

Ing. BOŽENA BĚHALOVÁ, CSc., RNDr. ČENĚK NOVOTNÝ, CSc., Ing. FRANTIŠEK MACHEK, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha,  
Ing. JIŘINA PÁSKOVÁ, CSc., Ing. BOHUMIL ŠPAČEK, CSc., Výzkumný ústav koncernu Konzervárny a lihovary, Praha

**Klíčová slova:** ergosterol, steroly, výroba, kvasinky, průmyslové kvasinky, syntéza, kmen, fermentace, izolace, mikroorganismus, *Saccharomyces cerevisiae*, hybrid, intermediát

## Úvod

Pekařské kvasinky jsou surovinovým zdrojem výroby ergosterolu, realizované v současné době ve Východočeských chemických závodech, n.p., Pardubice-Semtín. Ergosterol se zde dále zpracovává na antirachitický vitamín D<sub>2</sub>.

Dlouholetým problémem výroby je nedostatečná kapacita tuzemské produkce ergosterolu, takže jedna třetina jeho roční spotřeby se trvale dováží z kapitalistických států a tak nepříznivě ovlivňuje výrobní cenu vitamínu D<sub>2</sub>. Řešením současné situace by bylo zvýšení obsahu ergosterolu v sušině kvasinek z necelého 1 % alespoň na hodnotu 1,5 až 2 %.

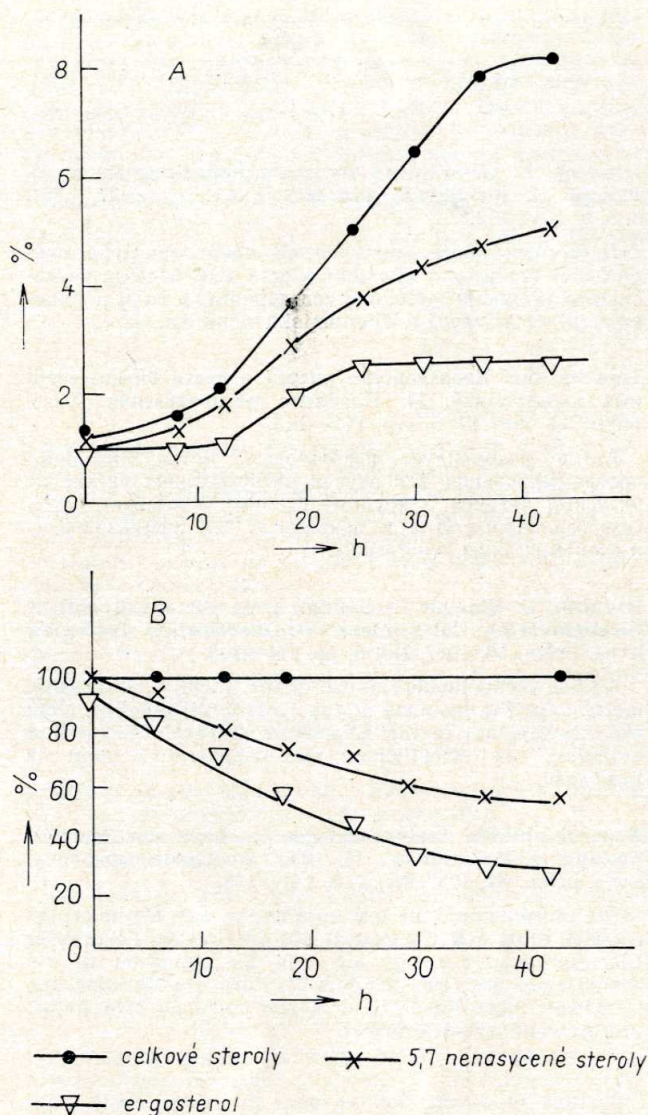
Dva zásadně možné přístupy zvýšení obsahu ergosterolu v kvasinkách jsou úprava fermentačních podmínek a výběr vhodného kmene.

