

Význam draslíku při výrobě krmných ethanolových kvasnic

Ing. MIROSLAV RUT, Dr. JAROMÍR ADÁMEK, Ing. JIŘÍ KARNET, Ing. FRANTIŠEK ŠTROS, CSc., Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, Praha

V sušině kvasinek je obvykle obsaženo okolo 2 % draslíku, který tvoří podstatnou (25–30 %) část popela. V řadě biogenních prvků sestavených podle kvantitativního zastoupení stojí draslík dokonce před fosforem, hned za uhlíkem, kyslíkem, dusíkem a vodíkem. Již z tohoto prvního pohledu je zřejmý mimořádný význam tohoto prvku při syntéze biomasy [1].

O nezbytnosti draslíku pro růst kvasinek byl podán důkaz již v roce 1934 *Lasnitzkim* a *Szörenym* [2], později *Atkinem* [3]. I když funkce draslíku není ještě komplexně prozkoumána a zhodnocena, v literatuře lze najít velké množství prací, které se zabývají jednotlivými vlastnostmi draslíku. Tvrdí se [4], že draslík má velký význam pro energetický a uhlíkový metabolismus mikroorganismů.

Množství draslíku v živném médiu do značné míry ovlivňuje účinnost využití esenciálních živin, např. glukózy a kyslíku [5, 6]. Záleží na tom, zda proces probíhá v aerobních nebo anaerobních podmínkách [7].

Při růstu kvasinek probíhá intenzívní, obousměrný transport draslíku, přičemž do buněk přechází draslík aktivním transportem, jen když mají buňky k dispozici zdroj uhlíku. Například u pekařských kvasnic může být koncentrační gradient až 1 : 1000 [8]. Při vyčerpání zdroje uhlíku se příjem draslíku zastaví a naopak se draslík vyplavuje do prostředí [9].

Potřeba draslíku závisí také na druhu uhlíkatého zdroje. Pokud je zdroj uhlíku kyselý, nebo tvoří větší množství kyselých meziproduktů, je spotřeba draslíku větší než např. při kultivaci na glukóze [10].

Bylo dokázáno, že draslík plní v buňkách mikroorganismů několik funkcí. Například vedle vápníku a sodíku ovlivňuje složení protoplastů a chrání integritu buněk před lyzí [11].

Významnou úlohu plní draslík při aktivaci některých enzymů, při udržování vnitrobuněčného pH a optimálního osmotického tlaku. Při aktivaci enzymů se draslík uplatňuje především u enzymů spojených s metabolismem

mem fosforu [6, 10, 12, 13, 14], oxidací glukózy [15], u enzymů cytochromového systému v mitochondriích [16], ribosomů [17], a enzymů souvisejících se zabudováním acetátu do Krebova cyklu [18]. Při nedostatku draslíku je inhibován transport anorganického fosfátu membránou [19] a snižuje se rychlosť syntézy bílkovin [20]. Celkovým projevem nedostatku draslíku je snížení rozmnožování a změny ve složení biomasy [21, 22].

Velmi důležitou úlohu hraje draslík při regulaci vnitrobuněčného pH kvasinek. Při utilizaci zdroje uhlíku vstupuje do buňky K^+ a současně vystupuje H^+ a organický anion do okolního prostředí [23, 24].

Z uvedeného přehledu vlastností draslíku při syntéze biomasy vyplývá, že draslík může mít vliv i na ekonomiku výroby krmných kvasnic. Protože se v současné době výroba krmných ethanolových kvasnic v Seliko Kojetín orientuje na levný náhradní zdroj draslíku, zabývali jsme se dynamikou spotřeby draslíku za laboratorních a provozních podmínek.

MATERIÁLY A METODIKÁ

Mikroorganismus

Provozní kmen, který se používá při výrobě krmných ethanolových kvasnic, je *Torulopsis ethanolitolerans RIFIS 25*, který je udržován ve sbírce mikroorganismů VÚKPS a Československé sbírce kvasinek (CCY) v Chebském ústavu SAV v Bratislavě.

Inokulace živných půd byla prováděna pastou, získanou odstředěním narostlé kultury na kalové odstředivce Westfalia LWA 205. Pasta obsahuje asi 22 % sušiny a uchovává se maximálně 1 týden při 5 °C.

Fermentory a způsoby kultivace

Laboratorní kultivace se prováděly na 30 l fermentoru s náplní 15 litrů a přestupem kyslíku 160 mmol $\cdot h^{-1}$.

