

# Vliv přídavků růstových látek na tvorbu biomasy *Candida utilis* kultivované na sulfityových výluzích

663.1 636.087.24  
636.236

Ing. FRANTIŠEK KOLÍN, VLADIMÍR KRUMPHANZL, člen korespondent ČSAV, Ing. VÍT MATEJŮ, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

**Klíčová slova:** stimulátor růstu, zahuštěné melasové lihovarské výpalky, kvasničný autolýzát, *Candida utilis*, sulfityový výluh s Mg-bází.

## Úvod

Při kultivačních procesech na sulfityových výluzích se používají některé stimulátory růstu, protože samotný sulfityový výluh tyto látky neobsahuje. Nejdůležitější funkcí stimulátorů růstu je obohacení kultivačního prostředí o látky, které kultivované mikroorganismy nejsou schopny samy syntetizovat, nebo je syntetizují v nedostatečném množství. Další význam stimulátorů spočívá v urychlení růstu mikroorganismů, v procesu jejich množení a ve zvýšení výtěžnosti kultivačního procesu. Jako stimulátory růstu se většinou využívají látky s vysokým obsahem aminokyselin, vitamínů a dalších látek podporujících růst mikroorganismů.

Při průmyslové výrobě krmných kvasnic ze sulfityových výluhů se velmi často využívaly a využívají jako stimulátory růstu sulfityové lihovarské výpalky [1, 2]. Jejich použití má dvojí význam: jednak se snižuje obsah redukujících látek v kultivačním prostředí (malé přestupy kyslíku v používaných fermentorech), jednak obsahují stimulující látky pro růst kvasinek.

V laboratorním měřítku byl ověřován stimulační účinek více látek na tvorbu biomasy i obsah hrubého proteinu při kultivacích na sulfityových výluzích. V Japonsku se např. pokoušeli využít rýžové otruby jako zdroj dusíku i stimulačních látek [3, 4], dále byl ověřován vliv corn-steepu, sladu a některých vitamínů [5]. Ke stimulaci růstu na sulfityových výluzích byly použity i huminové kyseliny [6] a výtěžnost byla zvyšována přídavkem melasy [7].

V ČSSR byla v Mikrobiologickém ústavu ČSAV vypracována technologie pro výrobu krmných bílkovin za použití kmene *Candida utilis* z Ca- a Mg-bisulfityových výluhů, kde látky stimulující růst jsou dodávány melasovými lihovarskými výpalky [8, 9].

Vzhledem k tomu, že klasickým stimulátorem růstu mikroorganismů bývá kvasničný autolýzát, ověřovali jsme možnost jeho využití i při kultivaci kvasinek *Candida utilis* na Mg-bisulfityových výluzích. Současně jsme se zaměřili na porovnání stimulačního účinku kvasničného autolýzátu s průmyslově využívaným stimulátorem růstu — melasovými lihovarskými výpalky.

## Materiál a metody

Pro kultivační pokusy byla použita kvasinka *Candida utilis* ze sbírky Mikrobiologického ústavu ČSAV, vyšlechťená pro kultivaci na sulfityových výluzích s magnesiovou bází. Kultura byla udržována pasážováním na třepačce. Jako substrát byl použit sulfityový výluh ze závodu Severomoravské celulózky (SmC), Paskov. Složení sulfityového výluhu je uvedeno v tabulce 1.

Před kultivací byl sulfityový výluh obohacen potřebnými živinami a ověřovanými stimulátory růstu v různých koncentracích.

Tabulka 1. Složení Mg-bisulfityového výluhu z SmC Paskov

Složka	(g. l <sup>-1</sup> )
Celková sušina	143,7
Popel	13,3
Redukující látky	25,0
Těkavé kyseliny	7,7
Kyselina octová	6,6
Kyselina mravenčí	0,9
Oxid siřičitý volný	0,4
2-furankarbaldehyd	0,2

Zahuštěné melasové výpalky (lihoval Seliko, n. p., Olomouc, závod Ostrava-Svinov, 78 % sušiny) byly použity v koncentracích: 5, 10, 20, 30, 50 g. l<sup>-1</sup>. Ověřované koncentrace kvasničného autolýzátu (Imuna, n. p., Šarířské Michalany — 70 % sušiny) byly: 0,5; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0 g. l<sup>-1</sup>.

