

K otázce mikrobiální syntézy tuku pomocí kvasinky *Rhodotorula gracilis*

ROMAN PRAUS, JIŘÍ PROTIVA a JOSEF DYR, Katedra kvasné chemie a technologie při VŠChT v Praze

665.3 : 596.8

Pro mikrobiální syntesu tuku ve zvětšeném výrobním měřítku se v posledních letech s výhodou používá kvasinka *Rhodotorula gracilis* (1, 2, 3). Její kultivační i ekonomické přednosti proti jiným mikroorganismům, používaným pro výrobu tuku dříve, byly ověřeny řadou prací a netřeba je znovu zdůrazňovat. U nás byly rovněž v uplynulých deseti letech provedeny četné základní studie o biosyntéze tuku z uhlohydrátů pomocí tohoto mikroorganismu, většinou však jsou biochemického charakteru (4, 5, 6). Jen jediná práce se pokusila řešit otázku vhodné suroviny pro případnou realisaci produkce tuku rodotorulou v provozním měřítku (7). Problém volby suroviny pro výrobu tuku mikrobiální syntesou je komplikovanější než výběr surovin pro většinu ostatních fermentací. Kromě samozřejmého požadavku, aby surovina byla levná, je nutno přihlížet k obsahu asimilovatelného cukru a dusíku, k povaze dusíkatého zdroje a poměru dusíku k asimilovatelnému uhlíku, neboť pouze při zachování zcela určitého poměru obou těchto živin lze tuk vyrábět ekonomicky. U nás nejběžnější surovinou používanou v řadě kvasných procesů je řepná melasa, která se však sama pro kultivaci *Rhodotoruly gracilis* za účelem produkce tuku a karotenoidů příliš nehodí. Přičinou obtíží kultivace rodotoruly na melase je kvalita a množství přítomného asimilovatelného dusíku, který je tvořen převážně dusíkem aminokyselin a jen v malé míře dusíkem amoniakálním. Melasa prakticky nedovoluje provádět ekonomicky přijatelným způsobem nutnou regulaci obsahu N a C.

Odpadní suroviny, jako např. předhydrolysáty dřeva a sulfitové výluhy, nejsou dosud pro výrobu tuku plně zhodnoceny a možnosti jejich využití se v současné době prověřují. Obrátili jsme proto pozornost na jiné zdroje cukru, které by neobsahovaly v tak velké míře jako melasa látky rušící biosyntézu tuku a karotenoidů rodotorulou. Velmi vhodnou surovинu jsme našli v odpadu při výrobě glukosy ze škrobu. Zahuštěné louhy po kryštalisaci glukosy přicházejí na trh pod komerčním názvem „Dextroner“.

V této práci předkládáme některé výsledky pokusů o produkci tuku a provitaminů na fermentačních půdách s dextronerem.

Pokusná část

Použité metody

Použili jsme kmen kvasinky *Rhodotorula gracilis* (Rennerfelt), získaný od prof. Lundina a uchovávaný od roku 1948 ve sbírce katedry kvasné chemie a technologie při VŠChT v Praze. Vhodnou selekcí získal tento kmen schopnost tvorit téměř 75 % tuku v sušině při kultivaci na čistě minerálních médiích, obsahujících glukosu (6). Byl uchováván střídavou kultivací na sladinových a minerálních půdách, ztužených agarem. Pro kultivaci na dextronerových půdách byly použity plně vyuvinuté a intensivně pigmentované zásobní kulturny na sladinovém agaru, ne starší než šest týdnů.

Dextroner je pevný produkt s obsahem asi 10 až 15 % vody a 60 až 70 % redukujících látek. Chromatografickým rozborom vodného roztoku dextroneru bylo zjištěno, že obsahuje hlavně glukosu, maltosu a velmi malé

množství pentos. Část sušiny je vytvořena dextrinu, degradovanými do různého stupně. *Rhodotorula gracilis* je schopna bez adaptace asimilovat asi $\frac{1}{8}$ přítomných redukujících cukrů. Obsah dusíku v dextroneru je tak nepatrný, že jej lze při kalkulaci poměru N/C zanedbat.

