

Vliv melasových výpalků na růst methylotrófních kvasinek na methanolu

579 663

RNDr. OLGA VOLFOVÁ, CSc. Ing. MIROSLAVA KMENTOVÁ, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: melasové výpalky, methylotrófní kvasinky, *Candida boidinii*, methanol, fermentace

Melasové výpalky lihovarské jsou běžně používány k výrobě krmných kvasnic. Jsou cennou surovinou. Obsahují kromě zdrojů uhlíku velké množství draslíku, asimilovatelný dusík a někdy i dostatečné množství hořčiku. Důležitý je především obsah růstových látek, které přecházejí do výpalků z řepné melasy a z kvasinek během fermentace v lihovaru, a dále obsah řady stopových prvků. Nevýhodou melasových výpalků jako suroviny pro výrobu krmných kvasničných bílkovin je nedostatek uhlíkatých látek, nevyrovnané složení a nutnost použití velkého množství kyselin k úpravě pH fermentační kapaliny. Proto se melasové výpalky většinou používají jako přísadka do média při výrobě kvasničných bílkovin ze sulfidových výluhů, ethanol-sulfidových směsí, z hydrolyzátů lignocelulózových materiálů aj., kde slouží jako stimulant růstu kvasinek, jako zdroj draslíku a popřípadě jako neutralizační prostředek [1, 2].

Protože o použití melasových výpalků při výrobě biomasy methylotrófních kvasinek z methanolu nenalézáme v odborné literatuře dostatek zmínek, bylo úkolem této práce prověřit vliv melasových lihovarských výpalků na růstové parametry a složení buněk našeho vyselektované kmene *Candida boidinii* 2 během růstu na methanolu.

MATERIÁL A METODY

Acidotolerantní kmen *Candida boidinii* 2 [3, 4] rostl na médiu [5], které bylo doplněno melasovými výpalky

v koncentraci 2 až 10 g/l. Zdrojem uhlíku byl methanol. Kultivace kmene probíhaly v 500 ml kultivačních baňkách na třepače nebo ve fermentorech o objemu 3 l nebo 75 l za konstantních kultivačních podmínek.

Methanol byl do média přidán buď najednou na počátku kultivace, nebo postupně v malých dávkách v závislosti na pH média nebo v závislosti na koncentraci rozpuštěného kyslíku v médiu. Vliv melasových výpalků byl studován jak v jednorázových kultivacích, tak v kontinuálních kultivacích v chemostatu.

pH média ve fermentorech bylo udržováno na konstantní výši 3,0 automatickým dávkováním methanol-amoniakální směsí, teplota byla 30 °C a koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu měřená kyslíkovou elektrodou byla udržována nad 25 % nasycení (pO_2).

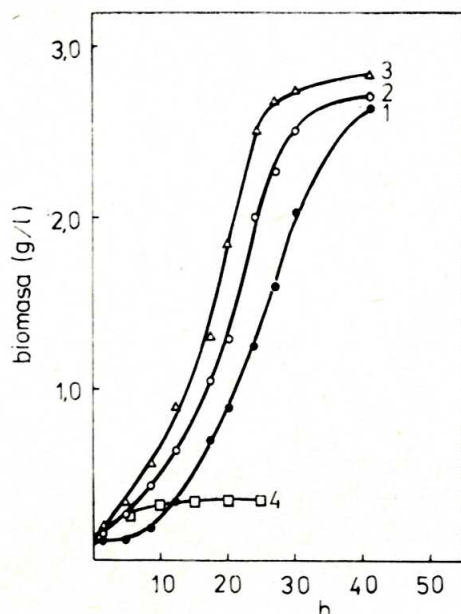
Analytické metody: suchá hmotnost buněk, koncentrace methanolu v médiu a obsah dusíkatých látek v buňkách (hrubé bílkoviny) byly stanoveny jako v předchozí práci [4].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vliv přísadky melasových výpalků (MV) k minerální půdě s 1 % methanolem na růst buněk *Candida boidinii* 2 v kultivačních baňkách je zobrazen na obr. 1. Jelikož MV obsahují 2 % nerozpustného podílu, který by mohl interferovat se stanovením suché hmotnosti buněk (podle ON 56 7245 obsahují 1 až 3,5 % nerozpustného podílu),

byly MV rozpuštěny ve známém podílu média a nerozpuštěný podíl odseparován.

