amoniakem potřebným jako zdroj dusíku při biosyntéze a jeho náhradou — amoniakálním extraktem.

### 2.1 Příprava standardního amoniakálního extraktu

12 kg kvasničné pasty získané při výrobě krmných etanolových kvasinek (kultura RIFIS č. 235) v Seliko n. p. Kojetín (23 % sušiny, 7 % nukleových kyselin a 8,6 % celkového dusíku v sušině) se rozmíchá s 3,5 kg vody, získaná suspenze se vyhřeje na 90 °C a míchá se 30 min (termolýza), zchladí na 70 °C, přidají se 3,3 litry amoniakové vody (24 %  $\text{NH}_3$ ) a míchá se 30 min (extrakce). Poté se zchladí a odstředí. Získá se 20,0 kg amoniakálního extraktu s 2,54 % hm. organické sušiny, 0,52 % popela, 2,2 % celkového dusíku a 1,7 % amoniakálního dusíku. Z 1 kg kvasničné sušiny se získalo 7,25 kg amoniakálního extraktu.

### 2.2 Zařízení a způsob jednorázových kultivací

Všechny kultivační pokusy byly realizovány na kultivačním zařízení VD ČSAV LF 2 s regulací teploty, pH, pěny, otáček a rozpuštěného kyslíku. Při všech pokusech byl přestup kyslíku fermentoru 150 mmol  $\text{O}_2/\text{l} \cdot \text{h}$  (stanoveno bilanční metodou z analýzy plynů), plnění tanku 2,3 litry, 1400 ot/min a 1,2 objemu vzduchu na objem fermentoru za min. Kultivace byla vedena při 35 °C a pH 3,9–4,1.

Živné soli byly přidávány jednorázově na počátku ve formě roztoku v množství na předpokládaný nárůst 44 g kvasničné sušiny. Na přírůstek 1 g kvasničné sušiny se přidává 1 ml roztoku (35 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 25 g KOH, 32 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na 1 litr) a 0,1 ml roztoku Fe (10,6 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  v 1 l) a 0,1 ml roztoku Ca (232 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  v 1 l). Pro udržení správné koncentrace amoniakálního dusíku v médiu se na počátku přidají 2 g síranu amonného.

Inokulace se prováděla 25 g pasty kmene RIFIS 235 (5,75 g kvasničné sušiny). Etanol se přidával ve formě surového syntetického lihu podle koncentrace etanolu

v plynech odcházejících z fermentoru. Tato koncentrace se měří a reguluje na hodnotě 0,1–0,2 % obj. v médiu regulátorem METREX (VD VŠCHT) na principu katalytického spalování [4]. pH se reguluje amoniakovou vodou (2,4 %  $\text{NH}_3$ ) při kontrole a při pokusech s amoniakálním extraktem se zprvu pH reguluje amoniakálním extraktem a po vyčerpání pokusného množství se kultivace dokončí s amoniakovou vodou až do spotřebování 50,8 g a. a. Odpěňování bylo zajištěno přidáním 0,5 ml odpěňovacího oleje (Kontramin 210) do 100 ml surového syntetického lihu.

Vyprodukované množství biomasy se hodnotí z hmotnosti účinného objemu tanku na konci kultivace a koncentrace kvasničné sušiny (vážkové stanovení kvasničné sušiny zachycené na skleněné fritě  $\text{S}_4$  a sušené 4 hodiny při 105 °C). Po odečtení sušiny vnesené inokulem (5,75 g) se výsledek vztáhne na 50,8 g a. a. spotřebovaného při kultivaci. Rychlost kultivace se měří podle produktivity fermentačního zařízení za celou dobu kultivace. Za dobu kultivace se považuje čas od prvního přidání etanolu do jeho vyčerpání v médiu (indikuje vstoup koncentrace rozpuštěného kyslíku). Jako pomocných kritérií průběhu kultivace se používalo měření koncentrace kyslíku a kysličníku uhlíkatého v kultivačních plynech [5] a měření koncentrace rozpuštěného kyslíku. Analýza kultivačních plynů sloužila k výpočtu spotřebovaného množství kyslíku, RQ a ověření hospodárnosti kultivace (vztah výtěžnost — spotřeba kyslíku — RQ) [6]. Průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku sloužil k orientaci a výpočtu podílu kultivace při limitu kyslíku vzhledem k celkovému času kultivace.