V řadě předběžných třepačkových pokusů jsme se zaměřili jednak na zjištění, zda je třeba přizivovat dextronerové půdy nějakou přirozenou směsí růstových látek, jednak na zjištění vhodného dusíkatého zdroje. V prvním případě výsledky ukázaly, že produkce tuku se poněkud zvýší a kvasná doba zkrátí přidavkem 0,5 % kukuřičného extraktu (50 % sušiny). Jelikož má kukuřičný extrakt dobrý vliv na fysiologický stav kvasinek (zejména v růstové fázi značně zvyšuje tvorbu buněčné hmoty na rozdíl od půd bez kukuřičného extraktu), rozhodli jsme se přidávat všechn kukuřičný extrakt do půdy určené ke kultivaci zákvasu, jehož objem byl vždy $\frac{1}{10}$ objemu fermentační půdy. Anorganický dusík jsme do fermentační půdy přidávali jako směs diamonfosfátu a dusičnanu draselného v poměru 1 : 8. Tím jsme se vyhnuli velkým výkyvům pH během kvašení, k nimž dochází při použití jak samotného diamonfosfátu, tak síranu nebo dusičnanu amonného. Potřebný fosfor jsme doplňovali ve formě K_2HPO_4 při přípravě půdy a stejně množství fosfátu ještě asi ve 20. hodině kvašení, když již byl vyčerpán veškerý dusík z média a pH vystoupilo přibližně na 6,5. Po přidavku fosforečnanu se pH živného prostředí udržuje na stejně hodnotě až do konce kvašení.

Dextroner, kterého bylo přidáváno 6 %, tj. asi 4 % redukujících cukrů, byl nejprve rozpustěn v menším množství vody, povařen a potom dále doředěn.

Živné půdy měly toto složení:

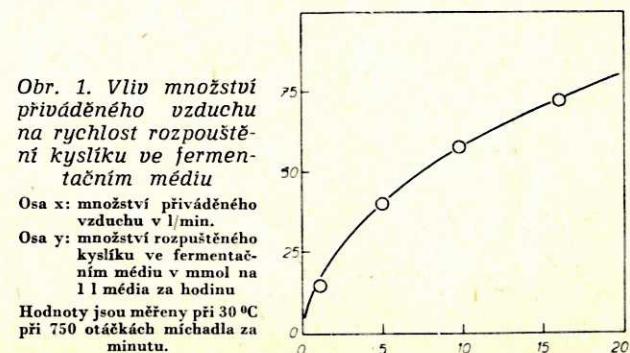
	půda pro zákvasy	produkční půda
dextroner	6%	6%
K_2HPO_4	0,1%	0,1%
$(NH_4)_2HPO_4$	0,015%	0,015%
KNO_3	0,15%	0,15%
kukuřičný extrakt (50 % sušiny)	0,5%	—
N/C	1/78	1/78
pH	6,0	6,0

Fermentační zařízení

Inokulum bylo pěstováno v Erlenmayerových baňkách na 100 ml na třepacím stroji s 90 kmity za minutu (rychlosť rozpouštění kyslíku byla 15 mmol O_2 /1 fermentační půdy/h), při 29 až 30 °C.

Vlastní fermentace byla prováděna v laboratorním fermentačním tanku na 20 l z nerezového materiálu. Tank byl opatřen turbinovým míchadlem a vzdušnicí tryskou (8).

Na obr. 1 jsou uvedeny hodnoty naměřené pro 750 otáček míchadla za minutu při 30 °C. Pro rozbíjení pěny jsme použili mechanického zařízení.

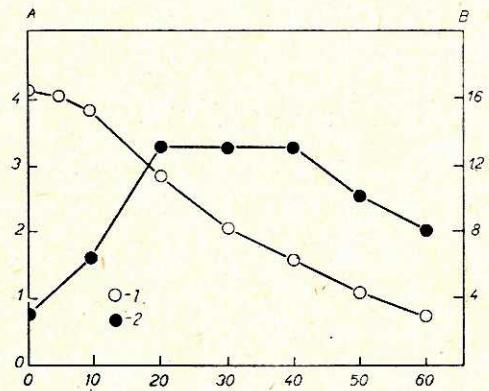


Analytické metody

Chromatografie cukru byla provedena podle Greena a Stonea [10]. Obsah redukujících látek v živém prostředí byl stanoven podle Schoorla [11] a vyjadřován jako glukosa. Sušina kvasinek byla stanovována vážkově, stanovení obsahu tuku a karotenoidů v kvasinkách bylo popsáno již dříve [6, 12]. Analýza tuku byla provedena usančními metodami [13]. Ke zjištění rychlosti rozpuštění kyslíku ve fermentační půdě jsme použili sificktanové metody, popsáne Cooperem a spolupracovníky [9].

