

# Overovanie rôznych možností priameho mikrobiologického využitia fytomasy

663.19:582

Ing. DARIA LONGAUEROVÁ, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie  
Doc. Ing. DUŠAN HALAMA, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Bratislava

Súčasnité obdobie sa vyznačuje hľadaním metód lepšieho a efektívnejšieho využitia surovín a tiež vývojom nových procesov a produktov založených na obnoviteľných surovinách.

Naša práca je zameraná na kombináciu anaeróbných a aeróbných metód spracovania fytomasy. Viedli nás k tomu poznatky austrálskych odborníkov [1], ktorí zistili, že je možné prekonať efektívnosť prežúvavcov z hľadiska tvorby bielkoviny. Prežúvavce dokážu vyžiť v podstate na neupravenom lignocelulózovom materiáli doplnenom vodou a potrebnými minerálnymi živinami.

Podstata austrálskeho spôsobu využitia fytomasy je, že sa v prvej fáze tráva po zriadení vodou naočkuje bacherovou mikroflórou; pri vhodnej teplote prebehne zmesná anaeróbna fermentácia. Jej hlavnými produktami sú nižšie masné kyseliny (prevážne kyselina octová, ale aj propiónová a maslová a niečo vyšších kyselín). V druhej fáze na pôdach získaných takýmto kvasením je možné kultivovať kvasinkové mikroorganizmy, schopné využívať nižšie masné kyseliny ako zdroj uhlíka a energie. Ich biomasa je tvorená bielkovinami, ktoré sú bližšie živočíšnym ako rastlinným.

Podľa týchto údajov [1] takáto kombinácia anaeróbných a aeróbných procesov poskytuje vo forme kvasničnej bielkoviny až 16násobnú vyššiu produkciu bielkovín ako v živočíšnej výrobe (výkrm bŕčkov) z rovnakého množstva rastlinnej produkcie. Aj ak by sme brali do úvahy iba esenciálne aminokyseliny (kvasničná bielkovina v porovnaní so živočíšnou je chudobnejšia najmä na sírne aminokyseliny) je tento rozdiel deväťnásobný.

Naším cieľom bolo overiť (v laboratórnom meradle) použiteľnosť tejto metódy ako i jej aplikáciu na rozličné materiály rastlinného pôvodu pomocou zmesných mezofilných i termofilných bakteriálnych kultúr. Pozornosť sme venovali najmä prvej — acidogénnej fáze z hľadiska produkcie nižších masných kyselín a celkových oxidovateľných látok.

## Materiál a metódy

**Mikroorganizmy:** Mezofilná zmesná bakteriálna kultúra sa získala naočkováním 4% suspenzie lignocelulózového substrátu vo fosforečnanovom tlmivom roztoku o pH 6,8 bacherovým obsahom kravy, ktorý bol získaný na bitúnku. Kultúra sa udržiavala preočkovaním každých 7 dní pri 10% objeme inokula pri 37 °C.

Termofilné zmesné bakteriálne kultúry sa získali postupným nahromaďovaním (pôvodné inokulum: exkrementy) na 4% suspenzii lignocelulózových substrátov suspendovaných v minerálnej DMA pôde podľa PIRTA [2] pri 60 °C a pri 10% objeme inokula; pasážovanie každých 7 dní, pH 6,8.

Anaeróbna kultivácia prebehla väčšinou v skúmavkách s Bunsenovými uzáverami.

Kvasinková kultúra bola pôvodne izolovaná nahromaďovaním na hydrolyzátoch odpadov živočíšnej výroby, určená Dr. Kockovou-Kratochvílovou, ako *Candida tropicalis* CCY 29-7-33. Udržiavala sa bežnou metódou na sladinkovom agare. Inokulum pre kultivačné pokusy sa pri-

pravilo na tekutej pôde. Ako tekuté pôdy sa používali filtráty po anaeróbnej fermentácii uvedených materiálov. Kultivácia pri 30 °C, pH 6, rotačná trepačka, objem pôdy 50 ml v 500 ml bankách.

**Analytické metódy:** Celkový počet buniek sa stanovil počítaním v Bürkerovej komôrke. Nižšie masné kyseliny titráciou po destilácii vodnou parou. Vyjadrovali sa v ekvivalentoch kyseliny octovej. Celkové oxidovateľné látky sa stanovili modifikáciou dvojchromanovej metódy (20minutový var a fotometrické stanovenie Cr<sup>3+</sup>) a vyjadrovali sa v ekvivalentoch glukózy.

