

# Speciální fermentační procesy

## Problematika produkce kvasničné biomasy ve vícestupňovém kultivačním systému

663.132 663.14.03

Ing. JAN PÁČA, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

### Úvod

Produkce biomasy na bázi nižších alkoholů byla předmětem více studií [1–4]. Vzhledem k těkavosti těchto substrátů byly výhody vícestupňových věžových fermentorů prokázány na základě porovnání s jednostupňovými systémy [5–10]. Dosud však chybí informace o charakteru růstu kvasinek ve vícestupňovém systému bez mezistupňového promíchávání.

Cílem této práce bylo zjistit vliv koncentrace etanolu v přítoku živného média na růst a fyziologickou aktivitu buněk *Candida utilis* v kaskádě fermentorů.

### Materiály a metody

Při experimentech bylo použito kvasinky *Candida utilis* č. 136 ze sbírky mikroorganismů Katedry kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT v Praze.

Složení kultivačního média a příprava inokula byly popsány v předchozí práci [9]. Kultivace byly prováděny v kaskádě 3 fermentorů v sériovém zapojení. Každý fermentor byl geometricky podobný jednomu stupni věžového vícestupňového fermentoru [11].

Kultivace probíhaly za těchto podmínek: zředovací rychlost vztahovaná na jeden stupeň  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , pH 4,5, teplota  $30^\circ\text{C}$  a rychlostech přenosu kyslíku uvedených dříve [9]. Měření byla prováděna v ustálených stavech kontinuálních kultivací v jednohodinových intervalech. Výsledky v obrázcích jsou průměrnými hodnotami šesti stanovení.

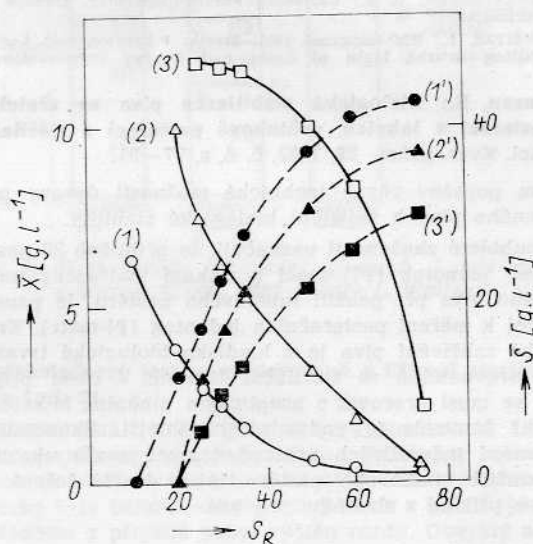
Koncentrace sušiny biomasy byla stanovena gravimetricky [9]. Etanol a acetal byly stanoveny metodou plynové chromatografie [12]. Obsah buněčného proteinu byl určen podle Lowryho et al. [13]. Fyziologická aktivita byla hodnocena na základě spotřeby  $\text{O}_2$  a tvorby  $\text{CO}_2$  postupem popsaným dříve [9], stejně jako výpočty výtěžnosti.

### Výsledky

#### Růstové charakteristiky

Obrázek 1 ukazuje vliv  $S_R$  na změny koncentrace biomasy a etanolu v jednotlivých stupních kaskády. Při  $S_R = 20 \text{ g.l}^{-1}$ , kdy etanol byl zcela spotřebován již v 1. nebo ve 2. stupni, koncentrace  $X$  v dalších stupních zůstala nezměněna. Maximální hodnoty  $X$  se dosáhlo ve 3. stupni při  $S_R = 25\text{--}35 \text{ g.l}^{-1}$ , což souvisí s kritickou koncentrací etanolu, zjištěnou Omatou et al. [14]. Při překročení  $S_R = 35 \text{ g.l}^{-1}$  nastal zjevný pokles biomasy ve 3. stupni. Tento fakt dokazuje, že jakmile koncentrace  $S_R$  překročí hodnotu, při níž již buňky nejsou schopny využít veškerý etanol v daném stupni, koncentrace  $X$  v tomto stupni klesá. Tento jev byl pozorován ve všech stupních kaskády, nejméně se projevil ve 3. stupni. Lze proto říci, že přebytek etanolu působí substrátovou inhibicí růstové rychlosti buněk [14–20]. Nejmenší efekt inhibice etanolem, pozorovaný ve 3. stupni, je zřejmě výsledkem adaptace buněk na etanol. Vy-

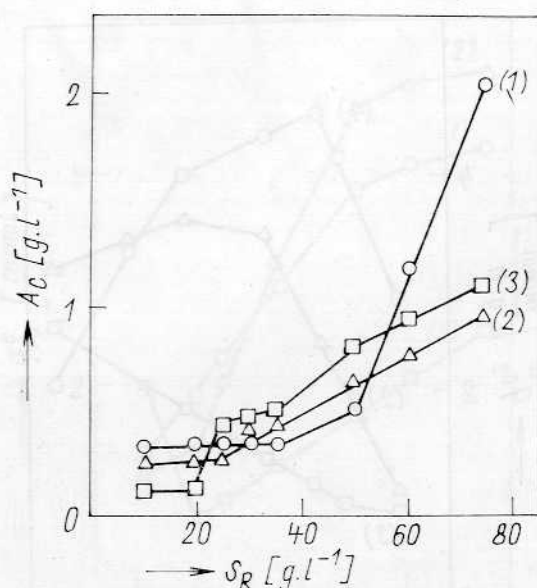
plývá to i z většího rozdílu hodnot  $X_3 - X_2$  ve srovnání s  $X_2 - X_1$ . Jak ukázalo několik autorů [21–26], má významný vliv ve vícestupňovém kultivačním systému i fyziologický stav buněčné populace, který závisí na růstových podmínkách v každém předchozím stupni.



