

skúmaviek, z ktorých každá môže byť použiteľná na 1 až 4 transformačné reakcie. Z buniek hostiteľského kmeňa sa pripraví protoplasty vyššie uvedeným postupom a resuspendujú v 0,2 ml roztoku 1,2 mol. dm⁻³ sorbitolu v 0,01 mol. dm⁻³ CaCl₂. K suspenzii sa pridá 0,1 až 1 µg plazmidovej DNA nesúcej zabudovaný gén, zmes sa inkubuje 15 min pri laboratórnej teplote. Potom sa pridá 1,8 ml roztoku PEG 4000 (PEG 400 g, CaCl₂ 1,47 g, TRIS . HCl 1,2 g, pH 8,0 v 1 dm³ vody), suspenzia sa premieša a nechá stáť 5 min pri laboratórnej teplote. Protoplasty sú potom oddelené centrifugáciou (5 min pri 1000 g), sediment sa resuspenduje v 0,2 ml roztoku sorbitolu v CaCl₂ a k suspenzii sa pridá 0,1 ml sorbitolu v kvasničnom extrakte (sorbitol 218,6 g, glukóza 20 g, kvasničný extrakt 10 g v 1 dm³ vody). Po 30 min inkubácii pri 30 °C sa k suspenzii pridá 0,3 ml roztoku sorbitolu, 0,15 ml vzniknutej suspenzie sa napipetuje do skúmaviek s 10 ml rozvarného regeneračného agaru o teplote 44 °C a po premiešaní vyleje na povrch selektívneho osmoticky stabilizovaného minimálneho agaru, na ktorom regenerujú a rastú len transformanty obsahujúce plazmidovú DNA. Po 3 až 5 dňoch sa vyhodnotí frekvencia transformácie a vzniknuté kolónie sa podrobia genetickej a biochemickej analýze. Popísaná technika je v našom laboratóriu využívaná pre zavedenie génov kódujúcich rezistenciu voči mednatým iónom do vhodných aplikačne významných kmeňov vinných kvasiniek. O získaných poznatkoch budeme referovať v niektorom z budúcich čísel nášho časopisu.

Literatúra

- [1] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., 34, 1988, s. 293.
- [2] MICHALČÁKOVÁ, S., et al.: Kvas. prům., 36, 1990, s. 6.
- [3] MALÍK, F., VOLLEK, V., HRONČEK, J., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., 35, 1989 s. 141.
- [4] SPENCER, J. T. F., SPENCER, D. M.: Ann. Rev. Microbiol., 37, 1983, s. 121.
- [5] KOVÁČOVÁ, V.: Genetická analýza mikroorganizmov I. Tetrádová analýza kvasiniek. Bratislava, Skripta PFUK 1983.
- [6] KOVÁČOVÁ, V.: 1989, nepublikované výsledky.
- [7] KOVÁČ, L., BEDNÁROVÁ, H., GREKSÁK, M.: Biochim. Biophys. Acta, 133, 1968, s. 32.
- [8] SULO, P.: Štúdium prenosu mitochondriálneho genómu, fúzie a transformácie pomocou cytoplazmatických mutantov *S. cerevisiae*. (Kandidátska dizertačná práca). ÚFHZ SAV Ivánka pri Dunaji 1987.
- [9] SULO, P., MICHALČÁKOVÁ, S.: Construction of wine yeasts with killer properties. In: Zborník Interbiotech 88, Bratislava 1988, s. 106.
- [10] ESSER, K., KÄMPER, J.: Process Biochem., 23, 1988, s. 36.
- [11] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E., ŠUBÍK, J.: Laboratórium odboru I. Genetika mikroorganizmov a základy génových manipulácií. Bratislava, Skripta SVŠT 1989.
- [12] SAUNDERS, V. A., SAUNDERS, J. R.: Microbial Genetics Applied to Biotechnology. 1. vyd. London, Croom Helm 1987.
- [13] VRANÁ, D. (ed.): Kvasinky ve výzkumu a praxi, 1. vyd. Academia, Praha 1986.

Lektoroval doc. Ing. F. Malík, CSc.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Šlachtenie vinných kvasiniek. III. Používané techniky. Kvas. prům., 36, 1990, č. 7, s. 196—199.