Z obr. 1 je patrné, že přidavek MV k médiu s methanolem v koncentraci 2 g/l podstatně zvýší specifickou růstovou rychlost buněk (μ) především v počátečních fázích růstu. Přidavek MV do média prakticky odstranil lag fázi, která podle velikosti inokula na methanolu v kultivačních baňkách činí až 8 h. Růstová rychlost buněk v časovém úseku počátečních 10 h kultivace se zvýšila v průměru na dvojnásobek.



Obr. 1. Vliv melasových výpalků (MV) na růst buněk *C. boidinii* 2 na médiu s 1% methanolem

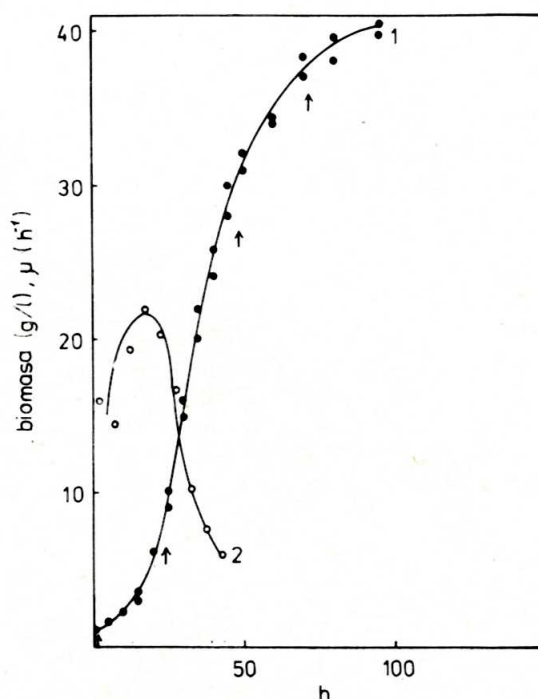
- 1 — růst buněk (suchá hmotnost) v médiu s kvasničným extraktem, s biotinem, s methanolem bez MV,
 - 2 — růst buněk v médiu (s kvasničným extraktem, s methanolem) s 0,2% MV,
 - 3 — růst buněk v médiu (s biotinem, s methanolem) s 0,2% MV,
 - 4 — růst buněk v médiu s 0,2% MV,
- osa x — doba fermentace v hodinách

Kromě zvýšené růstové rychlosti buněk jsme zaznamenali v přítomnosti MV i zvýšený výtěžnostní koeficient (Y) počítaný z přírůstku biomasy na spotřebovaný methanol. Toto zvýšení Y je však nízké a přibližně odpovídá přírůstku biomasy kvasinek ze samotných MV. Y počítaný na hmotnost samotných MV je 0,08 až 0,1 (g/g).

Jelikož médium [5] obsahuje kvasničný extrakt (fy. Oxoid) (100 mg/l) a biotin (10 μ g/l), zajímala nás záměna těchto růstových látek za MV. Srovnávací studie ukázaly, že lze s 0,2 % MV zhruba nahradit v médiu kvasničný extrakt, ale nikoli biotin. Přidavek biotinu pro dosažení μ_{\max} na médiu s methanolem je nezbytný (obr. 1).

