

Skríning kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* pre etanolovú fermentáciu vysoko koncentrovaných substrátov

PETRA BAFRNCOVÁ, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, TOMÁŠ FOLTIN, IVETA SLÁVIKOVÁ,
JAROSLAVA PÁTKOVÁ

Faculty of Chemical Technology, Slovak University of Technology
– Department of Biochemical Technology, Bratislava, Slovak Republic

Abstract

BAFRNCOVÁ P., ŠMOGROVIČOVÁ D., FOLTIN T., SLÁVIKOVÁ I., PÁTKOVÁ J. (2000): **Screening of strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol fermentation of very-high-gravity substrates.** Czech J. Food Sci., 18: 129–136.

A strain usable for fermentation of highly concentrated substrates by very-high-gravity fermentation technology (VHG) was selected on the basis of fermentation activity of the strains at high initial substrate concentrations and in the presence of exogenously added ethanol. The capacity of 35 distillery, baker's and wine strains of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* to ferment high glucose concentrations was studied in a medium without ethanol addition and with addition of 10% ethanol by volume. Three strains were selected on the basis of biomass increments, degree of glucose utilization and concentration of produced ethanol. Maximum concentration of produced ethanol and ethanol productivity expressed as the amount of produced ethanol in a given volume within a time interval were compared in media with increasing glucose concentrations (250, 300, 350 and 400 g/l). The highest ethanol concentration (74.4 g/l) and highest ethanol productivity (1.38 g/l/h) was recorded in strain Pz 90 at a glucose concentration of 400 g/l in medium. An increase in biomass concentration (up to 18 g/l) led to further increase in ethanol productivity (2.84 g/l).

Key words: ethanol; *Saccharomyces*; osmotolerance; VHG-fermentation

Súhrn

BAFRNCOVÁ P., ŠMOGROVIČOVÁ D., FOLTIN T., SLÁVIKOVÁ I., PÁTKOVÁ J. (2000): **Skríning kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* pre etanolovú fermentáciu vysoko koncentrovaných substrátov.** Czech J. Food Sci., 18: 129–136.

Výber kmeňa vhodného pre fermentáciu vysoko koncentrovaných substrátov technológiou very-high-gravity fermentácií (VHG) bol uskutočnený na základe fermentačnej aktivity jednotlivých kmeňov pri vysokých počiatočných koncentráciách substrátu a v prítomnosti externe pridaného etanolu. Schopnosť 35 liehovarských, pekárskych a vínnych kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* skvasovať vysoké koncentrácie glukózy (300 g/l) bola sledovaná v médiu bez prídavku etanolu a s prídavkom 10 obj. % etanolu. Na základe prírastkov biomasy, stupňa využitia glukózy a koncentrácie naprodukovaného etanolu boli vybrané tri kmene. V médiách so zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy (250, 300, 350 a 400 g/l) boli porovnávané maximálna koncentrácia naprodukovaného etanolu a produktivita etanolu vyjadrená ako množstvo naprodukovaného etanolu v danom objeme za čas. Pri koncentrácii 400 g/l glukózy v médiu bola najvyššia koncentrácia etanolu (74,4 g/l) a najvyššia produktivita etanolu (1,38 g/l/h) dosiahnutá pri kmeni Pz 90. Zvýšenie koncentrácie biomasy (až na 18 g/l) viedlo k ďalšiemu zvýšeniu produktivity etanolu (2,84 g/l).

Kľúčové slová: etanol; *Saccharomyces*; osmotolerancia; VHG-fermentácia

Very-high-gravity (VHG) etanolová fermentácia je jednou z nových perspektívnych inovácií klasickej vsádzkovej fermentácie, ktorá je definovaná ako fermentácia vysoko koncentrovaných zápar, obsahujúcich viac ako 300 g extraktu na liter zápar (THOMAS *et al.* 1993, 1996).