Článok je prehľadom metód používaných pri šľachtení kvasiniek (selekcia, indukovaná mutagenéza, kríženie, fúzia protoplastov, technika rekombinantnej DNA) a možností ich aplikácie pri získavaní nových kmeňov vhodných pre vinárske použitie. Detailne sú charakterizované predovšetkým selekčné techniky umožňujúce získať kmene rezistentné k medi a etanolu, ale tiež postupy mutačného šľachtenia a fúzie protoplastov vedúce k príprave respiračne deficitných mutantov a smrtiacich vinných kvasiniek.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Селекция винных дрожжей. III. Применяемые способы. Квас. прум. 36, 1990, № 7, стр. 196—199.

Статья приводит обзор по методам, применяемым при селекции дрожжей (селекция, индуцированный мутагенез, скрещивание, фузия протопластов, способ рекомбинативной ДНА) и по возможностям их применения при получении новых штаммов, подходящих для целей виноделия. Подробно характеризуются прежде всего способы селекции, позволяющие получить штаммы, устойчивые в отношении к меди и этанолу, а также способы мутационной селекции и фузии протопластов, приводящие к получению респираторнодефицитных мутантов и смертоносных винных дрожжей.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Improvement of Wine-Making Yeasts. III. Techniques Used. Kvas. prům., 36, 1990, No. 7, pp. 196—199.

The methods for yeast improvements (selection, induced mutagenesis, hybridization, protoplast fusion, technique of recombinant DNA) and their applications for an obtaining of new strains suitable in a wine-making are outlined in the article. The selection techniques permitting to obtain strains resistant to copper and ethanol and the mutation procedures and the protoplast fusions resulting in a preparation of respiratory deficient mutants and the killers of wine-making yeasts are discussed in details.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Züchtung der Weinhefen. III. Angewandte Techniken. Kvas. prům., 36, 1990, Nr. 7, S. 196—199.

Der Artikel bringt eine Übersicht der bei der Züchtung der Hefen angewandten Methoden (Selektion, induzierte Mutagenese, Kreuzung, Fusion der Protoplaste, Technik der DNA-Rekombination) und befaßt sich mit den Möglichkeiten ihrer Applikation bei der Gewinnung neuer Stämme für die Weinindustrie. Detailliert werden vor allem die Selektionstechniken charakterisiert, die zu Kupfer- und Äthanol-resistenten Stämmen führen; es werden aber auch die Verfahren der Mutationszüchtung und der Protoplasten-Fusion behandelt, die zur Gewinnung Respirations-defizienter Mutanten und Killer-Weinhefen führen.

Morfologické změny kvasinek *Torulopsis ethanolitolerans* při kontinuální kultivaci

579.663.12

Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, CSc., Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha, Ing. JITKA ŘEŽÁBKOVÁ, Pražské pivovary, s. p., Praha

Klíčová slova: morfologické změny, kontinuální kultivace, limit kyslíku, poměr délky a šířky, *Torulopsis ethanolitolerans*.

ÚVOD

Morfologické změny při růstu mikroorganizmů v podmínkách kontinuální kultivace byly popsány již v prvních studiích této kultivační metody, a to jak u bakteriálních, tak u kvasinkových kultur. Prodlužování buněk *Saccharomyces cerevisiae* rostoucích na melase pozoroval Beran [1], který stanovil, že poměr délky k šířce

1,46 oválných buněk na začátku kultivace se poměrně rychle zvýšil na hodnotu 2,1. Podobné změny zjistil při všech zkoušených růstových rychlostech a při různém složení melasového média. Herbert [2] stanovil v kultuře *Enterobacter aerogenes*, že se vzrůstající růstovou rychlostí (od 0,1 do 0,9 h⁻¹) se buňky zvětšovaly, hlavně v délce, rostla průměrná hmota buněk a současně se značně zvyšoval obsah RNK. Příčinou prodlužování kva-

Tabulka 1. Výsledky sledování morfologie kvasinek, obsah N-látek v kvasinkách a výtěžnost a produktivita kontinuálních kultivací