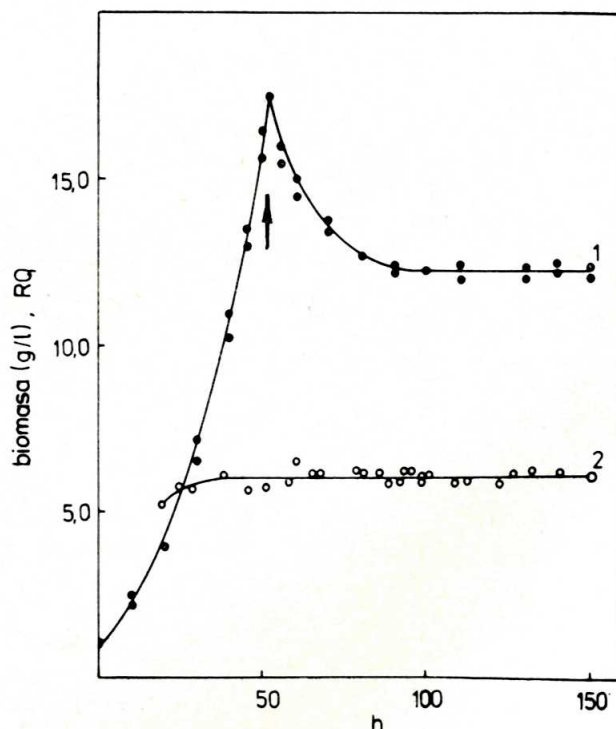
Přidavek MV do média s methanolem se pozitivně projevil i při růstu methylotrofních kvasinek ve fermentorech. Ve fermentorech byla používána koncentrace MV 2 až 2,5 g/l, která v baňkových pokusech jako nejnižší pozitivně ovlivňovala μ . V těchto pokusech za neoptimálnější považujeme režim kultivace při postupném dávkování MV. MV v koncentraci 2,5 g/l byly přidávány vždy jednou za 24 hodin až do konečné koncentrace 10 g/l. Tento režim podstatně zvýšil konečnou koncentraci buněk v médiu.

S výhodou byly použity MV i při kontinuálním způsobu kultivace v 75 l fermentoru (fa. Bioengineering, Švýcarsko) s pracovním objemem 40 l s dávkováním methanolu podle koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu při D 0,07 až 0,1 h^{-1} (obr. 3). Při těchto pokusech byly 0,2% MV obsaženy v zásobním médiu. Růst buněk za těchto podmínek v chemostatu byl stabilní s maximálním Y na methanol 0,4 (g/g). Růstové parametry buněk



Obr. 2. Vliv postupného dávkování melasových výpalků na růst *C. boidinii* 2 na médiu s methanolem

- 1 — suchá hmotnost buněk,
 - 2 — růstová rychlost $\mu \times 100$,
- osa x — doba fermentace v hodinách,
šipky označují přidavek MV



Obr. 3. Růst *C. boidinii* 2 v 75 l fermentoru na methanolu s 0,2 % melasových výpalků

- 1 — suchá hmotnost buněk,
 - 2 — respirační koeficient $RQ \times 10$ (O_2 a CO_2 měřeny na výstupu plynů z fermentoru analyzátozem Hartmann & Braun),
- osa x — doba fermentace v hodinách,
šipka označuje zahájení kontinuální kultivace při $D = 0,1 h^{-1}$

I obsah hrubých bílkovin v buňkách z obou způsobů kultivace ve fermentorech jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1. Růstové parametry buněk a obsah buněčných bílkovin v jednorázovém a kontinuálním způsobu kultivace

Kultivace	Y [g/g]	X [g/l]	μ (h ⁻¹) D (h ⁻¹) [*]	Bílkoviny [g/g]
jednorázová chemostat	0,37	40	0,11	0,5
	0,40	12	0,10 [*]	0,55

Závěrem lze konstatovat, že lihovarské melasové výpalky jsou vhodným stimulatorem růstu kvasinek i v případě methylotrofních organismů během růstu na methanolu. Odstraňují lag fázi, zvyšují růstovou rychlost buněk na methanolu, umožňují dosáhnout vysoké koncentrace buněk v médiu a stabilizují fermentační proces [6]. Získaná biomasa je bohatá na bílkoviny.