Technika jednorázové přizivované kultivace a regulace byla provedena obvyklým způsobem [25]. Přizivovalo se ethanolem a amoniakovou vodou, ostatní součásti půdy se pro celou kultivaci přidávaly najednou na začátku. Přizivování ethanolem a amoniakovou vodou se provádělo podle změn pH a kultivace byla ukončena po spotřebování 587 ml amoniakové směsi (450 ml etanolu 90 % obj., 135 ml amoniakové vody 24% a 2 ml odpěnovacího oleje).

Základní množství amonných iontů bylo nastaveno přidáním 1 g síranu amonného na každý liter živného média.

Provozní kultivace je kontinuální a udržováním koncentrace ethanolu v rozmezí 0,1–0,3 % obj., s přizivováním amoniakovou vodou podle pH a jednohodinovými přídavky roztoku solí (K, P, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn). Ze systému odtéká kvasničné mléko 15%, odseparované médium se vrací zpět do fermentoru.

Fermentor 200 m³ s náplní 80 m³ má přestup 150 až 160 mmol O₂/m³ · h, zřeďovací rychlosť 0,15–0,18 h⁻¹.

Měření koncentrace draslíku

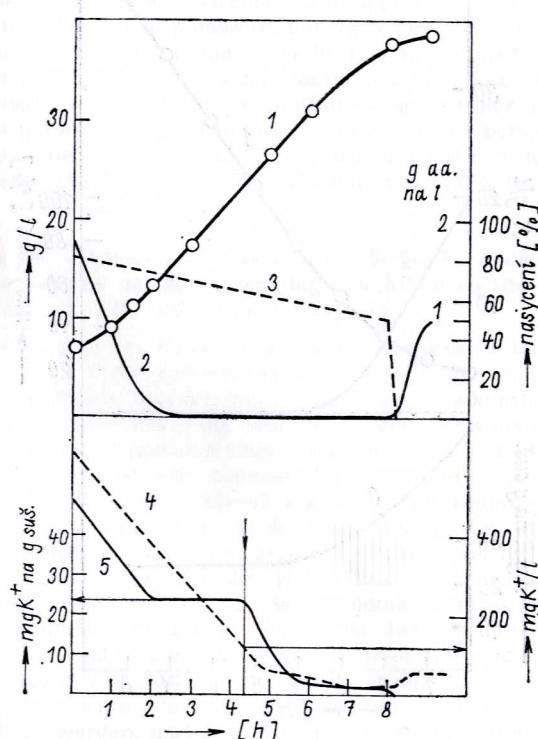
Pro měření koncentrace K⁺ byla použita draslíková iontově selektivní elektroda (Crytur-Monokrystaly Turnov) v kombinaci s kalomelovou elektrodou. Elektrody byly vloženy přímo do kultivačního média. Potenciál elektrod byl snímán regulačním pH-metrem LF-RPH (VD ČSAV) a registrován na liniovém zapisovači EZ 4100. Měření se provádělo při konstantní teplotě a pH.

Údaje byly korigovány podle obsahu NH₄⁺. Ostatní složky živného média měření K⁺ významně neovlivňují.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Již při prvním měření dynamiky spotřeby K⁺ při kul-

tivacích bylo pozorováno, že spotřeba draslíku je nerovnoměrná. Typický příklad měření spotřeby draslíku při jednorázové, ethanolem a amoniakem přizivované kultivace je na obrázku 1. Veškerý draslík byl přidán na začátku kultivace. Z grafu je zřejmé, že rychlosť spotřeby draslíku klesá v závislosti na aktuální koncentraci draslíku v médiu. Kvasinky při velkém přebytku K⁺ přijímají velké množství draslíku, až 45 mg K⁺ na 1 g syntézované biomasy.



Obr. 1. Laboratorní jednorázová přizivovaná kultivace (veškerý draslík na začátku)

1 . . . růstová křivka (g/l) pro t = 0 až 2 h, x = 6,6 e, pro t > 2 až 6 h, X = 4,63 t + 3,4, 2 . . . stupeň nasycení rozpusteným kyslíkem (%), 3 . . . obsah etanolu (g a a/l), 4 . . . koncentrace draslíku v médiu (mg K/l), 5 . . . měrná spotřeba draslíku (mg K/g suš.)