Pokus č.	Doba kultivace (h)	O ₂ v médiu (%)	d/š	V (μm ³)	N (%)	Y (g·g ⁻¹)	(g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
1	72	0	2,48 → 4,50	47 → 33	51,3	0,70	3,8
2	43	0	2,70 → 3,93	51 → 40	47,0	0,73	3,4
3*	30 (73)	0	3,93	40	48,2	0,73	3,2
4	68	0	2,49 → 4,32	51 → 32	50,9	0,70	3,1
5	44	0	2,41 → 4,22	53 → 36	52,5	0,75	4,0
6	47	0	2,65 → 4,35	48 → 32	52,0	0,76	4,0
7	70	4–6	3,15	52	58,1	0,78	3,1
8**	233	3–5	3,32	54	54,3	0,74	3,0
	145 (378)	6–8	3,07	61	56,0	0,73	2,9
	120 (498)	12–14	2,58	65	59,4	0,68	2,1
	53 (551)	0,3–0,5	3,36	31	58,2	0,75	3,8

* pokus č. 3 navazoval na předcházející, v závorce celková doba kontinuální kultivace

** koncentrace kyslíku byla měněna v průběhu kultivace, v závorce celková doba kultivace

d/š — poměr délky k šířce buňky

V — objem buňky

N — dusíkaté látky v kvasničné sušině

Y — výtěžnost sušiny z dodaného ethanolu

p — produktivita

sinek *S. cerevisiae* v kontinuální kultuře se blíže zabývali Brown a Hough [3], kteří zjistili závislost mezi změnou tvaru buněk a obsahem dusíku v médiu. Při limitaci růstu dusíkem se kvasinky prodlužovaly a při dodání dusíku se jejich tvar změnil na původní oválný. Uvedené změny byly zaznamenány při dvou odlišných zředovacích rychlostech (0,05 a 0,22 h⁻¹).

Zmenšování objemu buněk *Torulopsis utilis* popsali Button a Garver [4], kteří uvedli, že při snížení růstové rychlosti z 0,40 na 0,15 h⁻¹ se zmenšil objem buněk z 60 na 41 μm³. Podrobnou studii objemových změn kvasinek *Candida utilis* publikovali Brown a Rose [5]. Kultivace byly vedeny za různých podmínek: v limitu substrátu (glukosa) nebo dusíku, při teplotách 30, 25, 20 a 15 °C a při růstové rychlosti od 0,35 do 0,05 h⁻¹. Buňky, rostoucí při různých růstových rychlostech při limitaci dusíkem, zvětšovaly svůj objem při snižování teploty pod 30 °C, v médiu s glukosovou limitací tyto změny nenastaly. Z dosažených výsledků byl mimo jiné odvozen přímý vztah mezi zvětšováním objemu buněk a stoupajícím obsahem RNK a proteinu v buňkách.

Vraná a Beran [6] studovali morfologii kvasinek *S. cerevisiae* a *C. utilis* v kontinuální kultivaci při růstových rychlostech 0,05, 0,1, 0,25 a 0,35 h⁻¹. Se zvyšováním rychlosti růstu se v kultuře *S. cerevisiae* zvětšoval objem dceřiných buněk, ale velikost mateřských buněk se neměnila. Při kultivaci kvasinek *C. utilis* se zvyšoval se stoupající růstovou rychlostí objem jak dceřiných, tak mateřských buněk. Autoři prokázali, že čím více se blíží růstová rychlost maximální růstové rychlosti, tím více jsou dceřiné buňky fyziologicky vyspělejší.

Hill a Robinson [7] stanovili, že při kontinuální kultivaci kvasinek *S. cerevisiae* dochází k drastickým morfologickým změnám. Největší změny, resp. prodlužování buněk, charakterizované hodnotami poměru délky a šířky 4,14 až 5,32 a snížení objemu kvasinek na 37,9 až 30,3 μm³, byly zjištěny především při středních růstových rychlostech (0,1–0,3 h⁻¹). Při nižší a vyšší růstové rychlosti byl poměr délky k šířce menší než 2,0 a objem buněk větší než 50 μm³. K těmto změnám, souvisejícím s růstovou rychlostí, nedocházelo při batch kultivaci, což dokumentovaly výsledky získané v batch pokusech při růstové rychlosti 0,31, resp. 0,1 h⁻¹, při nichž hodnota délkošířkového poměru byla 1,15, resp. 1,08 a objem buněk 62, resp. 55 μm³.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Kontinuální kultivace kvasinek *Torulopsis ethanolitolerans*