## Zvýšení obsahu ergosterolu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* úpravou kultivačních podmínek

Obsah sterolů a jejich kvalitativní složení jsou v široké míře ovlivnitelné způsobem živení, především limitací

živin [1], [2]. Způsob živení neovlivňuje pouze hladinu ergosterolu, ale současně i hladinu ostatních sterolů, metabolických intermediátů, z hlediska výroby ergosterolu balastních a ztěžujících jeho izolaci [3]. Zdá se, že zvýšení obsahu ergosterolu změnou kultivačních podmínek je obtížně realizovatelné, neboť již při poměrně nízkém zvýšení obsahu ergosterolu v buňce neúměrně vzrůstá obsah ostatních sterolů. U droždí, produkovaného běžnou droždářskou technologií, tvoří ergosterol 80—90 % sterolů. Při indukci zvýšené tvorby sterolů a více než dvojnásobném zvýšení ergosterolu klesá procentní zastoupení ergosterolu na 30 %. Obrázek 1 zobrazuje změnu obsahu a složení sterolů kmene *Saccharomyces cerevisiae* A<sub>22</sub> [5] při zvýšené syntéze sterolů na indukční melasové půdě [4] a zároveň dokumentuje doprovodný vzrůst balastních sterolů, především 24 (28) dehydroergosterolu, tvořícího společně s ergosterolem frakci 5,7-nenasycených sterolů. 24 (28) dehydroergosterol je přímým metabolickým prekurzorem ergosterolu, při izolaci ergosterol doprovází a snižuje tak výtěžek produktu.





Obr. 1. Fermentace kmene *Saccharomyces cerevisiae* A<sub>22</sub> na indukční melasové půdě

(102 g melasy, 10 g cornsteepu, 0,6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v l)  
 1A — Změna obsahu sterolů v kvasničné sušině během fermentace  
 1B — Změna složení sterolové frakce během fermentace

### Zvýšení produkce ergosterolu výběrem kmenů *Saccharomyces cerevisiae* s konstitutivně vysokou hladinou obsahu ergosterolu

Na základě poznatků z fermentací jsme zaměřili pozornost především na výběr kmene s konstitutivně vysokým obsahem ergosterolu. Jeho aplikace v droždárně se stala aktuálnější ještě tím, že při současné produkci pekařského droždí přechází většina droždáren na vyšší technologický stupeň výroby s výkonnějším aeračním zařízením pro vyšší produkci biomasy. V licenčně zajištěných provozech jsou kultivovány dovozní hybridní kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s velice nízkým obsahem ergosterolu, což výrazně ovlivňuje jeho výrobní cenu (tab. 1).

Pro kultivaci v moderních droždárnách je nutno vedle vyššího obsahu ergosterolu zajistit dobré pekařské vlastnosti a plánovaný objem produkce. Laboratorní testací 80 droždářských kmenů *Saccharomyces cerevisiae* bylo prokázáno, že nejlepšími producenty ergosterolu jsou kmeny KBD a A<sub>22</sub>, přičemž kmen KBD syntetizuje na indukční melasové půdě nižší množství balastních sterolů. V droždárně Nýřany byl vyzkoušen kmen KBD,

který si i v provozních podmínkách podržel dostatečně vysoký obsah ergosterolu, avšak výtěžek biomasy byl ve srovnání s běžně používaným hybridním kmenem v nýřanské droždárně nižší. Následnou selekci a šlechtěním kmene KBD byl získán kmen, označený jako D<sub>7</sub>, který je chráněn autorským osvědčením č. 24 77 97 [6]. Kmen D<sub>7</sub> převyšuje výchozí kmen v obsahu ergosterolu a dosahuje produkce biomasy hybridních kmenů (tab. 2).

V droždárně Nýřany byla u série ověřovacích fermentací kmene D<sub>7</sub> prověřena stabilita produkce biomasy a ergosterolu i eventuální možnost zvýšení produkce ergosterolu modifikací fermentačního postupu. Modifikace I spočívala ve dvoufázovém lineárním vedení přítoku melasové záparty a amoniakové vody (legenda obr. 2B), ke kterému vedla snaha rozdělit fermentaci na růstovou a produkční fázi. Při modifikaci II byl přítok melasové a amoniakové vody do 9. h lineární, při 35 % snížení živin dusíkem a od 9. h byl řízen metrexem při 0,5 % ethanolu v médiu a běžné hladině živin dusíkem (legenda obr. 2C). Snížení živin dusíkem a růst na ethanolu příznivě ovlivňují syntézu ergosterolu především u kmene A<sub>22</sub>. Průběh fermentací kmene D<sub>7</sub> je zobrazen na obr. 2. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Jak ukazuje tabulka 3, v modifikovaných fermentačních postupech obsah ergosterolu sice mírně vzrostl, avšak díky současnému snížení produkce biomasy byla celková produkce ergosterolu mírně snížena.