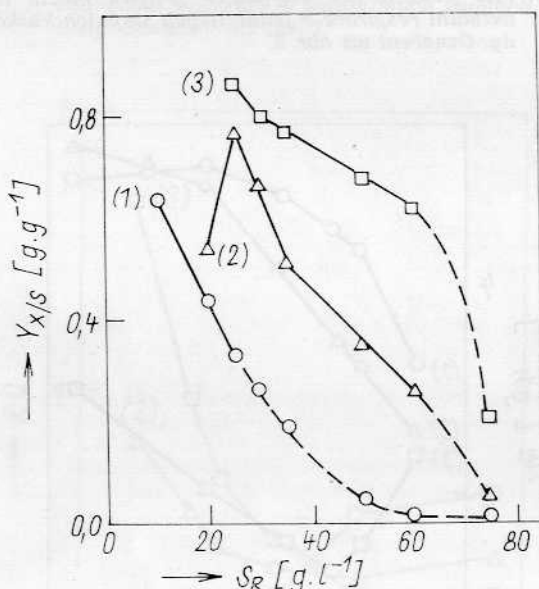
Obr. 1. Vliv koncentrace etanolu v přítoku média na koncentraci biomasy (1, 2, 3) a etanolu (1', 2', 3') v jednotlivých stupních kaskády. (1) ... 1. stupeň, (2) ... 2. stupeň, (3) ... 3. stupeň.

Změny koncentrace kyseliny octové v závislosti na  $S_R$  v jednotlivých stupních kaskády jsou uvedeny na obr. 2. Za podmínek, kdy veškerý etanol z média byl buňkami spotřebován ( $S_R \leq 20 \text{ g.l}^{-1}$ ), byla maximální koncentrace acetalu zjištěna v 1. stupni. V rozsahu  $S_R$ , kdy bylo maximální koncentrace  $X$  dosaženo ve 3. stupni, byla v tomto stupni nalezena i maximální koncentrace acetalu. Tento poznatek lze vysvětlit tím, že buňky nejsou schopny totálně disimilovat etanol ani v přebytku kyslíku. Zajímavé chování bylo zjištěno při překročení kritické koncentrace etanolu v médiu ( $S = 32 \text{ g.l}^{-1}$ ). Za těchto podmínek vzrůstala koncentrace acetalu s růstem  $S_R$  ve všech stupních kaskády. Zvláště výrazný byl vzrůst v 1. stupni. Ve 2. stupni při  $S_R = 50 \text{ g.l}^{-1}$  byla aktuální koncentrace etanolu vyšší než kritická a přesto buňky oxidovaly acetal vytvářený v 1. stupni na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{CO}_2$  velmi intenzivně (obr. 1). Ve 3. stupni, kde  $S$  byla již pod kritickou hodnotou, byla oxidace acetalu potlačena a koncentrace acetalu v médiu opět vzrůstala oxidací etanolu.

Na obr. 3 jsou uvedeny změny výtěžnosti biomasy vztahované na etanol v jednotlivých stupních kaskády. Důsledkem vzrůstu  $S_R$  byl výrazný pokles  $Y_{X/S}$ , který se projevil podstatně dříve, než bylo dosaženo inhibice růstu



Obr. 2. Vliv koncentrace etanolu v přítoku média na koncentraci acetátu v médiu v jednotlivých stupních kaskády. (1) ... 1. stupeň, (2) ... 2. stupeň, (3) ... 3. stupeň.



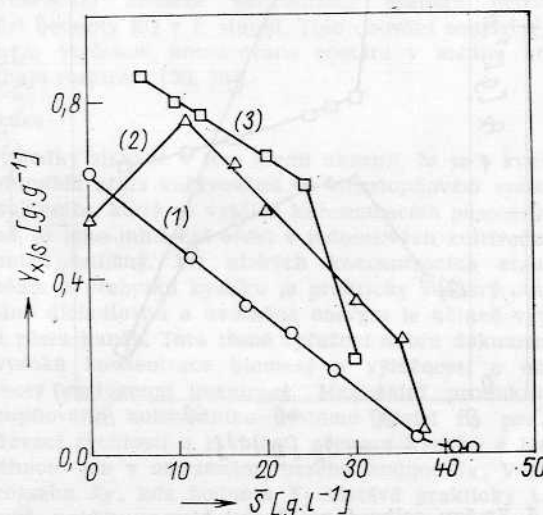
Obr. 3. Vliv koncentrace etanolu v přítoku média na výťažnost biomasy v jednotlivých stupních kaskády. Označení viz obr. 2.

etanolem. Tento fakt byl nejvýraznější v 1. stupni. Vyšší výtěžky spolu s menším sklonem křivek ve 2. a 3. stupni potvrzují uvedený efekt adaptace buněk na etanol. Nízká hodnota  $(Y_{X/S})_2$  při  $S_R = 20 \text{ g.l}^{-1}$  ukazuje, že za těchto podmínek rychlosti přenosu kyslíku a zředovací rychlosti je systém schopen zpracovat vyšší koncentrace  $S_R$ . Je to zřejmé i z hodnoty  $X_2$  v obr. 1.