V řadě kontinuálních kultivací kultury *Torulopsis ethanolitolerans* v médiu s ethanolovým substrátem byl studován vliv různých podmínek na hodnoty ekonomických parametrů a na jakost finálního produktu, krmných kvasnic. Kultivace byly vedeny ve skleněném 3 l fermentoru s 2,3 l média. Základní syntetické médium bylo připravováno ředěním zásobních roztoků minerálních živin

a stopových prvků podle očekávané produkce kvasničné biomasy. Jako substrát byl používán syntetický ethanol s obsahem 91,53 % obj. abs. ethanolu, pH bylo regulováno na hodnotu 4,0 amoniakovou vodou, sloužící zároveň jako hlavní zdroj dusíku a teplota kultivace byla udržována na 37 °C. Kultivační pokusy probíhaly při zředovací rychlosti 0,22 h⁻¹ většinou v limitu kyslíku, pouze dva pokusy v limitu substrátu. Podrobný popis zařízení, složení základního média a médií s přísadami různých biostimulátorů, uspořádání kontinuálních procesů, analytické metody a další náležitosti jsou podrobně popsány v jiné práci [11].

Sledování morfologie kvasničných buněk

Součástí sledování a hodnocení pokusů byla mikroskopická kontrola kvasničné kultury, prováděné v průběhu kultivací v intervalech 12 a 24 hodin, popř. v kratších. Byl zaznamenáván tvar a uspořádání buněk, měřeny rozměry min. 50 buněk a stanoveno procentní zastoupení pučících a mrtvých buněk min. v 50 políčkách Bürkerovy komůrky po obarvení preparátu methylenovou modří. Z rozměrů buněk byl počítán objem za předpokladu, že buňky *T. ethanolitolerans* jsou podobné, jako kvasinky *C. utilis*, rotujícím elipsoidům [8]. Přehled hodnot stanovených měření rozměrů buněk spolu s hlavními výsledky kultivačních pokusů je uveden v tabulce 1.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vliv podmínek kontinuální kultivace na morfologii kvasinek

Kultivace č. 1 až 7 byly krátkodobé kontinuální pokusy v syntetickém médiu (č. 1) a v médiích s přísadami různých biostimulátorů (č. 2 až 6), prováděné v limitu kyslíku. Kultivace č. 7 byla vedena v syntetickém médiu v limitu substrátu, stejně jako dlouhodobý pokus č. 8, ve kterém byla měněna koncentrace rozpuštěného kyslíku. Pro všechny kultivace je společným znakem změna tvaru a rozměrů kvasničných buněk. Původně oválné, mírně protáhlé buňky se během kultivace prodlužovaly a v pokusech č. 1 až 6 se současně výrazně ztenčovaly. Délkošířkový poměr se téměř plynule s dobou kultivace zvyšoval z 2,41 až 2,70 na 3,9 až 4,5 a současně se měnil objem buněk, který z hodnot 47 až 53 μm³, zjištěných na začátku pokusů č. 1 až 6, postupně klesal na 32 až 40 μm³; plynulé změny rozměrů buněk jsou v tabulce naznačeny šipkou. Výjimkou z uvedeného jsou hodnoty délkošířkového poměru a objemu buněk, stanovené v nejkratším pokusu č. 3. Tato kultivace však nezačala v nultě hodně, ale navázala na předcházející (č. 2) ve 43. hodině, kdy byla provedena změna složení média.

Při kultivaci č. 7, v které kvasinky rostly na rozdíl od předcházejících pokusů v limitu substrátu, se buňky rovněž prodlužily, avšak změny v šířce byly mnohem mírnější a také změny v objemu byly menší. Další roz-

díl od pokusů vedených v limitu kyslíku byl v tom, že pozorované morfologické změny neprobíhaly v závislosti na době kultivace, ale měnily se nepravidelně; v tabulce jsou proto uvedeny průměrné hodnoty — pokusy č. 7 a 8.