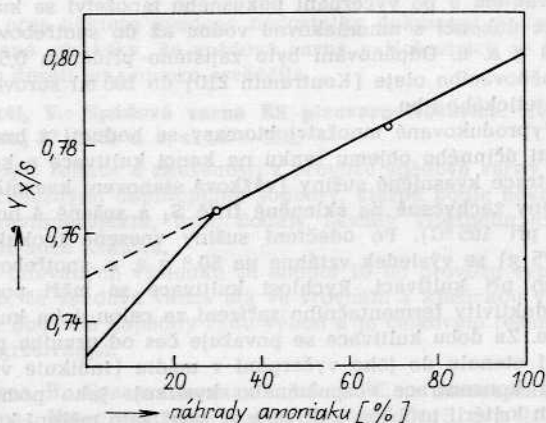
### 2.3 Zařízení a způsob kontinuálních kultivací

Pro kontinuální kultivace bylo použito stejného zařízení jako pro kultivace jednorázové a také přestup kyslíku, teplota, pH a koncentrace etanolu byly udržovány stejné. Kontinuální kultivace byla prováděna metodou maximální dosažitelné zředovací rychlosti [7]. Této rychlosti růstu se dosáhne regulací průtoku, resp. zředovací rychlosti podle koncentrace rozpuštěného kyslíku. Za regulační úroveň byla zvolena koncentrace kyslíku odpovídající 4 % nasycení. Pokud byla koncentrace kyslíku nad touto hranicí, protékal fermentorem jen objem média daný spotřebovaným roztokem etanolu (1 díl syntetického surového lihu a 4 díly vody), amoniaku (2,22 g  $\text{NH}_3$  na 100 ml) nebo amoniakálního extraktu a roztoku solí (základní roztok zředěný 10krát). Toto množství odpovídá zředovací rychlosti 0,25  $\text{h}^{-1}$ . Tato zředovací rychlost je značně nižší než specifická růstová rychlost, a proto koncentrace biomasy v médiu stoupá a tím klesá koncentrace rozpuštěného kyslíku. Jakmile klesne pod zvolenou regulační hodnotu, otevře se ventil přídatného průtoku vody a zředovací rychlost stoupne tak, že specifická růstová rychlost je menší a kvasinky jsou vyplavovány. Tím stoupá koncentrace rozpuštěného kyslíku a jakmile stoupne nad zvolenou hodnotu, ventil přídatného průtoku vody se uzavře. Tímto postupem lze mikrobiální populaci udržovat při maximální dosažitelné specifické růstové rychlosti určené jen zvolenou hodnotou koncentrace rozpuštěného kyslíku, složením média, pH a teplotou. Mění-li se složení média, reaguje mikrobiální populace (při zachování konstantního pH, teploty a rozpuštěného kyslíku) změnou specifické růstové rychlosti a ustálí se na maximálně dosažitelné rychlosti (resp. zředovací rychlosti) charakteristické pro dané kultivační parametry.

Vyrobené množství biomasy se počítalo z objemu natéklé kvasničné suspenze a koncentrace kvasničné sušiny. Toto množství se korigovalo o akumulaci ve fermentoru. Vyrobená kvasničná sušina se přepočítala na množství využitého etanolu. Všechna ostatní měření byla stejná jako při jednorázových kultivacích.

## 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

V tabulce 1 jsou uvedeny výsledky jednorázových kultivací, při nichž byl postupně nahrazován amoniak amoniakálním extraktem. Bylo zpracováno vždy stejné množství zdroje uhlíku [50,8 g a. a.).



Obr. 1. Vztah mezi stupněm náhrady amoniakové vody amoniakálním extraktem a výtěžností při jednorázových kultivacích

Tabulka 1. Výsledky jednorázových kultivací

Spotřeba zdroje dusíku			amoniaková voda (ml)	Vyrobeno kvasničné sušiny (g)	Výtěžnostní koeficient $Y_{X/S}$	Produktivita g/l . h
ml	% náhrady	g organické sušiny				
0	0	0	228	36,8	0,725	2,91
63	30	1,6	138	38,9	0,765	3,00
144	69	3,7	63	39,8	0,784	2,96
208	100	5,3	0	40,9	0,806	3,05

Z tabulky 1 a obrázku 1 je patrna závislost zvyšování výtěžnosti při stoupající náhradě amoniaku extraktem. Závislost lze rozdělit na dva intervaly, a to na část nelineární (do 30% náhrady) a lineární (30–100% náhrady). Z porovnání průběhu obou částí křivky a strmosti jejich tečen je možné usuzovat na to, že do 30% náhrady se uplatňuje kumulativní jev stoupajícího stimulačního efektu extraktu a efektu zvýšení výtěžnosti přidáváním dalšího zdroje uhlíku, zatímco v druhé části stoupá výtěžnost jen dalším přidáváním dodatkového zdroje uhlíku.