Čárkované průběhy v obr. 3 odpovídají podmínkám inhibice růstu vysokou aktuální koncentrací etanolu. Z jednotlivých průběhů  $(Y_{X/S})_i$  je zřejmé, že stav vyplavení nastává ve všech stupních při stejné hodnotě  $S_R$ , což je v souladu s teoretickým chováním kaskády ideálně míchaných tanků v sériovém zapojení.

Pro lepší ilustraci inhibičního účinku etanolu v jednotlivých stupních kaskády a efektu adaptace buněk na etanol jsou výtěžnosti  $(Y_{X/S})_i$  vyneseny v závislosti na

$S$  (obr. 4). V 1. stupni je průběh lineární až do  $S \leq 37 \text{ g.l}^{-1}$ . Odchylka od lineárního průběhu při  $S \geq 37 \text{ g.l}^{-1}$  vyplývá zřejmě z „aparátového efektu“ [27]. Také ve 2. a 3. stupni byl v určitém rozsahu  $S$  zjištěn lineární pokles výtěžnosti, za kterým následoval náhlý pokles. Čím vyšší stupeň v kaskádě, tím kratší byl lineární úsek průběhu výtěžnosti. Z toho plyne, že efekt adaptace buněk na etanol nezávisí pouze na době zdržení buněk v systému (doba expozice), nýbrž také na aktuální koncentraci etanolu a metabolických produktů v médiu.



Obr. 4. Vliv koncentrace etanolu v médiu na výťažnost biomasy v jednotlivých stupních kaskády. Označení viz obr. 2.

Na obr. 5 jsou uvedeny průběhy výtěžnosti biomasy a produktivity vztažené na celý kultivační systém a dále změny obsahu buněčného proteinu ve 3. stupni kaskády. Při  $S_R$  do  $25 \text{ g.l}^{-1}$  byly výtěžnosti biomasy nad  $0,6 \text{ g.g}^{-1}$  a současně obsah proteinu dosahoval nejvyšších hodnot. Na základě rychlosti disimilace etanolu (obr. 1), produkce acetátu (obr. 2) a  $(Y_{X/S})_w$  lze říci, že vysoký obsah proteinu je za těchto podmínek výsledkem vyšší totální disimilace etanolu na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{CO}_2$ . Buňky mají dostatek energie pro syntézu proteinu. Pokles  $(Y_{X/S})_w$  při  $S_R \geq 25 \text{ g.l}^{-1}$  je následkem počátku inhibičního účinku aktuální koncentrace etanolu. S tím souvisí i náhlý pokles v obsahu proteinu a výrazný vzrůst koncentrace acetátu (obr. 2).

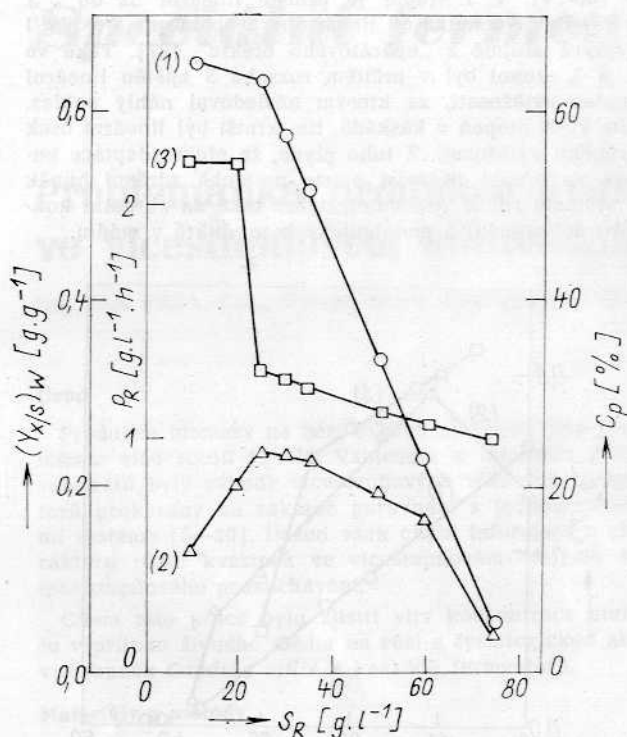
S růstem  $S_R$  rostla produktivita, pokud aktuální koncentrace etanolu nepřekročila kritickou hodnotu. Při překročení kritické koncentrace etanolu již pouze v 1. stupni produktivita poklesla. Simultánní pokles produktivity a výtěžnosti s růstem  $S_R$  zjistil již Mian et al. [28].

Optimální hodnota  $S_R$  pro použité podmínky přenosu kyslíku a zředovací rychlosti v kaskádě 3 fermentorů byla kolem  $25 \text{ g.l}^{-1}$ .

#### Změny fyziologické aktivity buněk

Obrázek 6 ukazuje změny aktuálních respiračních rychlostí ( $q_{\text{O}_2}$ ). V oblasti subinhibičních koncentrací etanolu vzrůstala hodnota  $q_{\text{O}_2}$  s růstem  $S_R$ . V 1. a 2. stupni byl vzrůst lineární.