**Substráty:** lucerna, pšeničná slama, kukuričné oklasky, drewná štiepka, prášková celulóza (Whatman).

## Výsledky a diskusia

Z veľkého počtu uskutočnených pokusov vyberáme iba niekoľko typických výsledkov, ktoré uvádzame vo forme grafov a tabuliek. Z výsledkov vyplýva, že metóda kombinácie anaeróbných a aeróbných procesov je vhodná pre ľubovoľný rastlinný materiál. Substráty po termofilnej a mezofilnej kultivácii bakterií boli vhodné pre rast *C. tropicalis* CCY 29-7-33.

Tabuľka 1. Aeróbný rast *C. tropicalis* CCY 29-7-33 na pôdach po anaeróbnej fermentácii na kukuričných oklaskoch

Termofilná fermentácia					Mezofilná fermentácia				
deň	pH	NMK [g/l]	COL [g/l]	poč. bun. [b/ml] 10 <sup>9</sup>	pH	NMK [g/l]	COL [g/l]	poč. bun. [b/ml] 10 <sup>9</sup>	
0	5,0	1,94	4,75	0,3	5,0	1,97	5,1	0,18	
3	5,9	0,30	3,00	2,1	5,6	0,12	4,6	1,80	
6	6,1	0,12	1,95	2,4	5,7	0,12	2,4	2,00	

Vysvetlivky:

NMK — nižšie masné kyseliny  
COL — celkové oxidovateľné látky

Po overení vhodnosti metódy zamerali sme sa na zvýšenie produkcie kyselín v anaeróbnej fáze, a to: nahromadením nových zmesných kultúr, optimalizáciou kultivačných podmienok, prídavkom rastových látok. Každý z uvedených spôsobov priniesol zvýšenie produkcie. Uvádzame niektoré výsledky:

1. Pri nahromaďovaní sme nezískali zmesné kultúry, ktoré by sa podstatne odlišovali produkciou. Snáď je potrebné siahnuť po iných zdrojoch mikroorganizmov, prípadne izolovať za rôznych kultivačných podmienok.

2. Optimalizáciu kultivačných podmienok sme robili Rosenbrockovou optimalizačnou metódou [3]. Optimalizované parametre: inokulum, zdroj dusíka — NH<sub>4</sub>Cl, množstvo substrátu — kukuričné oklasky, drewné štiepky (tab. 2 a 3).

Fermentácie prebehli vo fosforečnanovom tlmivom roztoku o pH 6,8.

3. Výsledky získané pri sledovaní vplyvu prídavku kvasničného autolýzáta a peptónu na produkciu nižších masných kyselín pri utilizácii kukuričných oklaskov

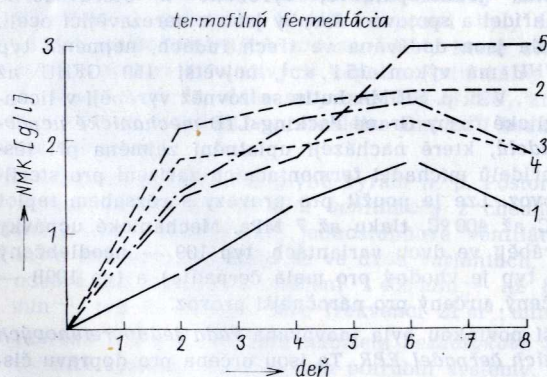


Tabuľka 2. Produkcia nižších mastných kyselín pred optimalizáciou a po optimalizácii

Termofilná fermentácia		Mezofilná fermentácia	
pôvodné	NMK [g/l] optimalizované	pôvodné	optimalizované
kukuričné oklasky			
2,06	2,74	1,36	6,07
drevné štiepky			
0,48	2,26	0,54	0,78

Tabuľka 3. Hodnoty optimalizovaných parametrov pred optimalizáciou a po optimalizácii

Termofilná fermentácia			Mezofilná fermentácia	
Parametre	pred optimalizáciou	po optimalizácii	pred optimalizáciou	po optimalizácii
Kukuričné oklasky [g/l]	40	80	40	80
NH <sub>4</sub> Cl [g/l]	1	1,5	1	1
inokulum % obj.	10	10	10	15
drevné štiepky [g/l]	40	160	40	80
NH <sub>4</sub> Cl [g/l]	1	1,2	1	0,6
inokulum % obj.	10	15	10	10