Tabulka 1. Vl'v suroviny na výrobní cenu ergosterolu

Dodavatel	Průměrný obsah ergosterolu (%)	Výrobní cena ergosterolu (Kčs za kg)
Krásné Březno (1984)	1,1	3 600
Nýřany (1984)	0,65	6 000

Tabulka 2. Produkce biomasy a ergosterolu u sledovaných kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

Kmen	Obsah ergosterolu (%)	Produkce biomasy (t lis. droždí na fermentor)	Teoretický výtěžek ergosterolu (kg na fermentor)
hybrid	0,65	11,0	17,8
KBD	1,42	8,2	29,0
D <sub>7</sub>	1,51	11,7	44,5

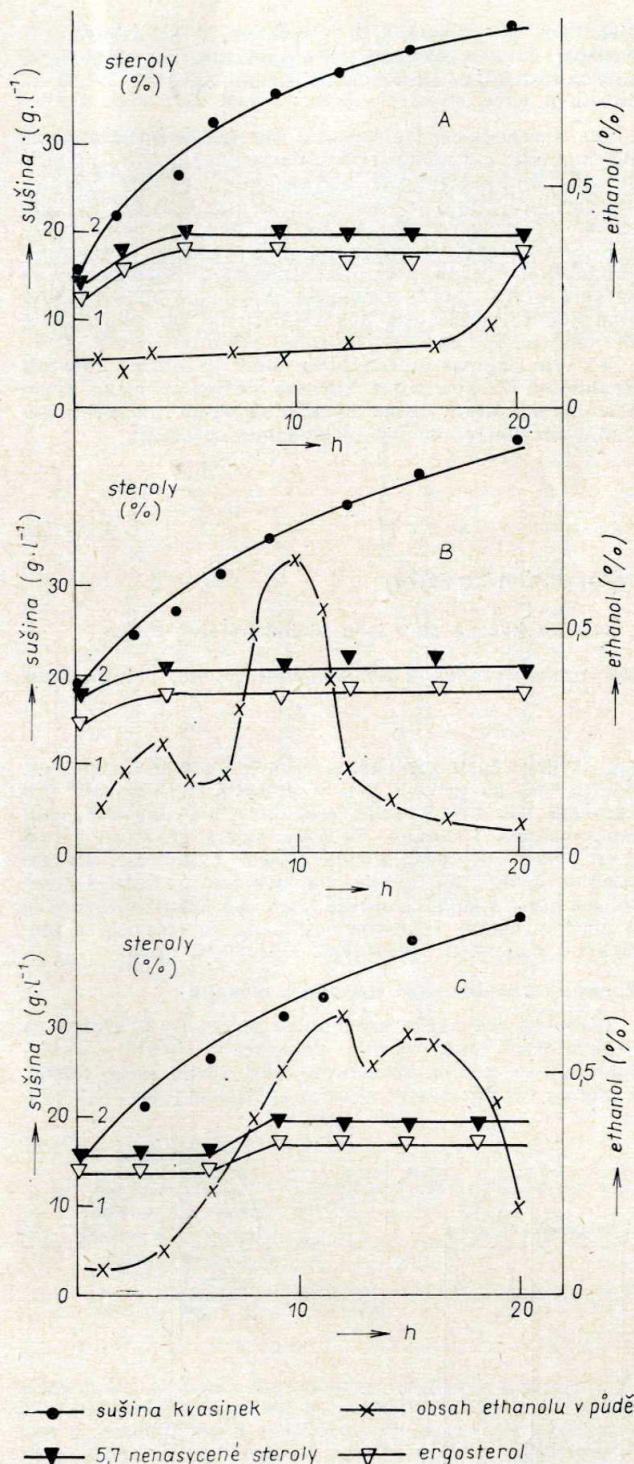
Tabulka 3. Stabilita produkce biomasy a ergosterolu kmene D<sub>7</sub>