Nízké hodnoty  $q_{\text{O}_2}$  ve 2. a 3. stupni při  $S_R = 10 \text{ g.l}^{-1}$  jsou důsledkem limitace etanolem (nedostatek etanolu). Zlom v lineárním průběhu závislosti  $(q_{\text{O}_2})_{1,2} = f(S_R)$  se projevil při  $S \sim 22 \text{ g.l}^{-1}$ . Výsledkem překročení kritické koncentrace etanolu v médiu byla

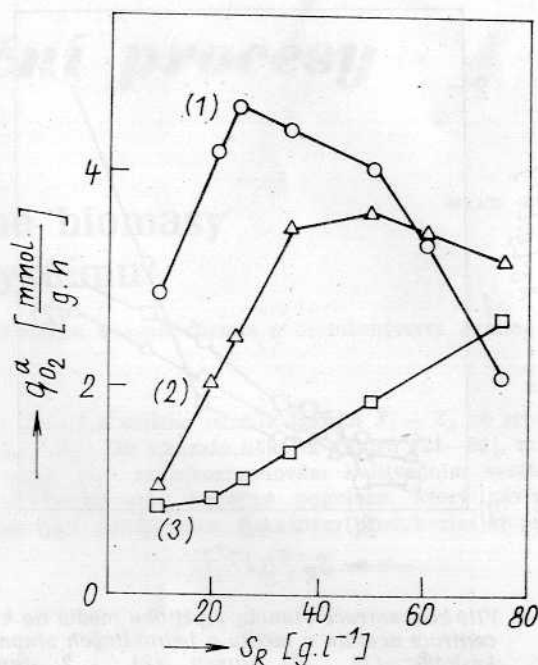


Obr. 5. Změny celkové výťažnosti biomasy (1), produktivity (2) a obsahu buněčných bílkovin (3) v závislosti na koncentraci etanolu v přítoku média.

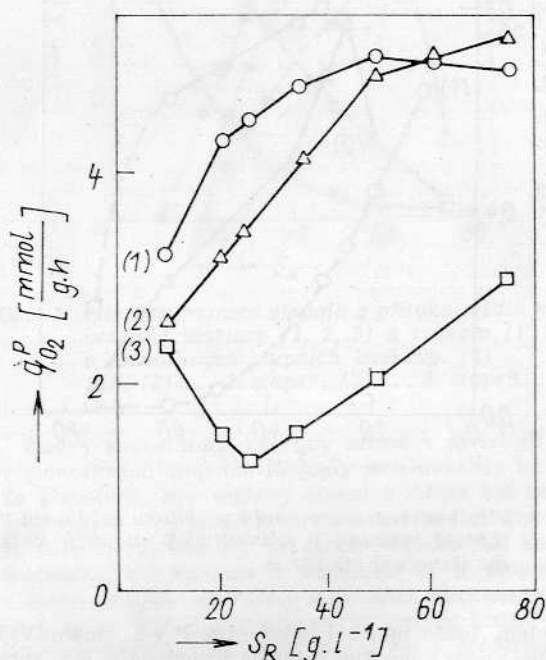
represe buněčné respirace, pouze však v 1. stupni. Naopak ve 2. stupni další vzrůst  $S_R$  neměl prakticky na  $q^{aO_2}$  žádný vliv. Z poklesu  $q^{aO_2}$  a současného vzrůstu koncentrace acetátu v médiu při překročení kritické koncentrace etanolu vyplývá, že etanol inhibuje následnou disimilaci acetátu v TCA a glyoxalátovém cyklu. Podobné chování bylo zjištěno i ve 2. stupni, avšak ve značně menší míře. Menší vliv  $S$  na  $q^{aO_2}$  ve 2. a 3. stupni zřejmě plyne z adaptačního efektu buněk na etanol vzhledem k větší době zdržení. Menší sklon lineární části závislosti  $q^{aO_2} = f(S_R)$  ve vyšších stupních kaskády při subkritické koncentraci etanolu souvisí s poklesem koncentrace rozpustěného kyslíku v médiu [29–32]. Represe respirační rychlosti, ke které dochází se vzrůstem  $S$ , odpovídá údajům uvedeným v literatuře [33–35].

Na obr. 7 jsou uvedeny průběhy potenciálních respirací v závislosti na  $S_R$ . Porovnání hodnot  $q^{pO_2}$  a  $q^{aO_2}$  ukazuje, že hodnoty  $q^{pO_2}$  jsou větší ve vyšších stupních kaskády. Je to zřejmě následkem eliminace metabolických produktů a intermediátů, zvláště acetátu [36–38] v rozsahu subinhibičních koncentrací etanolu. Při nadkritických koncentracích etanolu jde o skutečnost, že respirace se měřila při nižších koncentracích etanolu. Zlom lineární části průběhu  $[q^{pO_2}]_1 = f(S_R)$  byl dosažen při stejné hodnotě  $S_R$  jako v případě  $q^{aO_2}$ . Na rozdíl od 1. stupně byla lineární část průběhu  $q^{pO_2}$  delší a zasahovala až do nadkritických koncentrací etanolu. Tohoto zjištění potvrzuje význam adaptačního efektu buněk na vyšší koncentrace etanolu. Vyšší hodnoty  $[q^{pO_2}]_3$  při  $S_R < 20 g.l^{-1}$  jsou důsledkem limitace etanolem (srovnej s obr. 1). Důkazem limitace etanolem je vzrůst endogenní respirace (obr. 8).