Při dlouhodobé kontinuální kultivaci č. 8 (551 hodin) v syntetickém médiu se substrátovou limitací byla v určitých časových odstupuach zvyšována koncentrace rozpuštěného kyslíku od 3 až 5 % do 12 až 14 % a v posledních 53 hodinách byl obsah kyslíku prudce snížen, téměř k limitu, na 0,3 až 0,5 % O_2 . Poměr délky k šířce a objem buněk se měnil podobně jako v pokusu č. 7, tzn., že hodnoty kolísaly v užším rozmezí bez závislosti na době kultivace. Přitom průměrné hodnoty z jednotlivých časových úseků kultivace, charakterizovaných různou koncentrací rozpuštěného kyslíku, vykazovaly závislost na této koncentraci. Se stoupajícím obsahem kyslíku klesal délkošířkový poměr, kvasinky byly méně protáhlé a zvětšoval se jejich objem. V poslední fázi, kdy byla kultura převedena téměř do limitu kyslíku, nastala rychlá změna tvaru buněk, které se opět prodloužily a ztenčily a objem klesl na $31 \mu m^3$.

Se změnou tvaru buněk byl v pokusech v limitu kyslíku (č. 1 až 6) pozorován zhruba od konce prvního dne kultivace větší výskyt buněk, které zůstávaly po vypuštění neoddělené. Buňky vytvářely dvojice stejně velkých jedinců, které nenesly žádné známky dalšího pučení. Podobný jev popsaly ve svých pracích Pozmogova a Medvěděva [9] a Pozmogova et al. [10] při kultivaci kvasinek *C. utilis* při teplotách 40 a 41,4 °C. Řetízující kvasinky ani myceliální tvary buněk nebyly pozorovány ani nedocházelo ke shlukování kvasinek. Množství pučících buněk se v krátkodobých pokusech pohybovalo mezi 40 až 53 % a počet živých kvasinek byl většinou vyšší než 90 %.

Při dlouhodobé kontinuální kultivaci č. 8, vedené v limitu substrátu, byl průměrný počet pučících, resp. živých buněk 51,3, resp. 96,6 %. Myceliální útvary ani shlukování kvasničných buněk nebylo pozorováno, ale vedle protáhlých buněk produkčních kvasinek *T. ethanolitolerans* se vyskytovaly buňky odlišného tvaru a velikosti, kulaté, drobnější a občas řetízující oválné, menší buňky. Tyto odlišné buňky se nacházely především v horní zpěněné vrstvě kvasničného média a zavedením vrchního odtahu bylo jejich množství značně zredukováno. Izolace a pozdější identifikace ukázala, že tyto kvasinky patřily ke kontaminaci a jejich rozvoj byl pravděpodobně umožněn přítomností rozpuštěného kyslíku v médiu.

Porovnání morfologických změn kvasničných buněk s výsledky kontinuálních kultivací

V pokusech č. 1 až 6, které probíhaly v limitu kyslíku v médiích různého složení, byly dosaženy různé hodnoty ekonomických parametrů v závislosti na přidávaných biostimulátorech, přičemž morfologie kvasinek se měnila ve všech těchto pokusech stejným způsobem. Buňky se protahovaly a ztenčovaly a jejich objem se zmenšoval úměrně s dobou kultivace a konečné hodnoty délkošířkového poměru a objemu nejsou v relaci ani s obsahem dusíkatých látek v kvasničné biomase ani s výtěžností nebo produktivitou.

Jiné souvislosti vyplynuly z výsledků pokusu č. 8, ve kterém byly kvasinky kultivované při různé koncentraci rozpuštěného kyslíku v médiu. Jak morfologie buněk, tak obsah dusíkatých látek, výtěžnost a produktivita se měnily úměrně s koncentrací kyslíku a nezávisle na době kultivace. Se snižující se koncentrací kyslíku se snižoval objem kvasinek a snižoval se také obsah dusíkatých látek a naopak hodnoty ekonomických parametrů kultivace vykazovaly vzestup. Zvyšování obsahu dusíkatých látek v kvasničné biomase se zvyšováním objemu buněk stanovil Brown a Rose [5], kteří zjistili, že toto zvýšení bylo způsobeno především vzrůstem množství RNK a jen malým zvýšením obsahu proteinu. U kvasinek *T. ethanolitolerans* se obsah RNK výrazně nemění, ale zvyšoval se obsah bílkovin podle Barnsteina [11].