Kultivační prostředí pro třepačkové a vsádkové kultivace v laboratorním fermentoru obsahovalo na 1 litr sulfityového výluhu:

0,35 g KCl  
5,75 g NH<sub>4</sub>Cl  
1,00 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %)

Kultivační prostředí pro kontinuální kultivace v labo-



ratorním fermentoru obsahovalo na 1 litr sulfitového výluhu:

0,55 g KOH  
1,00 ml  $H_2PO_4$  (85 %)

Zdrojem dusíku při kontinuální kultivaci byla amoniaková voda (12,5 % hm), která současně sloužila pro úpravu pH kultivačního prostředí.

Třepačkové kultivace byly prováděny v 500 ml baňkách se 100 ml kultivačního prostředí na reciproké třepačce ( $1,5 s^{-1}$ ) při teplotě  $34^\circ C$ . Inokulace byla prováděna 5 ml kvasničné suspenze z předcházející kultivace. Doba kultivace byla 72 hodin.

Vsádkové i kontinuální kultivace se uskutečnily v laboratorním fermentoru LF-2 (VD ČSAV) za konstantních podmínek:  $T = 34^\circ C$ ,  $V_g = 1000 ml \cdot min^{-1}$ ,  $VVM = 0,69 l \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ ,  $n = 1000 min^{-1}$ ,  $V_L = 1500 ml$ , pH 5,4. Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla udržována v rozmezí 10 až 20 % nasycení při podmínkách kultivace. Inokulace se prováděla kvasničnou pastou z třepačkové kultivace, získanou odstředěním na odstředivce T 30 Janetzki (NDR). Počáteční koncentrace sušiny biomasy byla asi  $2 g \cdot l^{-1}$ . Doba vsádkové kultivace byla 12 hodin. Kontinuální kultivace byly udržovány v ustáleném stavu po dobu 80 hodin. V průběhu kultivací se sledovaly koncentrace redukujících látek metodou podle Somogyiho [10], sušina biomasy gravimetrickou metodou [10], těkavé kyseliny, kyselina octová a mravenčí metodou TAPPI [11] a celkový dusík a bílkovina metodou podle Kjeldahla [10]. Pro srovnání účinků stimulatorů růstu se ve všech případech prováděly kontrolní kultivace bez jejich přísad.

## Výsledky

Při třepačkových kultivacích s různými koncentracemi zahuštěných melasových lihovarských výpalků a kvasničného autolyzátu se sledovaly koncentrace sušiny biomasy, zbytkových redukujících látek, těkavých kyselin, kyseliny octové a mravenčí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

V případě přísadky zahuštěných melasových výpalků v rozmezí koncentrací 5 až  $50 g \cdot l^{-1}$  se dosáhlo nejvyšších nárůstů biomasy při přísadce  $50 g \cdot l^{-1}$ , a to  $14,5 g \cdot l^{-1}$ . Při přísadkách 5, 20 a  $30 g \cdot l^{-1}$  se dosáhlo nárůstu od  $12,0 g \cdot l^{-1}$  do  $12,6 g \cdot l^{-1}$ . Při přísadce  $10 g \cdot l^{-1}$  byl nárůst nižší ( $10,6 g \cdot l^{-1}$ ), přesto však byl vyšší než u kontrolních kultivací bez přísadky stimulatoru ( $9,4 g \cdot l^{-1}$ ). Nejvyšší nárůst sušiny biomasy při přísadce  $50 g \cdot l^{-1}$  zahuštěných melasových výpalků lze přičíst spíše využívání uživatelných látek z melasových výpalků než jejich stimulačnímu účinku. Tuto domněnku podporují i koncentrace zbytkových redukujících látek, které byly druhdy nejvyšší. Podrobně lze uvažovat i v případě přísadků 20 a  $30 g \cdot l^{-1}$ . Z tohoto hlediska je nejvhodnější přísadka melasových výpalků  $5 g \cdot l^{-1}$ .

