

# Nové termotolerantní kmeny kvasinek rostoucích na etanolu

Dr. LUBOMÍR ADÁMEK, Ing. MILADA ŠESTÁKOVÁ, CSc., Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, CSc., Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha

582.282.232  
579.8.095.15

Původní výběr kvasničných kmenů vhodných pro výrobu krmné toruly ze surového syntetického lihu (etanolu) byl do nedávné doby velmi omezen. Některé kmeny nemohly být použity z důvodů hygienických, protože nevyhovovaly normě pro krmné kvasnice, řada dalších kmenů měla jiné nevýhody (pomalý růst, malá výtěžnost, specifické nároky na živiny apod.), které bránily jejich zavedení jako provozní kmen [1]. K dispozici byl prakticky jeden kvasničný kmen *Candida utilis* 49, který byl s úspěchem vyzkoušen v praxi a jeho použití bylo později zakotveno v technologickém výrobním postupu pro výrobu krmných kvasnic v závodě Seliko Kojetín.

Postupem času si praxe vyžádala vyhledání nových kmenů, s lepšími růstovými parametry a vyšší výtěžností, při zachování požadavku malé náročnosti na živné médium. Ze směsi kvasničných kultur používaných v československých torulárnách bylo proto vyizolováno několik kmenů, s nimiž podle předběžných výsledků může být do budoucnosti počítáno jako s potenciálními producenty krmných kvasnic. Dobré produkční vlastnosti vykazovaly zvláště dva kvasinkové kmeny *Candida utilis* 231 a *Torulopsis ethanolitolerans* 235. Oba kmeny se vyznačují příznivou rychlostí růstu a rostou dobře i na čistě syntetickém živném médiu, bez přídavku speciálních stimulač-

Tabulka 1. Vliv kultivační teploty na některé ekonomické parametry kultivace u dvou kmenů kvasinek rostoucích na minerálním médiu s etanolem

Kmen	Kultivační teplota [°C]	Výtěžnostní koeficient (z kvas. suš. izol. pasty)	Výtěžnostní koeficient (vážkově z média)	Výtěžnostní koeficient (průměr)	Doba kultivace [h]	$\mu$	% N v kvas. sušině	% NK v kvas. sušině
Candida utilis 231	30	0,701	0,709	0,705	4,5	0,41	9,41	10,62
	35	0,701	0,701	0,701	4,5	0,41	9,22	9,22
	37	0,663	0,687	0,675	5,5	0,33	8,50	8,28
	39	0,578	0,623	0,602	6,5	0,32	8,04	7,07
Torulopsis ethanolitolerans 235	30	0,773	0,762	0,768	4,75	0,37	8,83	10,47
	35	0,766	0,755	0,758	4,5	0,40	9,04	9,24
	37	0,730	0,718	0,724	4,5	0,40	9,12	8,89
	39	0,696	0,706	0,701	5,25	0,35	8,44	8,14

ních látek, tedy na médiu, které bylo dosud používáno při výrobě krmných kvasnic ze syntetického etanolu.

Růstové možnosti těchto perspektivních produkčních kmenů jsou dosud málo prozkoumány, a proto jsme se snažili zjistit jejich produkční parametry při ztížených provozních podmínkách, kdy význačným limitujícím faktorem růstu je často zvýšená kultivační teplota. Dosaďovací provozní technologický postup výroby předepisoval pro výrobu krmné toruly z etanolu rozmezí kultivačních teplot 30 až 33 °C, ale zvláště v letních měsících tento požadavek nemohl být splněn pro nedostatečnou kapacitu chladičového zařízení. Při déletrvajícím přehřívání kvasničných kultur byl růst kultur brzděn a snižovala se jejich výtěžnost.

Situaci by značně zlepšilo zavedení do praxe termotolerantního kmene, který by dobře rostl s požadovanou výtěžností i při těchto zvýšených teplotách. Do jaké míry jsou kmeny *Candida utilis* 231 a *Torulopsis ethanolitolerans* 235 termotolerantní a jaký vliv má zvýšená teplota kultivace na jejich produkční parametry, bylo cílem předložené práce.