Průběhy endogenních respirací v závislosti na  $S_R$  jsou uvedeny na obr. 8. Výsledky ukazují, že vzrůst  $S_R$  př-



Obr. 6. Vliv koncentrace etanolu v přítoku média na aktuální respiraci v jednotlivých stupních kaskády. Označení viz obr. 2.

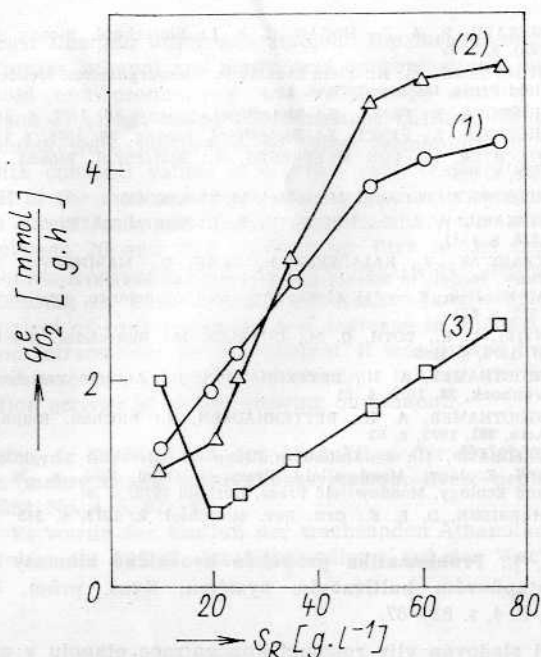


Obr. 7. Vliv koncentrace etanolu v přítoku média na potenciální respiraci v jednotlivých stupních kaskády. Označení viz obr. 2.

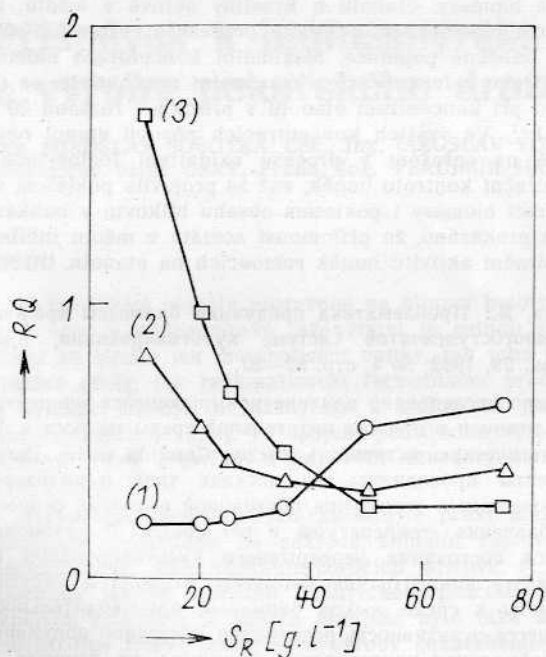
sobí změny endogenního metabolismu. Ve všech stupních kaskády s růstem  $S_R$  vzrůstá  $q^{eO_2}$ . Porovnání obr. 8 s obr. 1 ukazuje, že s poklesem růstové rychlosti buněk v důsledku růstu  $S_R$  hodnoty  $q^{eO_2}$  trvale vzrůstají. Za podmínek inhibičních koncentrací etanolu (nad  $30 g.l^{-1}$ ) byly hodnoty endogenní respirace vyšší než respirace aktuální.

Hodnoty respiračního kvocientu byly vypočteny





Obr. 8. Vliv koncentrace etanolu v přítoku média na endogenní respiraci v jednotlivých stupních kaskády. Označení viz obr. 2.



Obr. 9. Změny respiračního kvocientu v jednotlivých stupních kaskády v závislosti na koncentraci etanolu v přítoku média. Označení viz obr. 2.

z aktuální respirace a tvorby  $CO_2$  a jsou uvedeny na obr. 9. Je známo, že hodnota  $RQ$  charakterizuje fyziologický stav a metabolickou aktivitu buněk [39, 40]. Za podmínek limitace růstu etanolem se hodnota  $RQ$  pohybovala okolo 0,2, což nasvědčuje, že etanol byl disimilován procesem aerobní respirace a energie uvolněná v katabolismu byla účinně využívána k růstu (těsné spřažení). Potvrzují to vysoké výtěžnosti biomasy. Nízká hodnota  $RQ$  je důsledkem malé tvorby  $CO_2$  (viz obr. 6). Toto zjištění je v soulasu s výsledky Rickardové a Ho-

gana [41], kteří prokázali, že za těchto podmínek je v případě kvasinky *Candida utilis* etanol disimilován jak TCA cyklem, tak i glyoxalátovým cyklem. Vysoké hodnoty  $RQ$  pozorované ve 2. a 3. stupni, kde  $S_{2,3} = 0$ , vyplývají z utilizace rezervních látek. Podobné výsledky zjistili v jednorázových kultivacích Krajovan *et al.* [42].

S růstem  $S_R$  v oblasti subinhibičních koncentrací etanolu hodnoty  $RQ$  ve 2. a 3. stupni výrazně poklesly. Tento pokles souvisí s růstem  $q^{O_2}$ , jak předpokládali již Nyiri *et al.* [43].

Překročení kritické koncentrace etanolu vyvolalo vzrůst hodnoty  $RQ$  v 1. stupni. Toto chování souvisí s výrazným vzrůstem koncentrace acetátu v médiu, který inhibuje respiraci [36, 38].