VHG technológia umožňuje zvýšenie výkonu jednotkového objemu fermentačných zariadení a tiež podstatné zvýšenie finálnej koncentrácie etanolu v prekvasenej zápare, čo znižuje spotrebu tepla pri destilácii. Pre úspešnú aplikáciu VHG fermentácie do priemyselnej praxe je dôle-

žitý výber produkčného kmeňa s vysokou osmo- a etanoltoleranciou. Takýto produkčný kmeň by mal byť schopný dosiahnuť vysokú rýchlosť produkcie etanolu aj pri vysokých počiatočných koncentráciách sacharidov v médiu (HARALDSON, BJÖRLING 1981).

So zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy v médiu rastie osmotický tlak a znižuje sa aktivita vody a_w . Zmenené podmienky prostredia sa prejavujú inhibíciou rastu buniek, výrazným znížením ich viability a s tým súvisiacim poklesom fermentačnej aktivity (D'AMORE *et al.* 1990). Inhibícia rastu kvasiniek a ich fermentačnej aktivity vysokou koncentráciou substrátu sa objavuje už pri koncentrácii glukózy 100 g/l. Úplná inhibícia fermentácie bola pozorovaná pri koncentrácii glukózy 400 g/l (D'AMORE, STEWART 1987). Inhibícia rastu kvasiniek a fermentačnej aktivity pri vysokých počiatočných koncentráciách substrátu môže byť spôsobená aj nepriamo, ako dôsledok vysokej koncentrácie etanolu naprodukovanej počas fermentácie. Zvýšený osmotický tlak sa negatívne prejaví aj na etanoltoleranciu kvasiniek. Inhibičný účinok vysokého osmotického tlaku sa dá do určitej miery znížiť použitím fed-batch systémov, ktoré sú z tohto hľadiska výhodnejšie ako vsádzkové systémy.

Jednotlivé kmene kvasiniek sa líšia svojou schopnosťou tolerovať a adaptovať sa na vysoký osmotický tlak a vysokú koncentráciu etanolu. Od rôznej osmo- a etanoltolerancie kvasiniek závisí ich rýchlosť produkcie etanolu a maximálne množstvo naprodukovanej etanolu, ktoré sú posudzované ako jedny z najdôležitejších kritérií pre výber produkčného kmeňa. Jednoduchou a najviac používanou metódou merania etanoltolerancie je posúdenie rastu kvasiniek v prítomnosti a bez prítomnosti exogénne pridaného etanolu (D'AMORE *et al.* 1990). Štúdium etanoltolerancie kvasiniek na základe prídavku exogénneho etanolu do prostredia nevystihuje úplne toleranciu buniek voči etanolu počas fermentácie, pretože vplyv exogénneho a endogénneho etanolu na bunku nie je totožný. Exogénne pridaný etanol má menší inhibičný účinok, pravdepodobne v dôsledku akumulácie intracelulárneho etanolu v bunkách najmä v počiatočnom štádiu fermentácie (JONES 1988). Vysoké koncentrácie naprodukovanej etanolu sa dajú dosiahnuť mnohými kmeňmi *Saccharomyces cerevisiae* za optimálnych fermentačných podmienok a pri vhodnom obohatení fermentačného média živinami (THOMAS, INGLEDEW 1990).

MATERIÁL A METÓDY

V práci boli použité liehovarské, pekárske a vinné kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* pochádzajúce zo zbierok Centra chemického výskumu Slovenskej akadémie vied (CCY), Komplexného výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho (RIVE) a Katedry biochemickej technológie Chemickotechnologickej fakulty Slovenskej technickej univerzity. Kultúry boli uchovávané na šikmom agaru so sladínovým extraktom pri 4 °C. Každé tri mesiace boli periodicky preočkované.

Príprava inokula: Mikroorganizmy boli preočkované zo šikmého sladínového agaru (2 očká) do 100 ml inokulačnej pôdy so zložením podľa OLSONA a JOHNSONA (1949) v 500 ml bankách. Kultivácia prebiehala pri 28 °C na závesnej rotačnej trepačke (3 Hz) 24 h za aeróbnych podmienok. Kvasinky po 24 h kultivácie v Olson-Johnsonovom médiu boli preočkované do predfermentačného média (10 ml inokula do 1 banky so 100 ml média) a opäť kultivované pri 28 °C na rotačnej trepačke po dobu 24 h. Následne boli kvasinky scentrifugované v sterilných kyvetách (10 min, 50 Hz) a rozsuspendované v 10 ml sterilnej destilovanej vody. Takto pripravená biomasa bola použitá ako inokulum pre fermentáciu.