#### Mikroorganismus

Hodnocení bylo provedeno u dvou kmenů kvasinek *Candida utilis* RIFIS 231 a *Torulopsis ethanolitolerans* RIFIS 235, vedených ve sbírce mikroorganismů VÚKPS (RIFIS), Praha a v Československé sbírce kvasinek (CCY) v Chemickém ústavu SAV, Bratislava. Jako inokulum sloužila kvasničná pasta, získaná odstředěním narostlé kvasničné kultury na odstředivce Westfalia LWA 205. Pasta obsahovala 21 až 22 % sušiny a uchovávala se nejdéle 1 týden při 5 °C.

#### Fermentor a kultivační postup

Kultivace se prováděly ve skleněném laboratorním fermentoru s celkovým obsahem 30 litrů a užitečném plnění 15 l. Fermentor je opatřen samonasávacím míchadlem typu Waldhof a cirkulačním válcem. Během kultivací se teplota automaticky udržovala na požadované hodnotě regulačním teploměrem, pH se upravovalo rovněž automaticky regulačním pH metrem přidáváním lihočpavkové směsi, jež obsahovala: 450 ml surového syntetického etanolu (90 % objem.), 135 ml amoniakové vody (24 %) a 2 ml odpěňovače Kontraminu.

Kultivační médium bylo připravováno ze základního živného roztoku I (300 ml) a roztoku II (30 ml).

Základní živný roztok I obsahoval v 1 litru:

35 ml  $H_3PO_4$  (85 %)  
30 g KOH

32 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$   
0,5 g  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$   
12,2 g NaCl  
0,02 g  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$   
0,05 g  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ .

Roztok II obsahoval v 1 litru:

156,00 g  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$   
10,56 g  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ .

Na každý litr připravovaného živného média se do fermentoru přidával 1 g síranu amonného.

Po naplnění fermentoru vodovodní vodou a doplnění živnými roztoky I, II a 15 g síranu amonného bylo do média vneseno 200 g kvasničné pasty a objem byl doplněn na 15 litrů. Kultivace byla zahájena dávkováním 20 ml z předlohy surového syntetického etanolu, což odpovídalo zhruba 0,1% koncentraci etanolu v médiu.

Koncentrace etanolu v surovém syntetickém etanolu se stanovovala pyknometricky. Použitý etanol obsahoval 74,4 g absolutního etanolu ve 100 ml vzorku.

Během kultivace se každou hodinu stanovoval nárůst sušiny a zjišťovalo se množství spotřebovaného substrátu.

Kvasničná sušina se stanovovala vážením biomasy po filtraci 5 až 10 ml vzorku média na fritě  $S_4$  a sušení při 105 °C po dobu 2 hodin.

Po skončení kultivace byla biomasa vytvořená ve fermentoru odseparována a izolovaná kvasničná pasta byla analyzována na obsah dusíkatých látek [2] a nukleových kyselin [3]. Hmotnost izolované pasty (biomasy) sloužila jako jedno z kritérií hodnocení produkčních možností kmenů.

Kultivační pokusy s oběma kmeny kvasinek byly prováděny ve standardních kultivačních podmínkách (stejně kultivační zařízení, živné médium i stejné základní suroviny). V rámci jedné série bylo použito též stejného inokula.

#### Výsledky

Kultivační pokusy jednoznačně potvrdily, že za optimálních podmínek mohou tyto kmeny hromadit velká množství biomasy s obsahem dusíkatých látek vyšším než 55 % a že jedním z faktorů podmiňujících dobrý výsledek je příznivá kultivační teplota. Výsledky kultivačního testu u *Torulopsis ethanolitolerans* byly lepší a po překročení optimální teploty nebylo zhoršení sledovaných parametrů tak drastické, jako u kultury *Candida utilis* (tabulka).

V optimálních podmínkách u obou kmenů bylo dosahováno exponenciální růstové rychlosti  $\mu = 0,40$  až

0,41, za nepříznivých podmínek klesala růstová rychlost až na  $\mu = 0,32$  až  $0,35$ . U kmene *Candida utilis* 231 se maximální růstová rychlost udržovala až do teploty kultivace  $35^\circ\text{C}$ , potom se rychlost růstu značně snížila.