#### Diskuse

Výsledky získané v této studii ukazují, že je-li kvasinka *Candida utilis* kultivována ve víceetapovém systému na substrátu, který ve vyšších koncentracích působí inhibičně, je jeho inhibiční efekt v jednotlivých kultivačních stupních odlišný. Při nízkých koncentracích etanolu v médiu a přebytku kyslíku je prakticky veškerý etanol totálně disimilován a uvolněná energie je účinně využita k růstu buněk. Toto těsné spřažení dobře dokumentují vysoké koncentrace biomasy a výtěžnosti a nízké hodnoty endogenní respirace. Maximální produktivita tříetapového kultivačního systému závisí na použité zředovací rychlosti a rychlosti přenosu kyslíku a lze ji dosáhnout jen v omezeném rozsahu hodnot  $S_R$ . V tomto rozsahu  $S_R$ , kde hodnota  $X_3$  zůstává prakticky konstantní, potvrzuje vzrůst koncentrace acetátu hypotézu Stouthamera a Bettenhausena [44–45], že sekrece acetátu je zřejmě mechanismem, umožňujícím dosažení vyšší specifické růstové rychlosti na úkor výtěžnosti biomasy. Vzrůst koncentrace acetátu v médiu ukazuje, že větší množství etanolu podléhá pouze parciální oxidaci i za podmínek přebytku kyslíku. Lze proto říci, že s růstem  $S_R$  zůstávají nezměněny aktivity alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy. Potvrzuje to pokles hodnoty  $q^{O_2}$ . Naopak, klesá-li množství etanolu, které je totálně oxidováno, klesá také množství energie uvolněné v katabolismu. Toto tvrzení potvrzuje pokles  $[Y_{X/S}]_1$ ,  $X_i$  a  $C_p$ . Ze srovnání hodnot  $q^{O_2}$  a  $q^{CO_2}$  vyplývá, že přítomnost acetátu v médiu reprimuje respiraci buněk.

Při překročení kritické koncentrace etanolu nastává výrazná inhibice růstu i ve 3. stupni. Nízká hodnota  $[Y_{X/S}]_1$  a náhlý pokles  $[Y_{X/S}]_{2,3}$  spolu s výrazným růstem  $Ac_1$  potvrdily platnost hypotézy o poklesu výtěžnosti na mol spotřebovaného ATP [36, 46]. Nižší výtěžnost vztažená na mol ATP plyne z postupného odpřažení růstu od katabolismu a pravděpodobně i ze zvýšení spotřeby energie na účely „maintenance“. Toto tvrzení vyplývá ze srovnání  $q^{O_2}$  a  $q^{CO_2}$ . Skutečnost, že hodnoty  $q^{CO_2}$  přesáhly hodnoty  $q^{O_2}$  tuto hypotézu potvrzuje. Kromě toho rostoucí hodnoty  $q^{CO_2}$  ukazují, že vyšší koncentrace etanolu ovlivňují schopnost respirační kontroly buněk.

Se zřetelem na inhibici růstu buněk při vyšších koncentracích etanolu v médiu lze říci, že adaptace buněk může eliminovat do jisté míry inhibiční efekt etanolu. Vyplývá to i z průběhu hodnot  $q^{O_2}$ . Vyšší hodnoty  $q^{O_2}$ , zjištěné po přidavku etanolu k adaptovaným buňkám, dovolují předpokládat přítomnost více aktivních míst enzymů [19, 47]. Proto proces adaptace buněk zřejmě souvisí s derepresí a indukcí syntézy enzymů [35].

#### Použité symboly

$Ac$  — koncentrace kyseliny octové v médiu v ustáleném stavu [g.l<sup>-1</sup>],

$C_p$	— obsah bílkovin v buňkách vztažený na hmotnost sušiny buněk (%),
$P_R$	— produktivita procesu ( $\text{g.l}^{-1}\text{.h}^{-1}$ ),
$q^{aO_2}$	— aktuální respirace ( $\text{mmol.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$ ),
$q^{vO_2}$	— potenciální respirace ( $\text{mmol.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$ ),
$q^{eO_2}$	— endogenní respirace ( $\text{mmol.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$ ),
$S$	— koncentrace etanolu v médiu v ustáleném stavu ( $\text{g.l}^{-1}$ ),
$S_R$	— koncentrace etanolu v přítoku živného média ( $\text{g.l}^{-1}$ ),
$X$	— koncentrace sušiny buněk v ustáleném stavu ( $\text{g.l}^{-1}$ ),
$Y_{X/S}$	— výtěžnost biomasy vztažená na spotřebovaný etanol ( $\text{g.g}^{-1}$ ),
$\{Y_{X/S}\}_w$	— celková výtěžnost biomasy vztažená na spotřebovaný etanol ( $\text{g.g}^{-1}$ ),
index $i$	— číslo stupně.