ZÁVĚR

Z našich výsledků vyplývá konstatování, že morfo-

logické změny kvasinek *T. ethanolitolerans*, pozorované v kontinuálních kulturách a projevující se prodlužováním a ztenčováním buněk a snižováním objemu, jsou způsobeny podmínkami růstu v limitu kyslíku. Ekonomické parametry kultivace, vyjádřené výtěžností a produktivitou, nejsou morfologickými změnami ovlivňovány. Jinak je tomu u obsahu dusíkatých látek v kvasničné biomase, jejichž tvorba je zjevně závislá na koncentraci kyslíku v médiu a tím je i v korelaci s morfologickými změnami kvasničných buněk.

Literatura

- [1] BERAN, K.: Continuous flow cultivation of bakers yeast on beat molasses wort. In Málek I.: Continuous cultivation of microorganisms. A symposium. ČSAV, Praha 1978.
- [2] HERBERT, D.: Continuous culture of microorganisms, some theoretical aspects. In Málek I.: Continuous cultivation of microorganisms. A symposium, ČSAV, 1978.
- [3] BROWN, C. M., HOUGH, J. S.: Nature, **206**, 1985, s. 676.
- [4] BUTTON, D. K., GARVER, J. C.: J. Gen. Microbiol., **43**, 1963, s. 195.
- [5] BROWN, C. M., ROSE, A. H.: J. Bacter., **97**, 1969, s. 261.
- [6] VRANA, D., BERAN, K.: Mikrobiologija, **XLVI**, 1977, s. 161.
- [7] HILL, G. A., ROBINSON, C. W.: Biotechnol. Letts., **10**, 1988, s. 815.
- [8] MITCHISON, J. M.: Exp. Cell Res., **15**, 1958, s. 215.
- [9] POZMOGOVA, I. N., MEDVĚDEVA, G. A.: Mikrobiologija, **XLVII**, 1978, s. 534.
- [10] POZMOGOVA, I. N., ŠULGOVSKAJA, E. M., MEDVĚDEVA, G. A., ANDREJEVA, E. A.: Mikrobiologija, **XLVII**, 1978, s. 306.
- [11] ŠESTÁKOVÁ, M., RYBÁŘOVÁ, J., RUT, M., ŠTOS, F.: Technologie velkovýroby krmných kvasnic ze syntetického etanolu s produkcí 100 kg/rok. [Zpráva] VÚKPS, Praha, 1982.

Lektorovala V. Kurzová, prom. biol.

Rybářová, J. - Řežábková, J.: Morfologické změny kvasinek *Torulopsis ethanolitolerans* při kontinuální kultivaci. Kvas. prům., **36**, 1990, č. 7, s. 199—202.

Morfologické změny kvasničné kultury *Torulopsis ethanolitolerans*, které byly pozorovány při kontinuální kultivaci, jsou ovlivňovány přítomností rozpuštěného kyslíku v médiu. Největší změny, projevující se prodlužováním a ztenčováním buněk a zmenšováním jejich objemu, byly zaznamenány při kultivacích v podmínkách limitace kyslíkem. Při zvyšování koncentrace kyslíku v médiu nabývaly kvasinky tvar a koncentry, které jsou obvyklé při batch kultivacích. Byla stanovena souvislost mezi morfologickými změnami a obsahem dusíkatých látek v kvasničné biomase.

Рыбаржова, И. - Ржежабкова, И.: Морфологические изменения дрожжей *Torulopsis ethanolitolerans* при непрерывном культивировании. Квас. прум., **36**, 1990, № 7, стр. 199—202.

Морфологические изменения дрожжевой культуры *Torulopsis ethanolitolerans*, которые наблюдались при непрерывном культивировании, подвергались влиянию растворенного кислорода в среде. Наибольшие изменения, проявляющиеся в удлинении и утончении клеток и в уменьшении их объема были отмечены при культивациях в условиях лимитирования кислородом. При постепенном повышении концентрации кислорода в среде дрожжи приобретали форму и размер, какие встречаются при batch культивациях. Была определена связь между морфологическими изменениями и содержанием азотистых веществ в дрожжевой биомассе.

Rybářová, J. - Řežábková, J.: Morphological Changes of *Torulopsis ethanolitolerans* During Continuous Culture. Kvas. prům., **36**, 1990, No. 7, pp. 199—202.