Lineární část druhé části křivky protíná osu výtěžnosti při  $Y_{X/S} = 0,75$ , což reprezentuje výtěžnost při nulovém přidávku dodatkového zdroje uhlíku a tedy výtěžnost při čisté stimulaci. Složky amoniakálního extraktu stimulují růst kvasinek tak, že se výtěžnost zvyšuje o 3,4 %. Mimo zvýšení výtěžnosti stimulací lze posoudit i s jakou výtěžností se produkuje kvasničná sušina z dodatkového zdroje uhlíku. Ze zvýšení výtěžnostního koeficientu z 0,75 na 0,806 po přidání 5,3 g organické sušiny extraktu lze vypočítat, že výtěžnostní koeficient kvasničné biomasy z organické sušiny extraktu je  $Y_{X/S} = 0,53$ .

Je zajímavé, že při zvyšování náhrady amoniaku extraktem, kdy byl nepochybně prokázán příznivý vliv na výtěžnost, nebylo pozorováno prokazatelné a zvýšené výtěžnosti úměrné zlepšení dynamiky biosyntézy (produk-

tivita kultivačního zařízení). Bylo to způsobeno pomalejší asimilací dodatkového zdroje uhlíku, které se projevovalo ve zpždění konce jednorázové kultivace po vyčerpání etanolu.

Tabulka 2. Výsledky kontinuálních kultivací

Měřený údaj	Zdroj dusíku	
	amoniak	amoniakální extrakt
Sledované období kontinuální kultivace (h)	18,2	18,3
Produkce kvasničné sušiny (g)	141,1	174,5
Spotřebované množství amoniakálního dusíku z amoniakové vody nebo amoniakálního extraktu (g N na 100 g kvasničné sušiny)	9,5	7,8
Spotřebované množství etanolu za sledované období (g a. a.)	207,1	217,9
Spotřebované množství organické sušiny extraktu (g)	—	20,4
Zředovací rychlost ( $h^{-1}$ )	0,398	0,415
Respirační kvocient RQ	0,46	0,39
Produktivita (g suš./l . h)	3,38	4,16
Výtěžnostní koeficient na etanol $Y_{X/S}$	0,681	0,801

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky kontinuálních kultivací, při kterých byl posuzován vliv úplné náhrady amoniaku amoniakálním extraktem. Do výsledků bylo zahrnuto jen období po ustavení ustáleného stavu (18 hodin po zahájení kontinuální kultivace).

Porovnáme-li výsledky s jednorázovou kultivací s plnou náhradou amoniaku extraktem, je zřejmé, že se kontinuální kultivací zvýraznily rozdíly mezi kultivací s amoniakem a extraktem. Hodnota výtěžnosti dosažitelná s extraktem je prakticky stejná jako při jednorázové kultivaci, ale hodnoty získané při kultivaci s amoniakem se liší podstatně. Tento jev byl pozorován i při jiných kultivacích a je způsoben tím, že kontinuální kultivace je citlivější na nedostatek stopových prvků a stimulatorů než kultivace jednorázová. Také ostatní parametry pro posouzení průběhu biosyntézy (produktivita, zředovací, resp. specifická růstová rychlost a RQ) se podstatně zlepšily a tak výsledky kontinuálních kultivací potvrdily příznivý vliv amoniakálního extraktu na průběh biosyntézy.

Stimulační efekt amoniakálního extraktu je u kontinuální kultivace výraznější, tak jak tento způsob kultivace reaguje citlivěji na stimulatory. Odečteme-li od produkce kvasničné sušiny s extraktem vliv dodatkového zdroje uhlíku (bez stimulace) s výtěžností  $Y_{X/S} = 0,53$  ( $20,4 \cdot 0,53 = 10,8$  g), získáme výtěžnostní koeficient pro etanol bez dodatkového zdroje uhlíku  $Y_{X/S} = 0,75$ , což je údaj totožný s údajem získaným při jednorázových kultivacích. Stimulační efekt je však značně vyšší + 10,3 %.

Souhrně lze konstatovat, že se organická sušina amoniakálního extraktu na tvorbu biomasy využívá (po započtení stimulačního vlivu) se stejnou, nebo spíše lepší výtěžností než při tvorbě biomasy z etanolu, takže je výhodné kombinovat výrobu krmných etanolových kvasnic s jejich potravinářským opracováním. Navíc se získá výrobek kvalitnější s vyšší užitnou hodnotou.