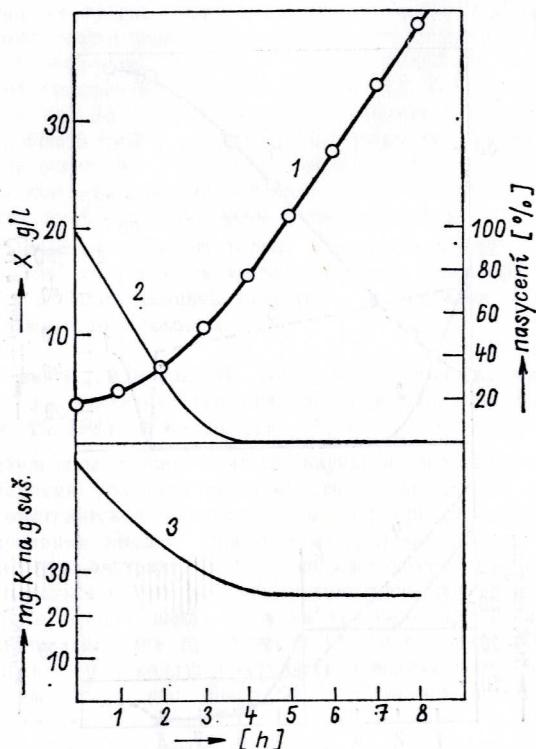
Při koncentraci 150–350 mg K⁺/l spotřebují kvasinky draslíku asi 2–3 % své suché hmotnosti, což je množství, se kterým se běžně počítá při syntéze biomasy kvasinek.

Vysvětlení pro vysokou spotřebu 25–50 mg K⁺/g suš. a normální (23–24 mg K⁺/g suš.) může být vysak také v tom, že interval vysoké spotřeby draslíku souvisí s přebytkem kyslíku a interval normální spotřeby K⁺ souvisí s vyčerpáním kyslíku z média [9]. Koncentrace draslíku v médiu okolo 100 mg/l je kritická a při nižších koncentracích klesá růstová rychlosť. Je to zřejmé z růstové křivky na obr. 1, ve které logaritmická fáze růstu končí s limitem kyslíku a lineární růst končí mezi 5.–6. hodinou kultivace. V tomto období poklesl průměrný obsah draslíku v buňkách pod 2 %.

Po vyčerpání zdroje uhlíku se část draslíku uvolňuje z biomasy zpět do média, a to i tehdy, když byl průměrný obsah draslíku velmi nízký (1,47 % K⁺ v suš.).

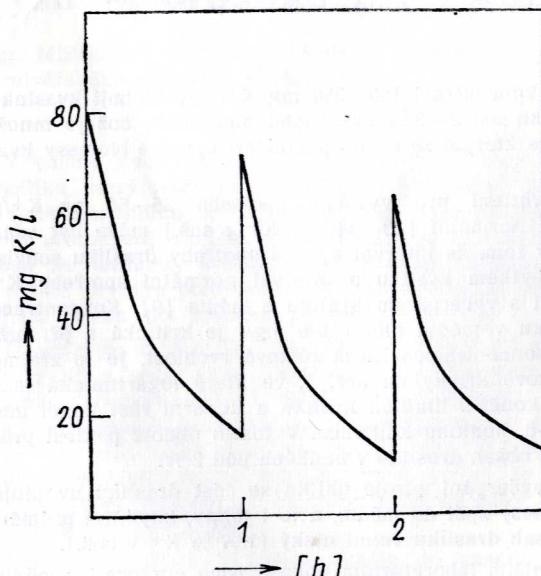
V dalším laboratorním pokusu jsme udržovali v médiu koncentraci na 100 mg K⁺/l. Výsledky jsou znázorněny na obr. 2. V porovnání s předcházejícím pokusem se v exponenciální fázi zvýšila specifická růstová rychlosť

z 0,327 na 0,369 h⁻¹ a ve fázi lineárního růstu vzrostla produktivita z 4,63 na 5,78 g/h. Zajímavé je prokazatelné zvýšení výtěžnosti z 69,5 na 78,0 %. Toto zvýšení výtěžnosti současně znamená snížení specifické spotřeby kyslíku z 1,687 na 1,359 g O₂/g suš. a přesně vysvětluje zvýšenou produktivitu.



Obr. 2. Laboratorní jednorázová přiživovaná kultivace (draslík regulován na 100 mg K⁺ na l)

1...růstová křivka (g/l) pro t 0 až 3 h X = 3,5 e, pro t 4 až 8 h X = 5,78 t - 7,54, 2... stupeň nasycení rozpuštěným kyslíkem (%), 3... měrná spotřeba draslíku (mg K/g suš.)



Obr. 3. Provozní přiživovaná kontinuální kultivace s dávkovaním živných solí po 1 hodině

Specifická spotřeba draslíku se ve fázi lineárního růstu ustálila prakticky na stejné hodnotě (24 mg K/g suš.) jako v předcházejícím pokusu v období nelimitovaném draslíkem. Toto množství je zřejmě obvyklé a optimální pro daný kmen a kultivaci v limitu kyslíku.