	Ergosterol (%)	24 (28) dehydroergosterol (%)	Produkce biomasy (t lisova-ného droždí ve fermentoru)	Teoretický výtěžek ergosterolu (kg na fermentor)
kontrola	1,50	0,39	11,3	45,8
modifikace I	1,53	0,40	10,6	43,8
modifikace II	1,58	0,31	9,3	39,7

Tabulka 4. Obsah sterolů v průmyslových kvasinkách

Název kvasinky	5,7 nenasycené steroly (%)	24 (28) dehydroergosterol (%)	Ergosterol (%)
<i>Candida ethanolitolerans</i> (Kojetín)	0,45	0,08	0,37
<i>Candida utilis</i> (SmP Paskov)	0,47	0,10	0,37
<i>Candida coreanus</i> (Roztoky)	0,58	0,12	0,46
<i>Saccharomyces uvarum</i> (Staropramen, Smíchov)	0,15	0,10	0,05





Obr. 2. Průmyslové fermentace kmene *Saccharomyces cerevisiae* D<sub>7</sub>.

2A kontrola — drožděnský přítok melasové zářary, řízený metrexem na 0,1 % ethanolu, přítok amoniakové vody 33 l v 1000 l zářary  
2B modifikace drožděnského přítoku I — dvofázový lineární přítok melasové zářary  
1.—4. h rozkvas 900 l. h<sup>-1</sup>  
4.—9. h 1200 l. h<sup>-1</sup>  
9.—20. h 600 l. h<sup>-1</sup>  
čpavková voda 33 l v 1000 l zářary po celou dobu fermentace  
2C modifikace drožděnského přítoku II — vyšší hladina ethanolu v závěru fermentace, přítok 1.—9. h 800 l. h<sup>-1</sup>, amoniaková voda 20 l v 1000 l  
9.—18. h přítok melasové zářary řízený metrexem na 0,5 % ethanolu, amoniaková voda 33 l v 1000 l zářary

### Obsah ergosterolu ostatních průmyslových kvasinek

Vedle studia drožděnských kmenů *Saccharomyces cerevisiae* byl obsah a složení sterolů stanoven i u kvasinek z jiných možných průmyslových zdrojů. Výsledky uvádí tabulka 4.

V žádném případě (uvedeném v tabulce 4) nepřekročil obsah ergosterolu v kvasničných buňkách hodnotu 0,5 % sušiny.

### Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že nejlepším surovinovým zdrojem výroby ergosterolu jsou pekařské kvasinky patentovaných drožděnských kmenů D<sub>7</sub> a A<sub>22</sub>, produkované běžným způsobem přítokové technologie ve vysokoprodukčních droždárnách. Při fermentaci kmene D<sub>7</sub> v provozních podmínkách se dosáhlo vysoké produkce biomasy kvalitního pekařského droždí při současně vysoké produkci ergosterolu. Kmen D<sub>7</sub> reaguje málo na změny technologie fermentace, což zajišťuje stabilitu produkce biomasy i ergosterolu. Úpravou fermentačních podmínek je snáze modifikovatelný kmen A<sub>22</sub>, který v průmyslovém měřítku zatím nebyl zkoušen. Při fermentačních možnostech zvýšení obsahu ergosterolu je však vždy nutno sledovat nebezpečí současného zvýšení syntézy balastních sterolů. Kvasinky z jiných průmyslových zdrojů mají pro ekonomickou výrobu příliš nízký obsah ergosterolu.

### Literatura

- [1] VOTRUBA, J., BĚHALOVÁ, B., BERAN, K.: Folia microbiol. **31**, 1986, s. 69
- [2] BĚHALOVÁ, B., VOTRUBA, J., PICHOVÁ, A., BERAN, K.: Folia microbiol. **31**, 1986, s. 129
- [3] BĚHALOVÁ, B., NOVOTNÝ, Č., ZAJÍČEK, J., PÁSKOVÁ, J., LATINÁK, J., KOŽENÝ, M.: Kvas. prům. **32**, 1986, s. 194
- [4] BĚHALOVÁ, B.: Využití *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu kvasničného autolyzátu a ergosterolu. (Dizertační práce) MŽ ČSAV, Praha 1983
- [5] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., HRONSKÁ, L., BERAN, K., BĚHALOVÁ, B.: A. o. č. 201 882, Kmen mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae*. PV 8492/78
- [6] PÁSKOVÁ, J., ŠPAČEK, B., HRADEC, V., BĚHALOVÁ, B., NOVOTNÝ, Č., ZAJÍČEK, J.: A. o. č. 247 797, Kmen mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu ergosterolu. PV 3033/85

Lektoroval Ing. J. Fabián, CSc.