Literatura

- [1] Pat. ČSSR AO 203413
- [2] Pat. ČSSR AO 174431
- [3] Pat. ČSSR PV 7618 87
- [4] VOLFOVÁ, O. - KMENTOVÁ, M. - KYSLÍKOVÁ, E.: Kvas. prům. 34, 1988, s. 330
- [5] VOLFOVÁ, O. - PILÁT, P.: Folia Microbiol., 28, 1974, s. 249
- [6] Pat. ČSSR PV 3400 88

Lektoroval Doc. Ing. D. Hařama, CSc.

Volfová, O. - Kmentová, M.: Vliv melasových výpalků na růst methylotrofních kvasinek na methanolu. Kvas. prům., 35, 1989, č. 6, s. 167—169.

Studoval se vliv přidavku lihovarských melasových výpalků na růst acidotolerantního kmene *Candida boidinii* 2 v médiu s methanolem jako zdrojem uhlíku. Sledovaný rozsah přidavku melasových výpalků byl 2 až 10 g/l. Pokusy provedené v 500 ml baňkách a fermentorech o objemu 3 a 75 l prokázaly, že přidavek lihovarských melasových výpalků odstraňuje lag fázi, zvýšil růstovou rychlost buněk na methanolu, umožnil dosáhnout vysoké koncentrace buněk v médiu a stabilizoval fermentační proces. Získaná biomasa byla bohatá na bílkoviny.

Вольфова, О. - Кментова, М.: Влияние паточной барды на рост метилотрофных дрожжей на метаноле. Квас. прум., 35, 1989, № 6, стр. 167—169.

Исследовалось влияние добавки паточной барды спиртного производства на рост acidотолерантного штамма *Candida boidinii* 2 в среде с метанолом как источником углерода. Исследуемый объем добавки паточной барды составлял 2—10 г/л. Эксперименты, проведенные в колбах емкостью 500 мл и ферменторах объемом 3—75 л доказали, что добавка паточной барды спиртного производства устраняет лаг-фазу, повышает скорость роста клеток на метаноле, дает возможность добиться высокой концентрации клеток в среде и стабилизирует процесс ферментации. Полученная биомасса была богата белковыми веществами.

Volřová, O. - Kmentová, M.: Effect of Distiller's Slops on Growth of Methylotrophic Yeasts on Methanol. Kvas. prům., 35, 1989, No. 6, pp. 167—169.

Effect of distiller's slops addition on growth of acidotolerant strain *Candida boidinii* 2 in medium with methanol as a carbon source was tested. The addition of distiller's slops was in a range from 2 to 10 g/l. Experiments were performed in 500 ml flasks and in the fermenters of 3 and 75 l. The results proved that the addition of distiller's slops eliminates the lag-phase, increases the cell growth rate on methanol, enables to achieve a high biomass concentration in the medium and stabilizes the fermentation process. The biomass has high content of proteins.

Volřová, O. - Kmentová, M.: Einfluß der Melasseschlempe auf das Wachstum der methylotrophen Hefen auf Methanol. Kvas. prům., 35, 1989, Nr. 6, S. 167—169.

Es wurde der Einfluß der Zugabe von Brennerei-Melasseschlempe auf das Wachstum des acidotoleranten Stammes *Candida boidinii* 2 im Medium mit Methanol als Kohlenstoffquelle studiert. Die Zugabe der Melasseschlempe wurde im Bereich von 2 bis 10 g/l verfolgt. Die in 500-ml-Kolben und 3 bzw. 75-Liter-Fermentoren durchgeführte Versuche bestätigten, daß die Zugabe der Melasseschlempe die Lag-Phase beseitigt, die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen auf Methanol erhöht, die Erreichung hoher Konzentrationen der Zellen im Medium ermöglicht und zur Stabilisierung des gesamten Fermentationsprozesses beiträgt. Die erzielte Biomasse war eiweißreich.