Přísadka kvasničného autolyzátu v rozmezí koncentrací 0,5 až  $5 g \cdot l^{-1}$  neměl podstatný vliv na zvýšení nárůstu sušiny biomasy oproti kontrole. Největšího nárůstu sušiny biomasy se dosáhlo při přísadce  $5 g \cdot l^{-1}$  kvasnič-

Tabulka 2. Průměrné hodnoty sledovaných veličin při třepačkových kultivacích s přísadkou různého množství stimulatorů růstu

$PR$ ( $g \cdot l^{-1}$ )		$X$ ( $g \cdot l^{-1}$ )	$RL$ ( $g \cdot l^{-1}$ )	$TK$ ( $g \cdot l^{-1}$ )	$KO$ ( $g \cdot l^{-1}$ )	$KM$ ( $g \cdot l^{-1}$ )
$O$	0	9,4	5,6	1,3	0,6	0,8
$MV$	5	12,0	5,2	1,4	0,6	0,7
	10	10,6	5,7	1,4	0,7	0,8
	20	12,3	6,7	1,5	0,7	0,8
	30	12,6	5,9	1,6	0,7	0,8
	50	14,5	6,5	1,5	0,7	0,9
$KA$	0,5	8,9	5,0	1,8	0,9	0,6
	1,5	9,2	5,5	1,8	0,8	0,6
	2,0	9,2	5,4	1,7	0,8	0,7
	2,5	9,4	5,4	1,6	0,7	0,8
	3,0	9,3	5,9	1,7	0,9	0,7
	5,0	9,9	5,9	1,8	1,0	0,8

ného autolyzátu ( $9,9 g \cdot l^{-1}$ ). Vsádkové kultivace ve fermentoru byly provedeny pro ověření výsledků dosažených v třepačkových kultivacích. Zahuštěné melasové výpalky byly použity v koncentracích 5, 15 a  $30 g \cdot l^{-1}$ . Nejlepších výsledků se dosáhlo při koncentraci  $5 g \cdot l^{-1}$  melasových výpalků. Konečné koncentrace sušiny biomasy  $23,2 g \cdot l^{-1}$  se dosáhlo již za 8 hodin, zatímco v ostatních případech růst trval 10 až 12 hodin. Při kontrolní kultivaci bez stimulatoru růstu byla konečná koncentrace sušiny biomasy  $17,6 g \cdot l^{-1}$ .

Kvasničný autolyzát se při vsádkových kultivacích ověřoval v koncentracích 0,5 a  $5 g \cdot l^{-1}$ . Tyto přísadky kvasničného autolyzátu způsobily pokles přírůstku sušiny biomasy proti kontrole o 10 % (resp. 7 %). Negativní vliv přísadky kvasničného autolyzátu na výtěžnost biomasy nelze na základě sledovaných parametrů dost dobře vysvětlit.

Na základě výsledků dosažených v třepačkových a vsádkových kultivacích ve fermentoru byly pro ověření v kontinuální kultivaci vybrány přísadky  $5 g \cdot l^{-1}$ , jak pro zahuštěné melasové výpalky, tak pro kvasničný autolyzát. Průměrné hodnoty sledovaných veličin v kontinuálních kultivacích v ustáleném stavu včetně srovnávacího kontinuálního pokusu bez přísadky stimulatorů při různých zředovacích rychlostech  $D = 0,1$  až  $0,3 h^{-1}$  jsou v tabulce 3. Sledoval se nárůst sušiny biomasy, hodnota zbytkových redukujících látek, obsah hrubé bílkoviny, výtěžnost vztažená na spotřebované redukující látky a produktivita zařízení.