Ovlivnění růstu kultivační teplotou u *Torulopsis ethanolitolerans* bylo poněkud odlišné. Nižší růstová rychlost byla změřena při základní nejnižší teplotě  $30^\circ\text{C}$  ( $\mu = 0,37$ ), při vyšších kultivačních teplotách ( $35$  a  $37^\circ\text{C}$ ) byla rychlost maximální a teprve při kultivační teplotě  $39^\circ\text{C}$  rychlost růstu opět klesla, a to na  $\mu = 0,35$ . Kmen *Torulopsis* je tedy termotolerantnější než kmen *Candida*.

Zvýšená kultivační teplota se odrazila i v obsahu dusíkatých látek a nukleových kyselin. Nejvíce dusíkatých látek bylo zjištěno u kmene *Candida utilis* při kultivačních teplotách  $30$  a  $35^\circ\text{C}$  a to  $58,8\%$  a  $57,6\%$  sušiny biomasy. U *Torulopsis ethanolitolerans* za stejných kultivačních podmínek byl jejich obsah v sušině biomasy  $55,2$  a  $56,5\%$ . Při vyšších kultivačních teplotách se množství dusíkatých látek snižovalo a při  $39^\circ\text{C}$  kleslo na  $52,6\%$  u *Torulopsis*, a u *Candida* až na  $50,3\%$  sušiny biomasy. Nukleových kyselin bylo  $7,1$  až  $10,6\%$  v sušině, přičemž u *Candida utilis* byla jejich tvorba ovlivňována teplotou výrazněji. Množství dusíkatých látek i NK v biomase kvasinek bylo tedy v souladu se změřenými růstovými rychlostmi za různých kultivačních teplot.

Se zvyšující se kultivační teplotou se měnily i výtěžnostní koeficienty: byly přibližně stejné při  $30$  a  $35^\circ\text{C}$ , s dalším zvyšováním teploty klesaly. Relativně vyšší výtěžnostní koeficienty byly u kultury *Torulopsis ethanolitolerans* než u kmene *Candida utilis* za stejných kultivačních podmínek.

Kultivační zkoušky prokázaly, že oba zkoušené kmeny kvasinek mají velmi dobré parametry, jež jsou základem pro zavedení nového kmene do provozu. U obou kmenů teplota do  $35^\circ\text{C}$  prakticky neovlivňuje rychlost růstu, množství nahromaděných dusíkatých látek v biomase ani výtěžnostní koeficient. Z hlediska ekonomiky kultivačního procesu se v tomto ohledu jeví výhodnější kmen *Torulopsis* [4], který poskytoval velmi dobré výsledky i při kultivační teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Při dosažené  $72,5\%$  výtěžnosti jeho biomasa obsahovala  $57\%$  dusíkatých látek v sušině.

#### Literatura

- [1] BARTA, J., BERAN, K., BROŽA, A., FENCÍ, Z., GRÉGR, V., HAUSER, K., HOSPODKA, J., MÁLEK, I., RACH, P.: Kontinuální výroba krmných kvasnic, SNTL, Praha 1962.
- [2] SYHOVÁ, V., ŠTROS, F.: Kvas. prům., 2, 1955, s. 202.
- [3] RUT, M.: Kvas. prům., 19, 1973, s. 131.
- [4] RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Z. Allg. Mikrobiol., (v tisku).

**Adámek, L. - Šestáková, M. - Rybářová, J. - Štros, F.: Nové termotolerantní kmeny kvasinek rostoucích na etanolu.** Kvas. prům., 27, 1981, č. 12, s. 278—280.

U dvou provozních kmenů kvasinek *Torulopsis ethanolitolerans* (RIFIS 235) a *Candida utilis* (RIFIS 231), producentů krmných bílkovin ze syntetického etanolu, byl zjišťován vliv kultivačních teplot v rozmezí  $30$  až  $39^\circ\text{C}$  na růstové parametry, obsah dusíkatých látek a nukleových kyselin v biomase a na výtěžnostní koeficienty. V rozmezí použitých kultivačních teplot kmen *Torulopsis* akumuloval biomasu s  $70,1$  až  $76,8\%$  výtěžností, kmen

*Candida utilis* s  $60,2$  až  $70,5\%$  výtěžností. Růstová rychlost u *Candida utilis* klesala až při kultivační teplotě vyšší než  $35^\circ\text{C}$ , u kmene *Torulopsis* až při teplotě vyšší než  $37^\circ\text{C}$ . Za optimálních podmínek obsahovala nahromaděná biomasa u obou kmenů více než  $55\%$  dusíkatých látek.