Predfermentačné médiá obsahovali roztok glukózy (100 g/l) a roztok solí (kvasničný autolýzát 3 g/l; síran amónny 5 g/l; dihydrogenfosforečnan draselný 2 g/l; heptahydrát síranu horečnatého 1 g/l; dihydrát chloridu vápenatého 0,1 g/l; chlorid sodný 0,1 g/l). Hodnota pH médií bola upravená na 5,5 roztokom HCl. Roztok glukózy a roztok solí boli sterilizované oddelene, aby sa zabránilo vzniku Maillardových reakcií. Koncentrácie jednotlivých zložiek sú uvádzané vo výslednom roztoku po zmiešaní roztoku glukózy a solí. Sterilizácia prebiehala 20 minút pri tlaku 120 kPa.

Skríning kmeňov: Fermentácia prebiehala staticky v skúmavkách s kovovými uzávermi po dobu 96 h pri teplote 30 °C. Na jednotlivé fermentácie bolo použité 10% inokulum vybraného kmeňa kvasiniek z Olson-Johnsonovej inokulačnej pôdy. Kultivačné médiá pre skríning kmeňov obsahovali roztok glukózy (300 g/l) a roztok solí s rovnakým zložením ako predfermentačné médiá. Vzorky boli odoberané v časoch 0, 24 a 96 hodín.

Fermentácie s vybranými kmeňmi a so zvýšenou koncentráciou biomasy: Fermentácie prebiehali za stáleho miešania v hermeticky uzavretých fermentačných nádobách s kvasným uzáverom po dobu 54 h pri teplote 30 °C. Celkový objem média vo fermentoroch bol 100 ml (80 ml roztoku glukózy, 10 ml roztoku solí a 10 ml inokula z predfermentačného média). Počas fermentácie bolo pH udržiavané roztokom hydroxidu sodného na hodnote približne 5,3. Na analýzu boli odoberané 3 ml vzorky v 4-hodinových intervaloch.

Médiá pre porovnanie kmeňov pri fermentáciách s rôznou koncentráciou glukózy obsahovali roztok glukózy (250, 300, 350 alebo 400 g/l) a roztok solí s rovnakým zložením ako predfermentačné médiá.

Médiá pre sledovanie vplyvu zvýšenej koncentrácie biomasy obsahovali roztok glukózy (300 g/l) a roztok solí (kvasničný autolýzát 12 g/l), koncentrácia ostatných zložiek ostala nezmenená.

Analytické metódy: Vo vzorkách bola stanovovaná koncentrácia sušiny biomasy gravimetricky (105 °C, 5 h), koncentrácia glukózy reakciou s kyselinou dinitrosalicilovou (DNS) a koncentrácia etanolu plynovou chromatografiou (CHROM 5, náplňová kolóna Porapack QS, FID detektor). Viabilita kvasiniek bola stanovovaná počítaním v Bürke-

rovej komôrke po vitálnom farbení s metylénovou modrou a vyjadrená ako percento živých buniek.

Fermentačné parametre: Výťažok etanolu z maximálneho teoretického množstva [%]:

$$\frac{E_K - E_Z}{E_{\text{teor max}}} \cdot 100$$

Stupeň utilizácie glukózy [%]:

$$\frac{G_Z - G_K}{G_Z} \cdot 100$$

Výťažok sušiny biomasy z maximálneho teoretického množstva [%]:

$$\frac{B_K - B_Z}{B_{\text{teor max}}} \cdot 100$$

Výťažkový koeficient etanolu zo spotrebovanej glukózy [g/g]:

$$\frac{E_K - E_Z}{G_Z - G_K}$$

Produktivita etanolu [g/l/h]:

$$\frac{E_K - E_Z}{V \cdot t}$$

Energia bazálneho metabolizmu [g/g/h]:

$$\frac{G_Z - G_E - G_B - G_K}{B_K \cdot t}$$

kde: E – etanol [g]
 G – glukóza [g]
 B – sušina biomasy [g]
 t – doba fermentácie [h]
 V – objem fermentačného zariadenia [l]
 Z – na začiatku fermentácie
 K – na konci fermentácie
 teor max – teoretické maximum