The morphological changes of the yeast population *Torulopsis ethanolitolerans* that were observed during a continuous culture result from changes in oxygen concentrations in the medium. The highest changes were observed under conditions of oxygen limitation. These changes manifest themselves in the cell elongation and the lowering of the cell volume. Eliminating the oxygen limitation the yeast cells obtain their typical

form and size as in batch cultures. The plot between the morphological changes and the content of nitrogen compounds in the cell biomass was proved.

Rybářová, J. - Řežábková, J.: Morphologische Änderungen der Hefen *Torulopsis ethanolitolerans* bei kontinuierlicher Kultivation. Kvas. prům. 36, 1990, Nr. 7, S. 199—202.

Die morphologischen Änderungen der Hefekultur *Torulopsis ethanolitolerans*, die bei der kontinuierlichen Kultivation beobachtet wurden, werden durch die

Anwesenheit des im Medium gelösten Sauerstoffs beeinflusst. Die größten Änderungen, die sich durch die Verlängerung und Verengung der Zellen und durch die Verminderung ihres Volumens bemerkbar machen, wurden bei Kultivationen mit Sauerstoff-Limitation beobachtet. Bei der Erhöhung der Sauerstoff-Konzentration im Medium nahmen die Hefen Formen und Dimensionen an, welche bei den Batch-Kultivationen üblich sind. Es wurde der Zusammenhang zwischen den morphologischen Änderungen und dem Gehalt der stickstoffhaltigen Substanzen in der Hefebiomasse ermittelt.

Fermentačná výroba ethanolu zo škrobnatých surovín

664.22 634.2 663.12 663.5

I. Literárny prehľad

Ing. ZUZANA CIESAROVÁ, Ing. DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, CSc., Doc. Ing. LUDOVÍT POLÍVKA, CSc.

Katedra biochemickej technológie CHTF SVŠT, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: etanol, škrob, kvasinky, fermentácia škrobu, hydrolýza škrobu.

ÚVOD

Vzhľadom k tomu, že surovinové zdroje pre rozvoj biochemických technológií sú limitované, je veľmi dôležité hľadať obnoviteľné suroviny, ktoré sú prakticky nevyčerpatelné. Práve tieto zdroje, ich výber a selekcia pre efektívnu výrobu, sa závažnou mierou podieľajú na rozvoji liehovarníckeho priemyslu. Medzi takéto zdroje patria aj suroviny rastlinného pôvodu s obsahom škrobu.

1. FÁZY FERMENTAČNÉHO SPÔSOBU VÝROBY ETANOLU

Výrobu ethanolu fermentačnou cestou možno rozdeliť na tri fázy [1]:

1. Biochemická fáza — zahŕňa úpravu a hydrolýzu suroviny na fermentovateľný substrát (stekucovanie a scukorňovanie obilného škrobu, mletie a enzýmová hydrolýza kukurice atď.).
2. Metabolická alebo fermentačná fáza — proces alkoholového kvasenia glukózy v kvasinkách prebiehajúci Embden-Meyerhoffovou dráhou. Teoreticky môže vzniknúť 0,51 g ethanolu z 1 g glukózy, pričom výťažky v praxi dosahujú 90—95 % teoretickej hodnoty.
3. Fáza pofermentačnej úpravy produktu (filtrácia, destilácia, riedenie atď.).

2. PREDFERMENTAČNÁ ÚPRAVA ŠKROBU AMYLOLYTICKÝMI PRÍPRAVKAMI

Výroba priemyselného a palivového ethanolu zo škrobnatých substrátov vyžaduje pred samotnou fermentáciou glukózy na etanol úpravu suroviny, a to [2]:

- stekutenie škrobu pomocou endoamylázy, (α -amyláza, E.C. 3.3.1.1),
- hydrolýzu (scukorňenie) stekutého produktu (dextrínov) s nízkou molekulovou hmotnosťou na glukózu pomocou glucoamylázy (E.C. 3.2.1.3).