## Literatura

- [1] AKIBA, T., UYEYAMA, H., YAMAUCHI, Y., SEKI, M., FUKIMBARA, T.: J. Ferment. Assoc. Jpn. **27**, 1969, s. 91
- [2] AKIBA, T., UYEYAMA, H., SEKI, M., FUKIMBARA, T.: J. Ferment. Technol., **48**, 1970, s. 323
- [3] OMATA, S., MURAO, S., TERAJIMA, H.: J. Ferment. Assoc. Jpn. **26**, 1968, s. 317
- [4] GOTO, S., OKAMOTO, R., KUWAJIMA, T., TAKAMATSU, A.: J. Ferment. Technol. **54**, 1976, s. 213
- [5] KITAI, A., OKAMOTO, R., OZAKI, A.: Proc. IV. Intern. Ferment. Symp. Tokyo 1972, s. 147
- [6] AKIBA, T., FUKIMBARA, T.: Ferment. Technol. **51**, 1973, s. 134
- [7] GOTO, S., KITAI, A., OZAKI, A.: Ferment. Technol. **51**, 1973, s. 582
- [8] LÜCKE, J., OELS, U., SCHÜGERL, K.: Proc. Vth Intern. Ferment. Symp., Berlin 1976
- [9] PÁČA, J., GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 539
- [10] SCHÜGELL, K., LÜCKE, J., LEHMANN, J., WAGNER, F.: Adv. Biochem. Eng., **8**, 1976, s. 63
- [11] PÁČA, J., GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng. **18**, 1976, s. 1075
- [12] UNGER, P., VOŽŇÁKOVÁ, Z., PÁČA, J.: J. Appl. Chem. Biotechnol. **27**, 1977, s. 150
- [13] LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, R. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: J. Biol. Chem., **193**, 1951, s. 265
- [14] OMATA, S., MURAO, S., TERASHIMA, H. J.: J. Ferment. Assoc. Jpn. **26**, 1970, s. 317
- [15] HOLZBERG, I., FINN, R. K., STEINKRAUS, H. K.: Biotechnol. Bioeng. **9**, 1967, 413
- [16] AIBA, S., SHODA, M., NAGATHANI, M.: Biotechnol. Bioeng. **10**, 1968, s. 845
- [17] ZINES, D. O., ROGERS, P. L.: Biotechnol. Bioeng. **12**, 1970, s. 561
- [18] ZINES, D. O., ROGERS, P. L.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 293
- [19] ABBOTT, B. J.: J. Gen. Microbiol. **75**, 1973, s. 383
- [20] EDWARDS, V. H.: Biotechnol. Bioeng. **12**, 1970, s. 679
- [21] FENCL, Z., MACHEK, F., NOVÁK, M.: Fermentation Advances (Perlman, D., ed.) Acad. Press N. Y., 1969, s. 301
- [22] FENCL, Z.: Continuous Culture of Microorganism (Málek, I., ed.) Czechoslovak Academy of Science, Prague 1964, s. 55
- [23] MIAN, F. A., FENCL, Z., PROKOP, A.: Proc. 4th Symp. on Continuous Cultivations of Microorganism, Academia Prague, 1969, s. 105
- [24] VRANÁ, D., FENCL, Z.: Yeast. Models in Science and Technics (Kocková-Kratochvílová, A., Minárik, E., eds) Slovak Academy of Science, Bratislava 1972, s. 621
- [25] TSENG, M. C., WAYMAN, M.: Can. J. Microbiol. **21**, 1975, s. 994
- [26] WAYMAN, M., TSENG, M. C.: Biotechnol. Bioeng. **18**, 1976, s. 383
- [27] HERBERT, D., ELSWORTH, R., TELLING, R. C.: J. Gen. Microbiol. **14**, 1956, s. 601
- [28] MIAN, F. A., AJDARY, A., FAZELI, A. J.: J. Ferment. Technol. **54**, 1976, s. 76
- [29] RICKARD, P. A. D., MOSS, F. J., PHILLIPS, D., MOK, T. C. K.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 189
- [30] RICKARD, P. A. D., MOSS, F. J., GANEZ, M.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 1
- [31] MOSS, F. J., RICKARD, P. A. D., BUSH, F. E., GAIGER, P.: Biotechnol. Bioeng. **13**, 1971, s. 63
- [32] MOSS, F. J., RICKARD, P. A. D., BEECH, G. A., BUSH, F. R.: Biotechnol. Bioeng., **11**, 1969, s. 561
- [33] KRAJOVAN, V., PEJIN, D.: Proc. IVth Intern. Symp. on Yeast, Vienna 1974, s. 19
- [34] AKBAR, M. D., RICKARD, P. A. D., MOSS, F. J.: Biotechnol. Bioeng. **16**, 1974, s. 455
- [35] RICKARD, P. A. D., HOGAN, C. B. J.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 1105
- [36] STOUTHAMER, A. H.: Yield Studies in Microorganisms. Meadowfield Press, Durham 1976, s. 18
- [37] HUŇKOVÁ, Z., FENCL, Z.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 1623
- [38] HUŇKOVÁ, Z., FENCL, Z.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 1235
- [39] FIECHTER, A., VON MEYERBURG, K.: Biotechnol. Bioeng. **10**, 1968, s. 535
- [40] RIBBONS, D. W.: Appl. Microbiol. **18**, 1969, s. 438
- [41] RICKARD, P. A. D., HOGAN, C. B. J.: Biotechnol. Bioeng. **20**, 1978, s. 1111
- [42] KRAJOVAN, V., KALAČEVIC, I., PEJIN, D., MARINKOVIC, R.: Yeast. Models in Science and Technics (Kocková-Kratochvílová, A., Minárik, E., eds) Slovak Academy of Science, Bratislava, 1972, s. 621
- [43] NYIRI, L. K., TOTH, G. M., CHARLES, M.: Biotechnol. Bioeng. **17**, 1975, s. 1663
- [44] STOUTHAMER, A. H., BETTENHAUSEN, C.: Antonie van Leeuwenhoek, **38**, 1972, s. 81
- [45] STOUTHAMER, A. H., BETTENHAUSEN, C.: Biochim. Biophys. Acta, **301**, 1973, s. 53
- [46] VELDKAMP, H.: Continuous Culture in Microbial Physiology and Ecology, Meadowfield Press, Durham 1976, s. 36
- [47] HARRISON, D. E. F.: Crit. Rev. Microbiol. **2**, 1973, s. 185

**Páča, J.: Problematika produkce kvasničné biomasy ve vícestupňovém kultivačním systému.** Kvas. prům. **28**, 1982, č. 4, s. 82—87.