**Ада́мек, Л., Шеста́кова, М., Рыба́рзова, Я., Штрос, Ф.: Новые термотолерантные штаммы дрожжей растущие на этаноле.** Квас. прум., 27, 1981, № 12, стр. 278—280.

У двух масштабных штаммов дрожжей *Torulopsis ethanolitolerans* (RIFIS 235) и *Candida utilis* (RIFIS 231), продуцентов кормовых белков из синтетического этанола, было исследовано влияние температуры культиваций в пределе  $30$ — $39^\circ\text{C}$  на параметры роста, количество азотных веществ и нуклеовых кислот в биомассе и на экономические коэффициенты культиваций. В пределе использованных температур культиваций нагромождал штамм *Torulopsis*  $70,1$ — $76,8\%$  биомассы и *Candida utilis*  $60,2$ — $70,5\%$ . Специфическая скорость роста *Candida utilis* понижалась при температуре высшей чем  $35^\circ\text{C}$  а у штамма *Torulopsis* только при температуре высшей  $37^\circ\text{C}$ . В оптимальных условиях биомасса содержала у обеих штаммов больше чем  $55\%$  азотных веществ.

**Adámek, L., Šestáková, M., Rybářová, J., Štros, F.: New Thermotolerant Yeast Strains Growing on Ethanol.** Kvas. prům., 27, 1981, No. 12, pp. 278—280.

The effect of cultivation temperature in the range from  $30$  to  $39^\circ\text{C}$  on growth rates, contents of nitrogen and nucleic acids in biomass and yield coefficient was studied in two pilot-plant strains of yeasts *Torulopsis ethanolitolerans* (RIFIS 235) and *Candida utilis* (RIFIS 231), producers of fodder proteins from synthetic ethanol. In the temperature range used the strain *Torulopsis* accumulated biomass at  $70.1$  to  $76.8\%$  substrate utilization and *Candida utilis* at  $60.2$  to  $70.5\%$  utilization. Growth rate of *Candida utilis* decreased at cultivation temperature higher than  $35^\circ\text{C}$ , while that of the strain *Torulopsis* even at more  $37^\circ\text{C}$ . At optimal growing conditions the accumulated dry matter of both strains contained more than  $55\%$  nitrogen compounds.

**Adámek, L., Šestáková, M., Rybářová, J., Štros, F.: Neue Thermotolerante Hefestämme wachsende auf Ethanol.** Kvas. prům., 27, 1981, č. 12, s. 278—280.

Der Einfluß von Kultivatortemperaturen von  $30$  bis  $39^\circ\text{C}$  auf die Wachstumsparameter, die Gehalte von Stickstoffsubstanzen und Nukleinsäuren und die Produktionskoeffizienten wurde in zwei Hefeproduktionsstämmen *Candida utilis* (RIFIS 231) und *Torulopsis ethanolitolerans* (RIFIS 235), Produzenten von Futterhefeeiweiß aus synthetischen Ethanol, studiert. Im Rahmen der benützten Kultivatortemperaturen der Stamm *Torulopsis ethanolitolerans* akkumulierte die Biomasse unter  $70,1$  bis  $76,8\%$  Ethanolbenützung und *Candida utilis* unter  $60,2$  bis  $70,5\%$  Ethanolbenützung. Die Wachstums-Geschwindigkeit erniedrigte sich bei *Candida utilis* bei Temperaturen höheren als  $35^\circ\text{C}$ , bei *Torulopsis* bei Temperaturen höheren als  $37^\circ\text{C}$ . Unter optimalen Kultivationsbedingungen war der Gehalt von Stickstoffsubstanzen in der Trockenmasse von beiden Stämmen höher als  $55\%$ .