Pre výpočet energie bazálneho metabolizmu bolo množstvo glukózy spotrebovanej na tvorbu biomasy (G_B) vypočítané zo stanoveného prírastku biomasy na základe bežnej výťažnosti (7,8 g biomasy zo 100 g glukózy za anaeróbných podmienok). Množstvo glukózy spotrebovanej na tvorbu etanolu (G_E) bolo vypočítané z množstva vyprodukovaného etanolu na základe teoretickej výťažnosti (51,14 g etanolu zo 100 g glukózy).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skríning liehovarských, pekárskych a vínnych kmeňov

Základnou požiadavkou pre výber vhodného kmeňa kvasiniek pre fermentáciu technológiou very high gravity je rýchlosť produkcie etanolu, tolerancia k produktu, ale najmä dobrá fermentačná aktivita aj pri vysokých počiatočných koncentráciách substrátu. Na základe týchto kritérií sme sledovali schopnosť jednotlivých kmeňov skvasovať vysoké koncentrácie glukózy (300 g/l) v médiu bez prídavku etanolu a s prídavkom 10 obj. % etanolu.

Sledovanými parametrami boli prírastok biomasy, stupeň utilizácie glukózy a koncentrácia naprodukováného etanolu.

Do skrínungu bolo zaradených 19 liehovarských a pekárskych kmeňov kvasiniek (tab. 1). Nárast biomasy nad 2,6 g/l sme pozorovali u kmeňov OHF, Alltech a Pz 90, a to v médiu bez exogénne pridaného etanolu. Vo fermentačnom médiu s obsahom 10 % obj. etanolu vykazoval vyšší nárast biomasy len kmeň Pz 90, ktorý dosiahol prírastok biomasy až 1,2 g/l. Kmeň Nýřany K2 napriek slabému nárastu biomasy v médiu bez etanolu bol v prítomnosti exogénneho etanolu v porovnaní s ostatnými kmeňmi schopný pomerne dobrého rastu (až 0,8 g/l).

Ďalším sledovaným parametrom bol stupeň utilizácie glukózy v médiu bez a s prídavkom etanolu (10 obj. %). Vysoký stupeň utilizácie glukózy (64 %) sme v médiu bez prídavku etanolu pozorovali pri kmeňoch CCY 22-3-42, Seliko K1, S17, OHF a Pz 90. Pri kmeni Alltech bol stanovený stupeň utilizácie až 65 %. Avšak v médiu s exogénne pridaným etanolom bola utilizácia sacharidov výrazne nižšia, stupeň konverzie glukózy viac ako 10 % bol dosiahnutý iba pri piatich kmeňoch.

Dôležitým kritériom pre výber vhodného kmeňa určeného pre etanolovú fermentáciu je koncentrácia naprodukováného etanolu. V médiu bez exogénne pridaného etanolu boli kmene kvasiniek OHF, Alltech, Pz 90 a Pz 172 schopné naprodukovať v priebehu 96 h fermentácie viac ako 9,3 % obj. etanolu. Aj s prihliadnutím na odpar exogénne pridaného etanolu možno dospieť k záveru, že väčšina kmeňov kvasiniek nie je schopná v prítomnosti až 10 obj. % exogénne pridaného etanolu naprodukovať významné množstvo etanolu. Výnimku tvoria kmene CCY 21-4-26, OHF a Pk 17, pri ktorých koncentrácia etanolu po 96 hodinách fermentácie bola vyššia než 7,0 % obj. Nízka produkcia etanolu v médiu s exogénne pridaným etanolom bola sprevádzaná aj slabým nárastom biomasy a nízkym stupňom utilizácie glukózy.