Tabulka 3. Průměrné hodnoty sledovaných veličin kontinuálních kultivací v ustáleném stavu

	Čas (h)	D ( $h^{-1}$ )	RL ( $g \cdot l^{-1}$ )	X ( $g \cdot l^{-1}$ )	B (%)	Yx/ΔRL (%)	P ( $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ )
O	0—80	0,108	5,7	16,5	51,6	85,7	1,78
	0—80	0,191	5,9	16,2	52,3	85,2	3,10
	0—80	0,296	6,0	15,9	53,5	84,1	4,72
MV	0—80	0,103	5,8	18,4	51,8	95,9	1,89
	0—80	0,186	6,0	18,8	52,6	99,1	3,49
	0—80	0,294	6,0	18,8	55,9	99,2	5,53
KA	0—80	0,110	5,6	14,4	55,4	74,4	1,58
	0—80	0,194	5,9	14,3	55,7	75,2	2,78
	0—80	0,297	6,1	14,2	56,0	75,0	4,21

Jak ukazuje souhrnná tabulka průměrných sledovaných hodnot kontinuálních kultivací v ustáleném stavu při různých zředovacích rychlostech ( $D = 0,1$  až  $0,3 h^{-1}$ ), zvyšuje se koncentrace sušiny biomasy (X) při přísadce melasových výpalků se stoupající zředovací rychlostí, oproti přísadce kvasničného autolyzátu, kde se snižuje. Obsah hrubé bílkoviny (B) stoupá se zvyšující se zředovací rychlostí a nejvyšší hodnoty dosahuje při přísadce kvasničného autolyzátu (56 %). Výtěžnost sušiny biomasy vztažená na spotřebované redukující látky ( $Yx/\Delta RL$ ) stoupá se zvyšující se zředovací rychlostí. Vysokých hodnot výtěžnosti se dosahuje proto, že se využívá i kyselina octová, obsažená v sulfitovém výluhu. Produktivita zařízení (P) stoupá ve všech případech se zvyšující se zředovací rychlostí.

Závěrem lze tedy říci, že výsledky práce prokázaly, že zahuštěné melasové lihovarské výpalky v koncentraci  $5 g \cdot l^{-1}$  mají stimulační účinek na tvorbu biomasy, příznivě ovlivňují výtěžnost kultivace, produktivitu systému a obsah hrubé bílkoviny v biomase u kvasinek *Candida utilis*, kultivovaných na sulfitových výluzích.

Stimulační účinek kvasničného autolyzátu v koncentraci  $5 g \cdot l^{-1}$  na tvorbu biomasy nebyl prokázán.

## Symboly

B — hrubá bílkovina (%)  
D — zředovací rychlost ( $h^{-1}$ )  
KA — kvasničný autolyzát ( $g \cdot l^{-1}$ )



KO	— kyselina octová [g.l <sup>-1</sup> ]
KM	— kyselina mravenčí [g.l <sup>-1</sup> ]
MV	— zahuštěné lihovarské melasové výpalky [g.l <sup>-1</sup> ]
O	— kontrolní kultivace bez přídavku stimulatoru růstu [—]
P	— produktivita zařízení [g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]
PR	— přídavek stimulatoru růstu [g.l <sup>-1</sup> ]
RL	— aktuální koncentrace redukujících látek [g.l <sup>-1</sup> ]
T	— teplota [°C]
TK	— těkavé kyseliny [g.l <sup>-1</sup> ]
Vg	— objemový průtok vzduchu [ml.min <sup>-1</sup> ]
VL	— objem náplně fermentoru [ml]
VVM	— objemový průtok vzduchu na jednotku objemu média za minutu [l.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
X	— průměrná koncentrace sušiny biomasy [g.l <sup>-1</sup> ]
Yx/Δ RL	— výtěžnost sušiny biomasy vztažená na spotřebované redukující látky [%]
n	— frekvence míchadla [s <sup>-1</sup> ]