Výsledky**1. Produkce tuku na dextronerové půdě**

Zákvaz pro pokusy byl kultivován 24 h a poté převeden do fermentačního tanku, obsahujícího



Obr. 2. Schéma větrání při fermentaci *Rh. gracilis* v laboratorním tanku

Osa x: hodiny fermentace. Osa y: A — obsah glukosy v médiu v %, B — množství přiváděného vzduchu v l/min.
1 — glukosa v médiu, 2 — množství vzduchu

sterilní dextronerovou půdu, vytemperovanou na 30 °C. Intensita větrání byla přizpůsobena rychlosti spotřeby glukosy, tak jak byla známa z kultivací na třepacím stroji. Celá doba fermentace byla rozdělena na tři stejné časové úseky. Předpokládali jsme, že v prvním a třetím časovém úseku bude kvasinkami spotřebováno vždy asi 25 % obsahu glukosy, kdežto ve druhém časovém úseku, kdy metabolické pochody probíhají nejintenzivněji, 50 % glukosy obsažené ve fermentační půdě. Ačkoliv z manometrických měření a rozboru sušiny

kvasinky *Rhodotorula gracilis* byly již dříve odvozeny approximativní rovnice pro aerobní přeměnu uhlohydrátů na tuk [6], uvažovali jsme při výpočtu větrání úplnou oxydaci glukosy na CO₂ a H₂O. Dále jsme předpokládali, že při použití systému vzdušnění je využito 10 % přiváděného kyslíku. Tímto způsobem vypočtené množství vzduchu bylo kromě toho v prvním časovém úseku rozloženo v souhlase s růstovou křivkou kvasinky. Schéma větrání je znázorněno na obr. 2. Z průběhu křivek je zřejmé, že maximální hodnoty dosahuje větrání asi ve 20. hodině fermentace, kdy je syntesa bílkovin již potlačena nedostatkem dusíku v médiu a kdy nastupuje intesivní syntesa lipidel.

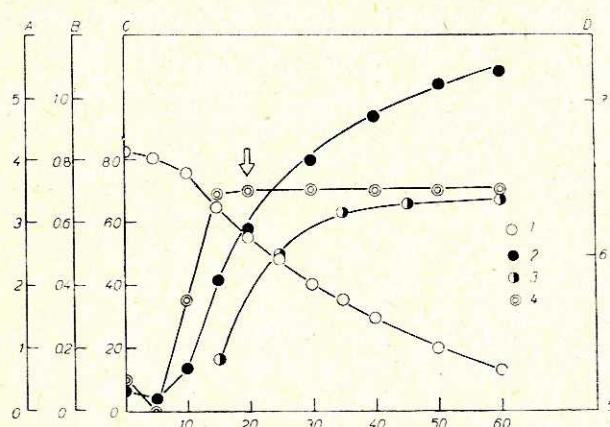
Typický průběh fermentace je znázorněn na obr. 3. Znakem spotřeby dusíku amoniových iontů je pokles pH. Minimální hodnoty pH byly naměřeny vždy ve 4. až 6. hodině. Jakmile kvasinky spotřebovaly amoniový dusík a počaly asimilovat dusičnanové ionty, pH opět stoupalo a asi v 18. hodině dosáhlo hodnoty 6,3 až 6,5. V této fázi kvašení jsme přidávali sterilní roztok fosforečnanu draselného v množství 0,1 %, který zajistil příznivou hodnotu pH asi 6,5 až do konce kvašení. Téměř neutrální reakce fermentační půdy má dobrý vliv na tučnění a pigmentaci rodotoruly. Biosyntesa tuku probíhá nejintenzivněji mezi 20. až 36. hodinou kvašení. Během tohoto poměrně krátkého časového úseku stoupá obsah tuku v sušině kvasinek asi ze 20 až na 60 %. V dalších hodinách kvašení se obsah tuku zvyšuje jen velmi zvolna na konečnou hodnotu 65 až 67 % tuku v sušině. Absolutní obsah tuku, vztázený na objem fermentační půdy však roste i v této fázi, neboť stoupá obsah sušiny kvasinek z 0,8 % ve 36. hodině kvašení na 1,1 % na konci fermentace. Z průběhu křivky úbytku cukru vidíme, že jejich obsah klesá až asi do 60. hodiny, kdy je dosaženo asimilační hranice, neboť ani prodloužením fermentace se hladina zbytkových redukujících látek nemění. Chromatografickou analýsou prokvašeného média bylo zjištěno, že zbytkové redukující látky jsou tvořeny malým množstvím maltosy a pentosami.