Okrem liehovarských a pekárskych kmeňov kvasiniek bolo testovaných aj 16 hlbokoprekvasajúcich vínnych kmeňov kvasiniek, pretože sa predpokladala ich dobrá etanoltolerancia a fermentačná aktivita (tab. 2). U vínnych kmeňov RIVE 10-13-5, RIVE 10-13-14 a RIVE 10-25-10 bol v médiu bez prídavku etanolu pozorovaný nárast biomasy nad 2,6 g/l. V médiu s prídavkom etanolu vykazovali nárast biomasy nad 0,5 g/l tri kmene: RIVE 10-13-14, RIVE 10-25-3 a RIVE 10-35-5. Vínné kmene však boli v prítomnosti exogénne pridaného etanolu schopné nižšieho rastu v porovnaní s liehovarskými a pekárskymi kmeňmi.

V médiu bez prídavku etanolu bol dosiahnutý vysoký stupeň utilizácie glukózy (nad 61 %) pri štyroch kmeňoch (RIVE 10-13-5, RIVE 10-13-14, RIVE 10-35-37 a RIVE 15-1-465). Vínné kmene kvasiniek v porovnaní s pekárskymi a liehovarskými, nevykazovali v médiách s prídavkom 10 obj. % etanolu takmer žiadnu fermentačnú aktivitu.

Kmene RIVE 10-13-5, RIVE 10-13-14, RIVE 10-35-37, RIVE 15-1-416 a kmeň Hliník boli schopné naprodukovať viac

Tab. 1. Parametre statickej fermentácie pri koncentrácii glukózy 300g/l, teplote 30 °C, v médiu bez prídavku a s prídavkom etanolu (10 obj. %) po 96 h pre testované liehovarské a pekárske kmene – The parameters of static fermentation at glucose concentration 300 g/l, temperature 30 °C, in medium with and without ethanol addition (10% by volume) after 96 hrs for the tested distillery and baker's strains

Kmeň ¹	Prírastok biomasy ² [g/l]		Stupeň využitia glukózy ³ [%]		Koncentrácia etanolu ⁴ [obj. %]	
	bez E	E	bez E	E	bez E	E
<i>S. cerevisiae</i>						
CCY 21-4-26	2,0	0,2	60	0	9,2	7,0
CCY 21-4-63	2,2	0,9	59	0	6,3	5,6
CCY 21-4-67	2,3	0,9	62	9	8,1	6,5
CCY 21-4-71	2,2	0,4	63	24	9,1	5,7
CCY 22-3-42	2,4	-0,1	64	6	8,6	5,9
Nýany K2	1,5	0,8	14	0	1,7	6,8
Seliko K1	2,1	0	64	10	8,3	6,0
S 17	2,0	0	64	13	8,2	6,6
E 7	1,9	0,1	54	0	8,7	6,7
OHF	2,9	-0,1	64	11	9,3	7,4
Alltech	2,6	0,4	65	16	9,5	6,0
Fleischmann	2,1	0,2	45	0	7,3	6,8
Red Star	2,2	0,6	47	0	8,2	6,9
Pk 17	2,2	0,6	51	0	8,9	7,3
Pz 90	2,9	1,2	64	10	9,7	6,8
Km 22	1,6	0,3	47	0	7,8	6,2
Pz 172	1,6	0,4	57	0	9,3	6,3
I 120	1,9	0,4	45	0	7,5	6,3
OO SFRH	2,1	0	54	19	5,9	6,4

bez E = médium bez exogénne pridaného etanolu – without E = medium without exogenously added ethanol

E = médium s obsahom 10 obj. % exogénne pridaného etanolu – E = medium with 10% by volume of exogenously added ethanol

¹strain; ²biomass increment; ³degree of glucose utilization; ⁴ethanol concentration

ako 9,3 obj. % etanolu. Avšak v médiách s prídavkom 10 % obj. etanolu kvasinky neboli schopné produkovať väčšie množstvá etanolu, výnimkou boli iba kmene RIVE 10-13-3 a RIVE 15-1-423.

Vzhľadom na vysoký nárast biomasy, stupeň využitia glukózy a najmä koncentráciu naprodukováného etanolu boli pre ďalšie experimenty použité kmene *Saccharomyces cerevisiae* Pz 90, OHF a Alltech.