Při provozní kontinuální kultivaci se zdroj draslíku (fosforečnan draselny nebo lihovarské melasové výpalky) dávkujeme periodicky v jednohodinových intervalech. Na obr. 3 jsou znázorneny změny koncentrace K⁺ v médiu.

Po přidání zdroje draslíku se zvýší koncentrace na 60—80 mg K⁺/l a během jedné hodiny klesne na 10 až 15 mg K⁺/l. Průběh spotřeby draslíku v tomto intervalu má obdobný charakter jako v laboratorních podmínkách, ale absolutní hodnota odpovídá poměru růstu limitovaného draslíkem. Provozní kultivace probíhá tedy v porovnání s laboratorní v nepříznivých podmínkách. Vzhledem k tomu, že se z jiných technologických důvodů udržuje zředovací rychlosť na 0,16—0,18 h⁻¹ neprojevuje se nízká koncentrace draslíku na růstové rychlosti. Při vyšší zředovací rychlosti by bylo nutné udržovat koncentraci draslíku okolo 100 mg K⁺/l.

Z uvedené práce vyplývá, že je třeba úloze draslíku věnovat pozornost, zvláště při intenzifikaci kultivačních procesů. Selektivní elektrody Crytur lze ve spojení s vhodným milivoltmetrem využít pro měření koncentrace draslíku v médiu. Problematice měření draslíku při aerobních kultivacích bude věnován další článek.

Literatura

- [1] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky, SVTL, Bratislava, 1957.
- [2] LASNITZKI, A., SZÖRENJI, E.: Biochem. J., **28**, 1934, s. 1678 až 1683.
- [3] ATKIN, L., GRAY, P. P., MOSES, W., FEINSTEIN, M.: Wallerstein Labs. Commun., **12**, 1949, s. 153—170.
- [4] VÝSLOUCH, V. A., GRIGORJEVA, S. P., VOROBJEVA, G. I.: Mikrobiol. prom., **11**, 1975, s. 16—14.
- [5] ALKING, G., STEKENBURG, A., TEMPEST, D. W.: Archiv Microbiol., **113**, 1977, s. 65—72.
- [6] ALKING, H., TEMPEST, D. W.: Archiv Microbiol., **108**, 1976, s. 117—123.
- [7] HORSHAK, R.: Untersuchungen zum Mineralstoffwechsel der Hefe, Diss. Univ. Jena, 1960.
- [8] ROSE, A. H., HARRISON, J. S.: The Yeasts, Vol. 2, Academic Press, London and New York, 1971.
- [9] STROHBACH, G.: Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abh., **119**, 1965, s. 612 až 625.
- [10] ALKING, H., VAN HOLST, J. V., TEMPEST, D. W.: Archiv Microbiol., **115**, 1977, s. 79—84.
- [11] RIEMESMA, J. C.: J. Pharmacy and Pharmacol., **18**, 1966, s. 657—663.
- [12] VALAVIČJUS, JU. M.: Sb. Trudy A. N. Litevskoj SSR, **2** (43), 1967.
- [13] SCHMIDT, G., HECHT, L., THANHAUSER, S.: J. Biol. Chem., **178**, 1949, s. 733—742.
- [14] CLARK, J. A.: MC. LEOD, R. A.: J. Biol. Chem., **211**, 1954, s. 541.
- [15] LATZKO, E.: Z. Pflanzennernähr., Düng., Bodenkunde, **111**, 1965, s. 38.
- [16] VEČER, A. S.: Osnovy fizičeskoj biochimiji, Minsk, Vysšaja Škola, 1966.
- [17] DICKS, J. M., TEMPEST, D. W.: J. Gen. Microbiol., **45**, 1966 s. 547—557.
- [18] RINK, H.: 3. Symposium Technische Mikrobiologie, Berlin, 1973.
- [19] WEIDEN, P. L., EPSTEIN, W., SCHULZ, S. G.: J. Gen. Physiol., **50**, 1967, s. 1641—1661.
- [20] ENNIS, H. L., KIEVITT, K. D., PETERSON, R. F.: Biochim. et Biophys. Acta, **294**, 1973, s. 87—93.
- [21] ŠVEC, V. N., OGORODOVNIKOVA, A. N., SLJUSARENKO, T. P.: Izv. vysš. učeb. zavedenij písč. technol., **1**, 1977, s. 46—50.
- [22] PEČULIS, JU. P., TIMUKENE, G. I., ŽUTAYTAS, A. P.: Prikl. biochim. mikrobiol., **1**, 1978, s. 54—59.
- [23] ROTHSCHILD, A., ENNS, L. H.: J. Cell Comp. Physiol., **28**, 1946, s. 231—252.
- [24] RINK, H.: IV. International Symposium on Yeasts, Wien, 1974.
- [25] ADAMEK, L., ŠESTÁKOVÁ, M., RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F.: Kvas. prům., **27**, 1981, s. 278—280.