2. Vzhled kvasinek během fermentace

Kvasinky v prvních dvou hodinách po zaočkování jsou tvarově nevyrovnané, plasma je zrnitá a obsahuje různě velké tučkové kapičky, pučících buněk je velmi málo. Asi v 5. hodině nastává náhlá změna mikroskopického obrazu. Buňky jsou zvětšené, oválné, hladkého obrysu, plasma je čiré a homogenní. Kvasinky začínají pučet. V 10. hodině fermentace pučí již asi 30 % buněk (obr. 4), a jejich množství nadále stoupá a dosahuje největších hodnot asi v 15. hodině. Později plasma mírně granuluje a počínají se tvořit tučková tělíska. V 25. hodině klesá počet pučících buněk a nastává intenzivní tvorba tuku (obr. 5). Na konci fermentace jsou buňky téměř vyplněny dvěma nebo více velkými kapkami tuku (obr. 6).

3. Tvorba karotenoidů

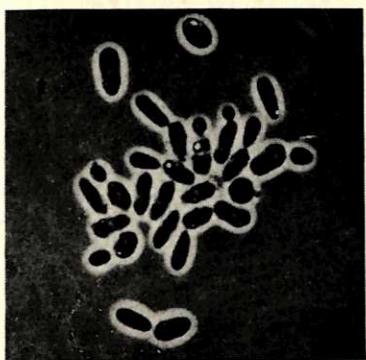
Tvorba karotenoidů kvasinkou *Rhodotorula gracilis* na dextronerové půdě je stejná jako na minerálních půdách s glukosou. Srovnání pigmentace na půdách s glukosou a dextronerem je uvedeno na obr. 7. Pigmentace kvasinek je zřejmá již po 30 h kultivace. Plně ztučnělé kvasinky jsou sytě červeně zbarvené. Obsah jednotlivých karotenoidů v kvasinkách pěstovaných na půdě s dextronerem je uveden v tab. 1.



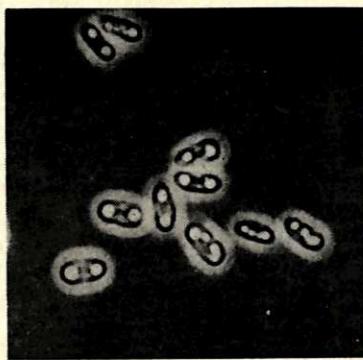
Obr. 3. Průběh fermentace *Rh. gracilis* na tukotvorné půdě

Osa x: hodiny fermentace. Osa y: A — glukosa v %, B — kvasničná sušina v %, C — obsah tuku v sušině v %, D — pH média. Šipka je označena doba přidání K₃HPO₄.

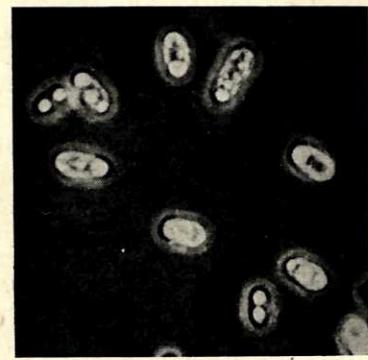
1 — glukosa v médiu, 2 — kvasničná sušina, 3 — obsah tuku v sušině, 4 — pH média



Obr. 4. Mikroskopický obraz kultury *Rh. gracilis*, staré 10 hodin. — Zvětšeno 1500 X