## Literatura

- [1] RUTISHAUSER M.: Chemische Rundschau, 18 [4], 1945, s. 36
- [2] ROSENQIST S. O.: Svensk Popperstidn, 45, 1942, s. 566
- [3] YAMAGUCHI T.: Science Forest Products, 1, 1946, s. 31
- [4] KIHARA I. Y., SATO T., YAMAGUCHI T.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 22, 1948, s. 45
- [5] KVASNIKOV E. T.: Mikrobiol. Ž. [Kyjev], 38, 1976, s. 160
- [6] BUJAK S.: Acta Microbiol. Polon., 1, 1952, s. 65
- [7] SÖDERSTRÖM N. M. G., ROST H. F.: U. S. patent č. 2381 320 ze 7. 8. 1958
- [8] MBÚ ČSAV — VÚAnCH: Podklady pro proces — Krmené kvasnice ze sulfidových výluhů, Ca-bisulfidový způsob, 1980
- [9] MBÚ ČSAV — VÚAnCH: Podklady pro proces — Krmené kvasnice ze sulfidových výluhů, Mg-bisulfidový způsob, 1980
- [10] DAVÍDEK J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, Praha, 1977
- [11] Analysis of Spent Sulphite Liquor T 629 m-53, Official Methods of Technical Association of the Pulp and Paper Industry, TAPPI 1964

Lektoroval Ing. Jan Páca, CSc.

Kolín, F. - Krumphanzl, V. - Matějů, V.: Vliv přídavků růstových látek na tvorbu biomasy *Candida utilis* kultivované na sulfidových výluhách. Kvas. prům. 33, 1987, č. 6, s. 174—176.

Vliv přídavku melasových výpalků a kvasničného autolyzátu byl sledován při zředovacích rychlostech 0,1; 0,2; 0,3 h<sup>-1</sup>. Optimální koncentrace melasových výpalků je 5 g.l<sup>-1</sup>. Stimulační efekt kvasničného autolyzátu nebyl prokázán.

Колин Ф. - Крүмphanzl В. - Матею В.: Влияние добавления веществ роста на количество биомассы *Candida utilis*, культивированной на сульфитных отработанных щелках. Квас. прум. 33, 1987, № 6, стр. 174—176.

Влияние добавления барды мелассы и дрожжевого автолизата исследовано при скоростях добавления 0,1; 0,2; 0,3 ч<sup>-1</sup>. Оптимальная концентрация барды мелассы 5 г.л<sup>-1</sup>. Эффект стимуляции дрожжевого автолизата не подтвержден.

Kolín, F. - Krumphanzl, V. - Matějů, V.: The Effect of Growth Factors Addition upon Biomass Formation of *Candida utilis* during Growth on Spent Sulfite Liquor. Kvas. prům. 33, 1987, No. 6, pp. 174—176.

The Effect of stillage and yeast autolysate addition was studied. The dilution rates used were 0,1; 0,2; 0,3 h<sup>-1</sup>. The best results were obtained with stillage concentration 5 g.l<sup>-1</sup>. There were not found any stimulation effects with yeast autolysate.

Kolín, F. - Krumphanzl, V. - Matějů, V.: Einfluß der Wachstoffsatzugabe auf die Biomassebildung der Hefen *Candida utilis* kultivierten auf der Sulphitablauge. Kvas. prům. 33, 1987, Nr. 6, s. 174—176.

Es wurde der Einfluß von Melasseschlämme — und Hefeautolysatzugabe bei Verdünnungsraten von 0,1; 0,2 und 0,3 h<sup>-1</sup> studiert. Als optimale Melasseschlämmezugabe hat sich die Menge von 5,0 g.l<sup>-1</sup> erwiesen. Stimulierungseffekt des Hefeautolysats wurde nicht nachgewiesen.