Rut, M. - Adámek, L. - Karnet, J. - Štros, F.: Význam draslíku při výrobě krmných ethanolových kvasnic.
Kvas. prům., 29, 1983, č. 8, s. 172—175.

Byla zkoumána dynamika spotřeby draslíku při kultivaci krmných kvasinek *Torulopsis ethanolicolerans* na syntetickém ethanolu. Při přetržitém dávkování draslíku vznikají velké výkyvy v koncentraci draslíku. Na začátku dávkovacího intervalu přijímají kvasinky zvýšené množství draslíku (25—45 mg K⁺ na 1 g sušiny kvasinek) a na konci intervalu klesá koncentrace draslíku pod optimální hranici a spotřeba draslíku kvasinkami je menší než 20 mg/g. Optimální koncentraci draslíku v médiu okolo 100 mg/l je nejlépe udržovat plynulým dávkováním draslíku při nepřetržitém měření iontově selektivní draslíkovou elektrodou. Přitom se zvýší výtěžnost Y_{X/S} z 0,695 na 0,780 na plně syntetickém médiu.

Рут, М., Адамек, Л., Карнет И., Штросс, Ф.: Значение калия при производстве кормовых дрожжей на базе этанола. Квас. прум., 29, 1983, № 8, стр. 172—175.

Исследована динамика потребления калия при культивировании кормовых дрожжей *Torulopsis ethanolicolerans* на синтетическом этаноле. При прерывном дозировании калия возникают значительные колебания в концентрации калия. В начале интервала дозирования дрожжи принимают повышенное количество калия (25—45 мг K⁺ на 1 г сухого вещества), в конце интервала концентрация калия падает ниже оптимального предела и потребление калия дрожжами меньше чем 20 мг/г. Оптимальная концентрация калия в среде составляет около 100 мг/л, ее можно поддерживать путем непрерывного дозирования калия при непрерывном измерении при помощи ионного селективного калиевого электрода. При этом выход повышается от 0,695 до 0,780 в полнے синтетической среде.

Rut, M. - Adámek, L. - Karnet, J. - Štros, F.: Significance

of K⁺ Ions in Foeder Yeast Production from Ethanol.
Kvas. prům. 29, 1983, No. 8, p. 172—175.

Dynamics of potassium uptake during a culture of foeder yeast *Torulopsis ethanolicolerans* on synthetic ethanol were studied. Using a periodical dosage of potassium large variances in its concentration were observed. At the start of the dosage interval the yeasts accumulate an increased quantity of potassium (25—45 mg K⁺ per 1 g of cell dry weight). At the end of the interval the potassium concentration decreased under the optimal limit and potassium uptake is below 20 mg . g⁻¹. The optimum potassium concentration in the medium of about 100 mg . l⁻¹ can be maintained by a continuous potassium dosage. For a continuous measurements of the potassium concentration, the ion selective potassium electrode can be used. This procedure permits to increase the biomass yield coefficient from 0.695 to 0.780 in a synthetic medium.

Rut, M. - Adámek, L. - Karnet, J. - Štros, F.: Bedeutung des Kaliums bei der Erzeugung von Äthanol-Futterhefe.
Kvas. prům. 29, 1983, Nr. 8, S. 172—175.

Es wurde die Dynamik des Kaliumverbrauchs bei der Kultivation der Futterhefen *Torulopsis ethanolicolerans* auf synthetischem Äthanol studiert. Bei nichtkontinuierlicher Kaliumdosierung wurden grosse Schwankungen in der Kaliumkonzentration festgestellt. Am Anfang des Dosierungsintervalls nehmen die Hefen eine erhöhte Kaliummenge auf (25—45 mg K⁺ pro g Hefetrockensubstanz), wogegen zu Ende des Intervalls die Kaliumkonzentration unter die optimale Grenze absinkt und der Kaliumverbrauch der Hefen niedrigere Werte als 20 mg/g aufweist. Die optimale Kaliumkonzentration von ungefähr 100 mg/l kann am besten durch kontinuierliche Kaliumdosierung bei durchlaufender Messung mittels Ion-selektiver Kalium-Elektrode eingehalten werden. Dadurch kann die Ausbeute Y_{X/S} von 0,695 auf 0,780 erhöht werden, und zwar auf einem volkommen synthetischen Medium.