Obr. 5. Mikroskopický obraz kultury *Rh. gracilis* na počátku tukotvorné fáze — Zvětš. 1500 X



Obr. 6. Mikroskopický vzhled plně ztučnělých buněk *Rh. gracilis* — Zvětšeno 1500 X

4. Zpracování kvasinek a isolace tuku

Po skončení fermentace byly kvasinky odstředěny, proprány vodou a ihned zpracovány. V dřívě publikovaných pracích byly kvasinky před isolací tuku zpravidla podrobeny kyselé hydrolyse v prostředí 1 N HCl [6]. Při zpracování většho množství kvasničné sušiny by však spotřeba kyseliny byla značná a zdražovala by podstatně výrobek.

Tabulka 1

Srovnání obsahu karotenoidů v kvasinkách, pěstovaných na půdě s glukosou a dextronerem. Obsah karotenoidů je udán v mg % v sušině

Karotenoidy	Glukosa	Dextroner
fytoen	2,50	2,30
fytofluen	0,34	0,25
α -karoten	1,30	0,95
β -karoten	3,10	2,85
torulen	13,50	9,30

Kromě toho by případné další využití kvasničného hydrolysátu bylo ztíženo příliš velkým obsahem solí, vzniklých neutralisací kyseliny po hydrolyze. Proto jsme se podrobněji zabývali otázkou hydrolysy kvasinek za použití podstatně menšího množství kyseliny solné. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2. Na základě téhoto výsledků jsme se rozhodli použít pro hydrolyzu kvasinek prostředí 0,2 N HCl při přetlaku 1 at po dobu 30 min. Hydrolysát po

Tabulka 2

Průběh hydrolyzy kvasinek za různých podmínek

Normalita HCl	t °C	Doba v min	% uvolněného tuku*)	% uvolněných uhlohydrátů*)
1,00 N	100	120	72,6	18,9
0,20 N	100	120	68,0	15,0
0,04 N	100	120	67,0	3,14
1,00 N	120	30	73,0	19,8
0,20 N	120	30	71,2	18,7
0,04 N	120	30	66,7	11,3

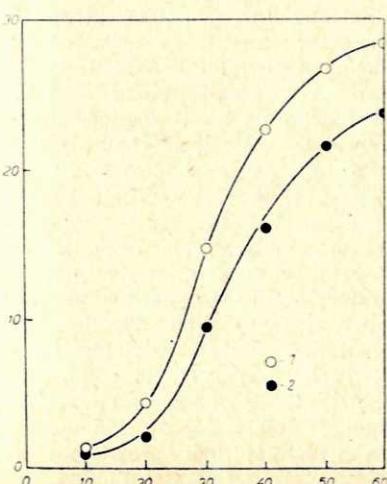
*) vztaženo na kvasničnou sušinu.

neutralizaci obsahuje přibližně 1 % NaCl, asi 1,5 % redukujících cukrů (vzniklých hydrolyzou buněčných uhlohydrátů) a asi 0,2 % dusíku ve formě bělkovinného hydrolysátu, bylo-li hydrolysováno kvasničné mléko s 10 % sušiny. Toto složení hydrolysátu umožňuje jeho další využití, jak se ještě zmíníme.

Hydrolysou rozrušené kvasinky byly odfiltrovány, usušeny a extrahovány etherem nebo petroletherem. Extrahovaný tuk byl zbaven rozpouštědel destilací a evakuací za mírně zvýšené teploty. V tab. 3 srovnáváme složení kvasničné sušiny a hodnoty tukových konstant produktu získaného kultivací na půdách s glukosou a dextronerem.