## Literatura

- [1] RUT, M., ŠTROS, F.: Kvasný průmysl 26, 1980, č. 3. s. 57
- [2] RUT, M., ŠTROS, F., HLADEČEK, P.: Kvasný průmysl 24, 1978, č. 3. s. 58
- [3] RUT, M., ŠTROS, F., ADÁMEK, L.: AO. 188575, 1976



- [4] KADLEC, K., LABÍK, V.: Kvasný průmysl 19, 1973, č. 11, s. 247  
[5] RUT, M., MADRON, F.: Kvasný průmysl 22, 1976, č. 4, s. 84  
[6] RUT, M., MADRON, F., ŠTROS, F.: Kvasný průmysl 22, 1976, č. 12, s. 272  
[7] RUT, M., ŠTROS, F., ADÁMEK, L., ŠVOJGR, M., EDERER, K.: AO. 181337, 1980

**Rut, M. - Štros, F.: Stimulace růstu kvasinek amoniakálním extraktem získaným z vyrobené biomasy II. Cirkulace některých součástí kvasničné buňky při aerobní syntéze biomasy z etanolu** Kvas. prům. 27, 1981, č. 5, s. 110—113.

Při snižování obsahu nukleových kyselin v kvasinkách získaných při kultivaci na syntetickém etanolu odpadá amoniakální extrakt, který obsahuje velmi účinné látky s příznivým vlivem na syntézu biomasy. Některé látky stimulují růst, jiné slouží jako zdroj uhlíku a dusíku. Při jednorázových kultivacích bylo zjištěno, že stimulaci se zvyšuje výtěžnost biosyntézy z etanolu o 3,4 % a při kontinuálních kultivacích dokonce o 10,3 %. Při komplexním zhodnocení výtěžnosti celého procesu výroby kvasinek se sníženým obsahem nukleových kyselin bylo zjištěno, že hmotové ztráty výrobku při opracování se plně nahrazují zvýšenou výtěžností při syntéze biomasy.

**Рут, М., Штрос, Ф.: Стимуляция размножения дрожжей аммиачным экстрактом, полученным из произведенной биомассы.** Квас. прум. 27, 1981, № 5, стр. 110—113.

В ходе сепарации нуклеиновых кислот из дрожжевой биомассы, полученной из синтетического этанола, отходит аммиачный экстракт. Этот экстракт содержит активные вещества, имеющие благоприятное влияние на биосинтез дрожжевой массы. При периодических культивациях было обнаружено, что стимуляция повышает выход биосинтеза из этанола о 3,4 %, в то время как при непрерывных культивациях даже о 10,3 %.

При комплексной оценке выхода всего процесса производства дрожжей с пониженным содержанием нуклеиновых кислот было установлено, что потери массы продукта при обработке вполне заменяются повышенным выходом биосинтеза.

**Rut, M. - Štros, F.: Stimulation of yeast growth by ammoniacal extract derived from produced biomass. Part II. Circulation of Some Components of Yeast Cell During Aerobic Synthesis of Biologic Mass from Ethanol.** Kvas. prům. 27, 1981, č. 5, s. 110—113.

The by product in the process of separation of nucleic acids from yeast biomass produced on synthetic ethanol is ammoniacal extract. This solution contains very active compounds having favourable effects upon the biosynthesis of yeasts. Some of them stimulate growth, others are important sources of carbon and nitrogen. Stimulation during batch cultivation is manifested in the 3,4 % increase of yield coefficient, while in continuous cultivation the increase is up to 10,3 %. After evaluation of the process when biomass with decrease content of nucleic acids is produced, it is evident, that weight losses of product caused by extraction are fully compensated by increased biosynthesis yield.

**Rut, M. - Štros, F. Stimulation des Hefewachstums durch den aus der hergestellten Biomasse gewonnenen Ammoniakalextrakt. II. Zirkulation einiger Bestandteile der Hefezelle bei der aeroben Synthese der Biomasse aus Äthanol.** Kvas. prům. 27, 1981, No. 5, S. 110—113.

Bei der Verminderung des Nukleinsäuregehalts in den bei der Kultivation auf synthetischen Äthanol gewonnenen Hefen fällt der Ammoniakalextrakt ab, der wichtige Wirkstoffe mit einem positiven Einfluß auf die Synthese der Biomasse enthält. Einige Substanzen stimulieren das Wachstum, andere dienen als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Bei einschlägigen Kultivationen wurde festgestellt, daß sich durch die erwähnte Stimulation die Ausbeute der Biomasse aus Äthanol um 3,4 % und bei kontinuierlichen Kultivationen sogar um 10,3 % erhöht. Bei der komplexen Auswertung der Ausbeute des Gesamtprozesses der Hefeproduktion mit vermindertem Nukleinsäuregehalt wurde festgestellt, daß die Gewichtsverluste des Produkts im Laufe der Bearbeitung vollkommen kompensiert werden durch die erhöhte Ausbeute bei der Synthese der Biomasse.