Porovnanie fermentačnej aktivity vybraných kmeňov

Štúdium etanolovej fermentácie s vybranými kmeňmi kvasiniek bolo zamerané na porovnanie základných parametrov fermentácie jednotlivých kmeňov v médiách so zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy. Počiatočná koncentrácia biomasy sa pri jednotlivých fermentáciách pohybovala v rozmedzí od 2 do 3 g/l. Pri všetkých fermentáciách po krátkej lag-fáze nastal exponenciálny nárast biomasy, ale v neskorších štádiách fermentácie sa koncentrácia biomasy znižovala. Pokles koncentrácie biomasy bol pravdepodobne spôsobený lýzou buniek v dôsledku vysokej koncentrácie substrátu a etanolu a uvoľňovaním ich vnútrobunkového obsahu do prostredia. Najvyššie prírastky biomasy boli pozorované pri koncentrácii glukózy 250 g/l.

Vsádzkové fermentácie prebiehali po dobu 54 h, kedy sa už koncentrácia naprodukováného etanolu nezvyšovala. V médiu však ostalo ešte veľké množstvo nespotrebovanej glukózy. Stupeň využitia glukózy so zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy vo fermentačnom médiu postupne klesal. Najnižšie hodnoty boli dosiahnuté v médiu s koncentráciou glukózy 400 g/l, kde stupeň konverzie glukózy pre kmeň Pz 90 predstavoval 48 %, pre kmeň OHF 51 % a pre kmeň Alltech len 40 % (tab. 3).

Maximálna koncentrácia naprodukováného etanolu sa so vzrastajúcou koncentráciou glukózy v prostredí postupne znižovala (obr. 1). Najvyššie dosiahnuté množstvo etanolu bolo stanovené v médiu s koncentráciou glukózy 250 g/l pri fermentácii s kmeňom OHF. Dosiahnutá hodnota maximálnej koncentrácie etanolu 94,98 g/l predstavuje až 74,3 % z teoretického množstva etanolu počítaného na celkovú počiatočnú koncentráciu glukózy (tab. 3). Hodnoty maximálnych koncentrácií etanolu pre kmene Pz 90 a OHF boli v médiách obsahujúcich 250, 300 a 350 g/l glukózy podobné. Fermentáciami s kmeňom Alltech boli v porovnaní s kmeňmi Pz 90 a OHF dosiahnuté nižšie koncentrácie naprodukováného etanolu. V médiu s počiatočnou koncentráciou glukózy 400 g/l bola najvyššia