5. Výtežky tuku při fermentaci na dextronerových půdách

Ekonomický koeficient, tj. množství sušiny vytvořené ze 100 g uhlohydrátu, činí 32 až 35, z něho odvozený dextronerový koeficient 19 až 21. Tukový koeficient, který je mírou přeměny uhlohydrátu na tuk, je přes 20 a při dobrých fermentacích



Obr. 7. Srovnání pigmentace kvasinek *Rh. gracilis* na půdách s glukosou a dextronerem
Obr. 8 x: hodiny fermentace
Obr. 8 y: obsah karotenoidů v mg% v sušině.
1 — živná půda s glukosou, 2 — živná půda s dextronerem

Tabulka 3

Porovnání složení sušiny a tukových konstant u kvasinek, pěstovaných na půdě s glukosou a dextronerem

Složení sušiny	Kvasinky narostlé	
	na glukosu	na dextroneru
% popela	3,3	3,2
% bílkovin	10,5	14,2
% tuku	70,6	63,5
% uhlohydrátů	15,6	18,5
Tukové konstanty		
jodové číslo	77,2	71,5
změdlenovací ekvivalent	293,8	293,2
n_D^{40}	1,4623	1,4616

až 21,5. Hodnoty dosažené na půdách s dextronem jsou vyšší než uvádí Lundin pro tvorbu tuku na třtinové melase (1) a téměř tak vysoké jako na minerálních půdách s glukosou (6).

6. Možnosti využití odpadů po fermentaci na dextronerových půdách a po zpracování kvasinek

Spojením prokvašené dextronerové půdy se zbytkem po hydrolyze kvasinek jsme získali půdu složením velmi vhodnou pro kultivaci některých méně náročných mikroorganismů, např. fusárií nebo oidií. Roztok obsahuje průměrně 1,3 % uhlohydrátů (0,8 % připadá na redukující cukry, 0,5 % na ne-redukující) a asi 0,2 % dusíku ve formě bílkovinného hydrolysátu. Po úpravě pH a sterilaci jsme půdu zaočkovali jednak *Fusarium spec.* kmen 61, jednak *Oidium lactis* kmen 85 (oba mikroorganismy ze sbírky katedry kvasné chemie a technologie). Inokula byla napěstována na 4 °Bg sladině a

Tabulka 4

Kultivace *Fusarium spec.*, kmen 61 a *Oidium lactis*, kmen 85 na odpadu po fermentaci *Rhodotoruly gracilis*

Hodiny kultivace	<i>Fusarium sp.</i>			<i>Oidium lactis</i>		
	red. cukry %	sušina %	pH	red. cukry %	sušina %	pH
0	1,33	—	5,7	1,33	—	5,7
24	0,71	0,236	6,1	0,49	0,438	6,3
48	0,50	0,375	6,1	0,46	0,419	6,3

do půd přidána v množství 2 %. Kultivace byla vedená na třepacím stroji při 29 °C. Během kultivace jsme sledovali tvorbu sušiny a využití uhlohydrátů. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

Zhodnocení výsledků

Tato práce upozorňuje na možnost využití suroviny, odpadající při výrobě glukosy ze škrobu. Pro biosyntézu tuku pomocí *Rhodotoruly gracilis* je dextroner mimořádně vhodný, neboť neobsahuje

пищевой промышленности) и провитамина Д заслуживает особого внимания.

ZUR FRAGE DER MIKROBIELLEN FETTSYNTHESE MITTELS DER HEFE *RHODOTORULA GRACILIS*

Die Arbeit macht auf die Möglichkeit der Ausnützung des Abfallproduktes bei Glukoseerzeugung aus Stärke aufmerksam. Zur Biosynthese des Fettes mittels Rhodotorula gracilis eignet sich Dextrosesirup-Mutterlauge besonders gut, denn es ist fast stickstofffrei. Es kann angenommen werden, das nach der Adaptation der Hefen dieselben Ergebnisse wie auf Glukose erzielt werden könnten, d. h. ein Fettkoefizient über 22 und Fettgehalt der Hefetrockensubstanz über 70 %. In Laborversuchen wurde das Verhältnis zwischen Gärungsdauer und Fettproduktion gesucht. Es wird deduziert, dass man der mikrobiellen Synthese des Fettes, des Provitamins A, des Torulens als eines passenden Farbmittels in der Lebensmittel- (Fett-) Industrie und des Provitamins D Aufmerksamkeit widmen sollte.