V priemyselnej produkcii alkoholu zo škrobnatých materiálov sú vysoké výrobné náklady spôsobené veľkou spotrebou energie pri tepelnom spracovaní suroviny, sterilizácii a destilácii produktu. Napr. bežne používaná metóda výroby alkoholu z kukuričných zŕn zahŕňa tepelné spracovanie záparsy pri teplote 140 °C v jednorázovom a asi 180 °C v kontinuálnom procese [3]. Vysoká teplota spôsobuje zmenu štruktúry zŕn a zlepšuje tým pôsobenie stekucujúcich a scukorňujúcich enzýmov na škrob a zároveň prebieha sterilizácia záparsy. Lee [4] a Mikuni [5] uvádzajú, že spotreba energie pri tepelnom spracovaní surového škrobu (energia na zahriatie a udržanie teploty 120 °C počas 2 h) predstavuje asi 40 % celkovej energie potrebnej pri alkoholovej fermentácii. Zníženie ener-

getickej náročnosti procesu výroby alkoholu zo škrobnatých materiálov sa stalo predmetom výskumu v mnohých laboratóriách.

Známa je extrúzna metóda úpravy škrobu krátkodobým pôsobením vysokej teploty v špeciálnych extrudéroch. Takto upravený škrob nevyžaduje enzýmovú hydrolýzu a je použiteľný ako substrát pre etanolovú fermentáciu [6, 7].

V Japonsku bola úspešne overená alkoholová fermentácia na zemiakovom škrobe bez tepelného spracovania s použitím Black-koji amylázy získanej z *Aspergillus niger* [8] v laboratórnom meradle. V prevádzkovom meradle však pokusy neboli úspešné, vyskytovala sa bakteriálna kontaminácia. Ako substrát bola tiež použitá kukurica a ryža.

Ueda a kol. [9, 10] vyvinuli proces výroby ethanolu zo škrobnatých surovín (kassava, zemiaky). Na sacharifikáciu použili glucoamylázu z *Aspergillus niger* a *Rhizopus species*. Dosiahnuté výťažky ethanolu sa pohybovali od 82,3 do 99,6 % teoretického výťažku. Použitie čerstvé zemiakové hľuzy alebo kassava rezky neboli suchým škrobovým materiálom, celá fermentácia trvala okolo 5 dní.

Svendsky a kol. [11] premývali surový škrob roztokom 0,2 % H_2SO_4 za účelom sterilizácie a použili maceračný enzým Cellulosin (Ueda Chem. Industry Co. Japan) na zvýšenie pôsobenia glucoamylázy z *Rhizopus niveus* pri 25 °C. Cellulosin je enzýmový preparát získaný z *A. niger* obsahujúci ako hlavnú zložku pektín-depolymerázu (E.C. 3.2.1.15) a taktiež nízku aktivitu pektín-esterázy a iných hemicelulolytických enzýmov. Po 5 dňoch bola fermentácia ukončená s výťažkom ethanolu 74 %.

Chemapec Inc. v New Yorku vyvinul proces výroby bezvodého ethanolu zo škrobu bez jeho predchádzajúcej tepelnej úpravy, ktorý vyžaduje približne polovičné náklady oproti klasickému postupu. Poloprevádzka bola realizovaná vo Švajčiarsku [12]. Proces sa odlišuje od klasickej výroby ethanolu tým, že pred procesom sa odstráni veľa neškrobového materiálu v zŕnách (zárodky, tuky aj.) a surovina je spracovávaná použitím špeciálneho enzýmu, ktorý nie je bližšie definovaný. Požiadavky na energiu v tomto procese sú iba 4,2 MJ · dm⁻³ bezvodého ethanolu oproti 16,7—23,3 MJ · dm⁻³ v klasickej fermentačnom procese. Výťažok ethanolu je 9,8 dm³ z 25,4 kg kukurice.

Alltech Inc. [12] použil v procese kombináciu enzýmov — alkoholáza I. z *Bacillus subtilis* a alkoholáza II. z *Aspergillus niger* alebo *Rhizopus niveus*. Proces môže prebiehať kontinuálne ALCON-fermentáciou [12].

Iný prístup k hydrolýze surového škrobu na fermentovateľné sacharidy zvolili Azhar a Hamdy [13]. Hydrolyzovali zemiaky pri vysokej teplote (154 °C), nízkej koncentrácii HCl (0,034 mol dm⁻³) a za pomerne krátky čas (24 min) získali maximum redukujúcich sacharidov. Neprinieslo to však očakávané výsledky v etanolovej fer-