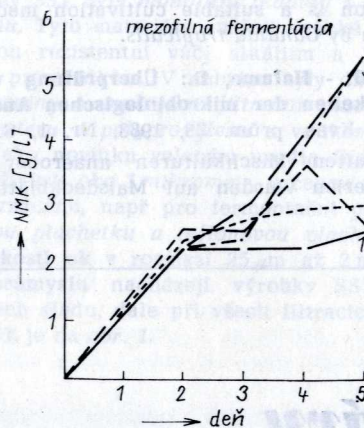
Obr. 1. Vplyv rastových látok na produkciu nižších mastných kyselín — termofilná fermentácia

vo fosforečnanovom tlmivom roztoku termofilnou a mezofilnou bakteriálnou kultúrou su znázornené na obr. 1 a 2:

1. kontrola
2. kvasničný autolyzát 1 g/l
3. kvasničný autolyzát 2 g/l
4. peptón 1 g/l
5. peptón 2 g/l

Zistené poznatky nás stimulovali v pokračovaní výskumu kyselinotvornej fázy. Pokračujeme v izolácii ďalších nahromaďovacích kultúr a naďalej sa venujeme optimalizácii kultivačných podmienok.

Overili sme si, že *C. tropicalis* CCY 29-7-33 využíva i vyššie koncentrácie kyselín a je vhodná pre testovaný spôsob využívania fyto-masy.



Obr. 2. Vplyv rastových látok na produkciu nižších mastných kyselín — mezofilná fermentácia.

V práci sme vedome nepoužívali striktné anaeróbne podmienky, pretože dodržanie týchto, ak by sa výsledky mali prakticky realizovať, bolo by nákladné.

#### Literatúra

- [1] HENRY, D. P. et al.: Nature, **274**, 1978, 619
- [2] PIRT, S. J.: J. Gen. Microbiol., **47**, 1967, 181
- [3] VOTRUBA, J., PILÁT, P., PROKOP, A.: Biotechnol. Bioeng., **17**, 1975, 1833

Longauerová D., Haľama D.: Overovanie rôznych možností priameho mikrobiologického využitia biomasy. Kvas. prům. **29**, 1983, č. 1, s. 10—12.

Nahromadené zmesné kultúry anaeróbnych celulolytických baktérií boli kultivované na kukuričných oklaskách i na drevných štiepkách. U mezofilnej kultúry (37 °C) kultivácia prebehla vo fosfátovom tlmivom roztoku o pH 6,8; u termofilnej kultúry (60 °C) v minerálnej pôde pro pH 6,8. Produkcia nižších mastných kyselín bola optimalizovaná Rosenbrockovou optimalizačnou metódou. Vodná fáza po anaerobnom kvasení ukázala sa vhodným kultivačným médiom pre nahromadenie biomasy *Candida tropicalis*.

Лонгаурова, Д., Галяма, Д.: Испытание некоторых возможностей прямого микробиологического использования фитомассы. Квас. prům., **29**, 1983, № 1, стр. 10—12.

Накопительные культуры анаэробных целлюлолитических бактерий культивировались на кукурузных кофрыжках и на щепке древесины. Для мезофильных культур (37°) материал суспендировали в фосфатном буфере pH 6,8; для термофильных (60°) в минеральной среде. Продукция низших жирных кислот была оптимизирована с помощью метода Розенброка. Водяной раствор после анаэробного брожения оказался подходящей средой для получения биомассы дрожжеподобных грибов *Candida tropicalis*.

Longauerová, D., Haľama, D.: Testing of some possibilities of direct microbiological utilization of phytomass. Kvas. prům., **29**, 1983, No. 1, pp. 10—12.

Enrichment cultures of anaerobic cellulolytic bacteria were cultivated on corn cobs and wooden chips. Mesophilic cultures (37 °C) were kept in suspension of these materials in phosphate buffer (pH 6,8), thermophilic (60 °C) ones in suspensions with mineral medium. The production of volatile fatty acids was optimized



by Rosenbrock's method. The water phase after anaerobic fermentation is a suitable cultivation medium for SCP production by *Candida tropicalis*.

**Longauerová, D. - Hařama, D.: Überprüfung verschiedener Möglichkeiten der mikrobiologischen Ausnützung der Biomasse.** Kvas. prům. 29, 1983, Nr. 1, S. 10—12.

Die angehäuften Mischkulturen anaerober celulytischer Bakterien wurden auf Maisdeckblättern und

Holzspänen kultiviert. Bei der mesophilen Kultur (37 °C) verlief die Kultivation in inhibierender Fosfatlösung mit pH 6,8; bei der thermophilen Kultur (60 °C) im Mineralboden bei pH 6,8. Die Produktion der niedrigeren Fettsäuren wurde mittels der Optimalisationsmethode nach Rosenbrock optimalisiert. Die Wasserphase nach anaerober Gärung zeigte sich als ein geeignetes Kultivationsmedium für die Anhäufung der Biomasse *Candida tropicalis*.