téměř žádný dusík. Lze se právem domnívat, že po adaptaci kvasinek na dextroner by bylo dosaženo stejných výsledků jako na glukose, tj. tukového koeficientu přes 22 a tučnosti kvasničné sušiny přes 70 %. Při práci v provozním měřítku je ovšem nezbytné uvážit vztah mezi dobou fermentace a dosaženým tukovým koeficientem, neboť je nesporné, že značná část výrobních nákladů při samotné fermentaci připadá na spotřebu tepelné a elektrické energie. Pokusili jsme se v laboratorním měřítku nalézt závislost mezi délkou kvasné doby a produkcí tuku. I když po 60 h kultivace získáme absolutně větší množství tuku, jeho cena přepončtená na váhovou jednotku bude vyšší než při pírušení fermentace po 40 h, a to tím vyšší, čím větší podíl na celkovém nákladu bude zaujmít položka připadající na udržení fermentace v chodu. Je však třeba připomenout, že ke konci tučnění značně stoupá obsah dalších cenných složek kvasničné sušiny, např. karotenoidů.

Soudíme, že mikrobiální syntesa tuku, provitaminu A, torulenu, jako vhodného barviva v potravinářském (tukovém) průmyslu a provitaminu D zasluzuje pozornost a jak ukázaly výsledky naší práce, jsou dány předpoklady pro 1/4 až 1/2 provozní výzkumu.

Literatura

- [1] Lundin H.: J. of Inst. of Brew. 56, 17 [1950]
- [2] Naime Nokay: Türk İijen Tecrübi Biol. Dergisi 11, 344 [1951] (Cit. dle C. A.)
- [3] Blinc Marda, Hočevar B.: Monatsh. 84, 1127 [1953] (Cit. dle C. A.)
- [4] Kleinzeller A., Bass E.: Chem. listy 45, 303 [1951]
- [5] Bass E., Hospodka J.: Chem. listy 46, 243 [1952]
- [6] Kleinzeller A., Málek J., Praus R., Škoda J.: Chem. listy 46, 470 [1952]
- [7] Škoda J.: O mikrobiální synthese tuků a karotenoidů. Disertační práce, Praha 1955
- [8] Ričica J., Grünwald H.: Chem. listy 48, 1250 [1954]
- [9] Cooper C. M., Fernstrom G. A., Miller S. A.: Ind. Eng. Chem. 36, 504 [1944]
- [10] Green S. R., Stone I.: Wallerstein Lab. Comm. 15, 347 [1952]
- [11] Jureček M.: Organická analýza, Praha 1950
- [12] Praus R., Dyr J.: Chem. listy 51, 1559 [1957]
- [13] Bass E.: Přehled moderních metod analytiky mastných kyselin a glyceridů, Praha 1950

Došlo do redakce 10. 4. 1959.

MICROBIAL SYNTHESIS OF FAT BY MEANS OF THE „RHODOTORULA GRACILIS“ YEAST

The article deals with the possibility of utilising raw materials which have been so far lost as waste products of plants manufacturing glucose from starch. Since the dextroner (hydrol) does not practically contain any nitrogen, it is extremely suitable for microbial synthesis of fat through the Rhodotorula Gracilis yeast. It can be reasonably expected, that after the yeasts have adapted themselves to the dextroner (hydrol) the same results can be achieved as with glucose i. e. the fat coefficient well over 22 % and fat content in the yeast dry matter over 70 %. Experiments have been made on a laboratory scale to determine the relation between the duration of fermentation and fat yield. Conclusion can be made, that the microbial synthesis of fat, provitamin A, torulen (suitable for food industry as a dyestuff) and provitamin D should be given full attention.

К ВОПРОСУ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА ЖИРОВ ПРИ ПОМОЩИ ДРОЖЖЕЙ СЕМЕЙСТВА RHODOTORULA GRACILIS

В статье показывается возможность использования в качестве исходного сырья отходов производства на заводах перерабатывающих крахмал на глюкозу. С точки зрения требований биологического синтеза жира при помощи дрожжей *Rhodotorula gracilis* является дектронер (тидрол) чрезвычайно выгодной средой ввиду того, что он практически не содержит азот. Можно предполагать, что после приспособления дрожжей к условиям дектронера можно добиться результатов не отличающихся от процесса на глюкозе. Это значит, что коэффициент жира может быть выше 22 и содержания жира в сухом веществе дрожжей выше 70 %. Авторы попытались определить в лабораторном масштабе зависимость между длительностью ферментации и выходом жира. Считаем, что микробный синтез жиров, провитамина А, торулена (являющегося качественным красящим веществом для