Běhalová, B., Novotný, Č., Machek, F., Pásková, J., Špaček, B.: Perspektivy výroby ergosterolu z průmyslových kvasinek. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 5, s. 143—146.

Syntézu kvasničného ergosterolu lze zvýšit jednak výběrem vhodných kmenů, jednak zásahy do technologie fermentace, při nichž se však může neúměrně zvýšit syntéza intermediátů ergosterolu, ztěžující jeho izolaci. Schopnost zvýšené produkce ergosterolu byla prokázána u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* A<sub>22</sub> a D<sub>7</sub>, přičemž vysoká produkce biomasy i ergosterolu kmene D<sub>7</sub> byla potvrzena i v průmyslovém měřítku.

Pro výrobu ergosterolu jsou nejlepší surovinou pekařské kvasinky vybraných kmenů, jejichž obsah ergosterolu několikanásobně převyšuje obsah ergosterolu v hybridních pekařských kmenech, v pivovarských kvasinkách i v krmovém droždí.

Бегалова, Б., Новотны, Ч., Махек, Ф., Паскова, И., Шпачек, Б.: Перспективы производства эргостерола из заводских дрожжей. Квас. прум. **33**, 1987 № 5, стр. 143—146.

Синтез дрожжевого эргостерола можно повысить как выбором подходящих штаммов, так попаданием в технологию ферментации, которая может вести к неоперному повышению синтеза интермедиатов эргостерола, которые затрудняют изоляцию. Способность повышенной продукции эргостерола была доказана у штаммов *Saccharomyces cerevisiae* A<sub>22</sub> и D<sub>7</sub>, когда высокая продукция биомассы и эргостерола штамма D<sub>7</sub> была проверена и в промышленном критерии.

Для продукции эргостерола лучшей сырьевой пекарские дрожжи избранных штаммов.

Вместимость эргостерола в штаммах превышает вместимость эргостерола в гибридных пекарских штаммах, в пивных и в кормовых дрожжах.



Běhalová, B., Novotný, Č., Machek, F., Pásková, J., Špaček, B.: **Perspektives of Ergosterol Production from Industrial Yeasts.** Kvas. prům. **33**, 1987, No 5, pp. 143—146.

Synthesis of yeast ergosterol can be increased both by selection of suitable strains and by interference with fermentation technology. The latter approach may cause an excessively high synthesis of ergosterol intermediates hampering its isolation. The ability to produce increased amounts of ergosterol was determined in *Saccharomyces cerevisiae* strains *A*<sub>22</sub> and *D*<sub>7</sub>, the high production both biomass and ergosterol in strain *D*<sub>7</sub> was tested also on an industrial scale.

The best producers of ergosterol are selected strains of baker's yeast; the content of ergosterol in these strains exceeds several times that of hybrid baker's yeast, brewer's yeast and fodder yeast.

Běhalová, B. - Novotný, Č. - Machek, F. - Pásková, J. - Špaček, B.: **Perspektiven der Produktion von Ergosterol aus industriellen Hefen.** Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 5, S. 143—146.

Die Synthese des Hefeergosterols kann entweder durch die Auswahl geeigneter Hefestämme oder durch Eingriffe in die Technologie der Fermentation erhöht werden. Durch diese Eingriffe kann sich jedoch auch die Synthese der Ergosterol-Intermediate erhöhen, die seine Isolierung erschweren. Die Fähigkeit der erhöhten Ergosterolproduktion wurde bei den Stämmen *Saccharomyces cerevisiae* *A*<sub>22</sub> und *D*<sub>7</sub> bewiesen, wobei die hohe Produktion der Biomasse und des Ergosterols bei dem Stamm *D*<sub>7</sub> auch im industriellen Ausmaß bestätigt wurde.

Für die Ergosterolproduktion sind als bester Rohstoff Backhefen ausgewählter Stämme geeignet, deren Ergosterolgehalt die hybride Backhefestämme, die Brauerei- und Futterhefen um ein mehrfaches übertrifft.