Byl sledován vliv rostoucí koncentrace etanolu v přítoku živného média na růst a fyziologickou aktivitu buněk *Candida utilis*. Experimenty byly prováděny v kaskádě tří fermentorů zapojených v sérii při konstantní hodnotě zředovací rychlosti, teploty a pH média. V ustálených stavech kontinuálních kultivací se měřila koncentrace biomasy, etanolu a kyseliny octové v médiu, výtěžnost biomasy, produktivita procesu a respirační aktivita buněčné populace. Maximální koncentrace biomasy ve výtoku z fermentoru a maximální produktivita se dosáhla při koncentraci etanolu v přítoku v rozsahu 20 až 25 g.l<sup>-1</sup>. Ve vyšších koncentracích působil etanol negativně na spáření v procesu oxidativní fosforylace a respirační kontrolu buněk, což se projevilo poklesem výtěžnosti biomasy i poklesem obsahu bílkovin v buňkách. Bylo prokázáno, že přítomnost acetátu v médiu inhibuje respirační aktivitu buněk rostoucích na etanolu.

**Паца, Я.: Проблематика продукции биомассы дрожжей в многоступенчатой системе культивирования.** Квас. прум., **28**, 1982, № 4, стр. 82—87.

Было исследовано влияние повышающейся концентрации этанола в притоке питательной среды на рост и физиологическую активность клеток *Candida utilis*. Эксперименты проводились на каскаде трех ферментеров, включенных в серию при постоянной величине скорости разбавления, температуры и pH среды. В установившихся состояниях непрерывного культивирования измерялась концентрация биомассы, этанола и уксусной кислоты в среде, выход биомассы, производительность процесса и активность респирации клеточной популяции. Максимальная концентрация биомассы на выходе из ферментера и максимальная производительность были достигнуты при концентрации этанола в притоке в пределах 20—25 г.л<sup>-1</sup>. В высших концентрациях этанол оказывал отрицательное воздействие на сопряжение в процессе окислительной фосфорилизации и на контроль респирации клеток, что проявилось в понижении выхода биомассы и в понижении содержания белковых веществ в клетках. Было доказано, что наличие ацетата в среде ингибирует активность респирации клеток, культивируемых на этаноле.

**Páča, J.: Yeast Biomass Production in a Multistage Culture system.** Kvas. prům., **28**, 1982, No. 4, pp. 82—87.

The effect of increasing ethanol concentration in the feed on the growth and physiological activity of the

yeast *Candida utilis* was studied. The measurements of biomass, ethanol and acetic acid concentrations, biomass yield and productivity and respiration activity were made at steady-states of continuous culture. All experiments were performed in three fermentors in series with constant values of dilution rate, temperature and pH of the medium. The maximum biomass concentration in the effluent and maximum productivity was achieved between 20 and 25 g ethanol per litre in the feed. At higher concentrations, ethanol negatively affects the coupling of oxidative phosphorylation and respiratory control of cells resulting in a decrease in biomass yield and intracellular protein content. It was proved that the presence of acetate in the medium inhibits the respiration activity of yeasts growing on ethanol.

**Páca, J.: Problematik der produktion der Hefebiomasse in mehrstufigen Kultivationsystemen.** Kvas. prům., **28**, 1982, No. 4, S. 82—87.

Es wurde der Einfluß der wachsenden Äthanolkonzentration im Zufluß des Nährmediums auf das Wachstum

und die physiologische Aktivität der Zellen von *Candida utilis* verfolgt. Die Versuche wurden in einer Kaskade von 3 Fermentoren durchgeführt, die bei einer serienartiger Anordnung die Einhaltung konstanter Werte der Verdünnungsgeschwindigkeit, Temperatur und pH des Mediums gewährleisten. In stabilisierten Zuständen der kontinuierlichen Kultivation wurden die folgenden Parameter gemessen bzw. ermittelt: Konzentration der Biomasse, des Äthanol und der Essigsäure im Medium, die Produktivität des Prozesses und die Respirationsaktivität der Hefenpopulation. Die maximale Konzentration der Biomasse am Ausgang aus dem Fermentor und die maximale Produktivität wurden bei der Zufluß-Äthanolkonzentration im Bereich von 20—25 g.l<sup>-1</sup> erzielt. Höhere Konzentrationen wirkten sich negativ in der Verkopplung im Prozeß der oxidativen Fosforylation und Respirationskontrolle der Zellen, aus, was zum Absinken der Biomasseausbeute und des Eiweißgehalts in den Zellen führte. Es wurde bewiesen, daß die Azetatanwesenheit im Medium die Respirationsaktivität der auf Äthanol wachsenden Zellen inhibiert.