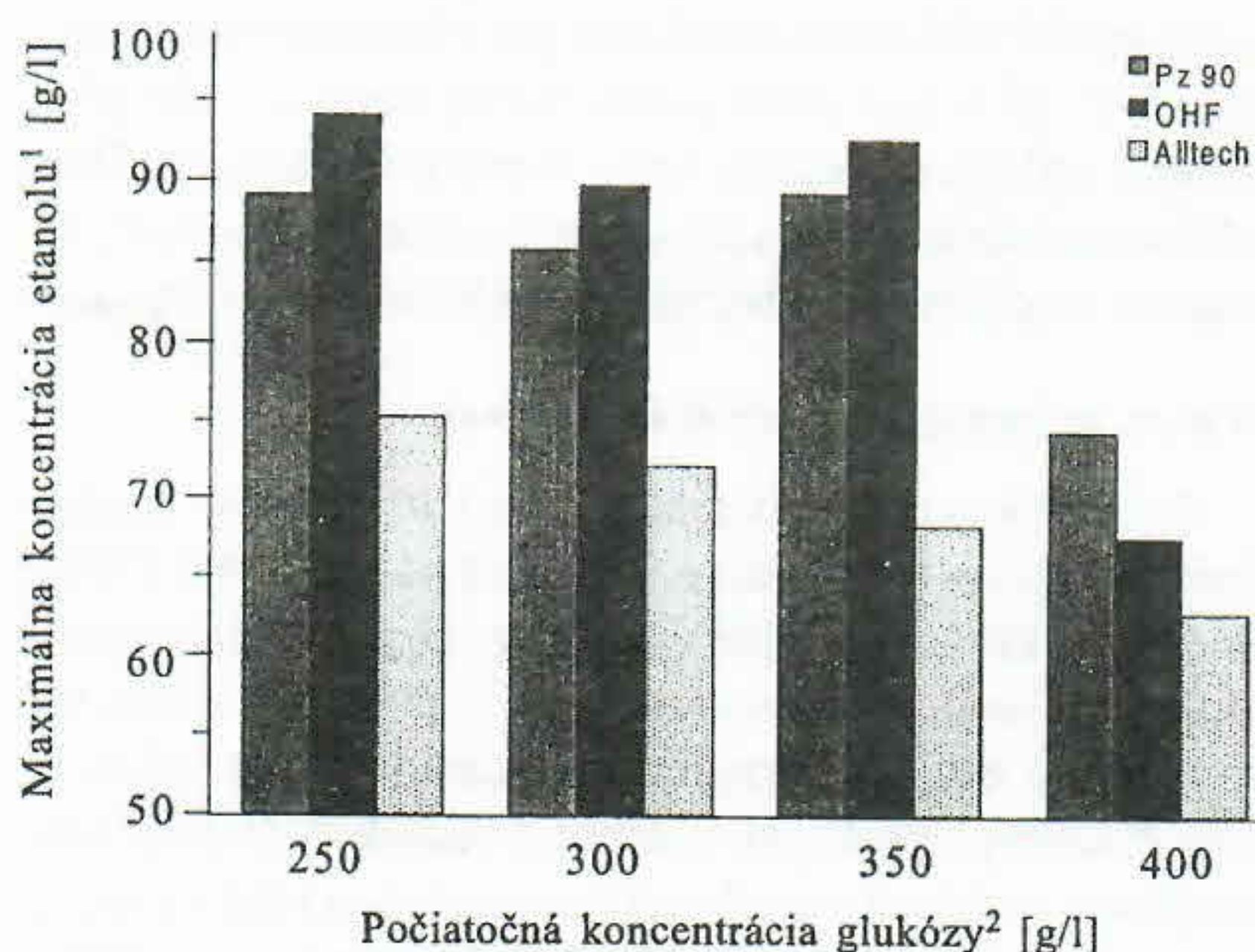
Tab. 2. Parametre statickej fermentácie pri koncentrácii glukózy 300 g/l, teplote 30 °C, v médiu bez prídavku a s prídavkom etanolu (10 obj. %) po 96 h pre testované vínne kmene – The parameters of static fermentation at glucose concentration 300 g/l, temperature 30°C, in medium without and with ethanol addition (10% by volume) after 96 hrs for the tested wine strains

Kmeň ¹ <i>S. cerevisiae</i>	Prírastok biomasy ² [g/l]		Stupeň využitia glukózy ³ [%]		Koncentrácia etanolu ⁴ [obj. %]	
	bez E	E	bez E	E	bez E	E
RIVE 10-13-3	2,3	0,2	53	0	8,6	7,0
RIVE 10-13-4	2,1	0,4	50	0	7,1	5,4
RIVE 10-13-5	2,6	0,4	62	0	10,2	6,7
RIVE 10-13-6	2,3	0,2	51	0	7,9	6,3
RIVE 10-13-14	2,9	0,6	62	0	9,3	6,4
RIVE 10-25-3	2,0	0,6	50	0	8,1	6,3
RIVE 10-25-10	2,7	0,2	53	0	8,8	6,4
RIVE 10-35-5	2,3	0,5	47	0	7,4	6,1
RIVE 10-35-8	2,2	0	49	0	8,3	6,7
RIVE 10-35-37	2,4	0	61	0	9,3	6,3
RIVE 15-1-416	2,2	-0,2	59	0	10,6	6,8
RIVE 15-1-423	1,4	0	27	0	5,6	7,1
RIVE 15-1-465	2,5	0,4	69	0	8,6	6,0
Bratislava	1,4	0,4	53	8	9,0	6,3
Hliník	1,6	0,4	57	0	10,1	6,4
Myslenice	1,8	0,3	27	0	6,2	6,1

bez E = médium bez exogénne pridaného etanolu – without E = medium without exogenously added ethanol

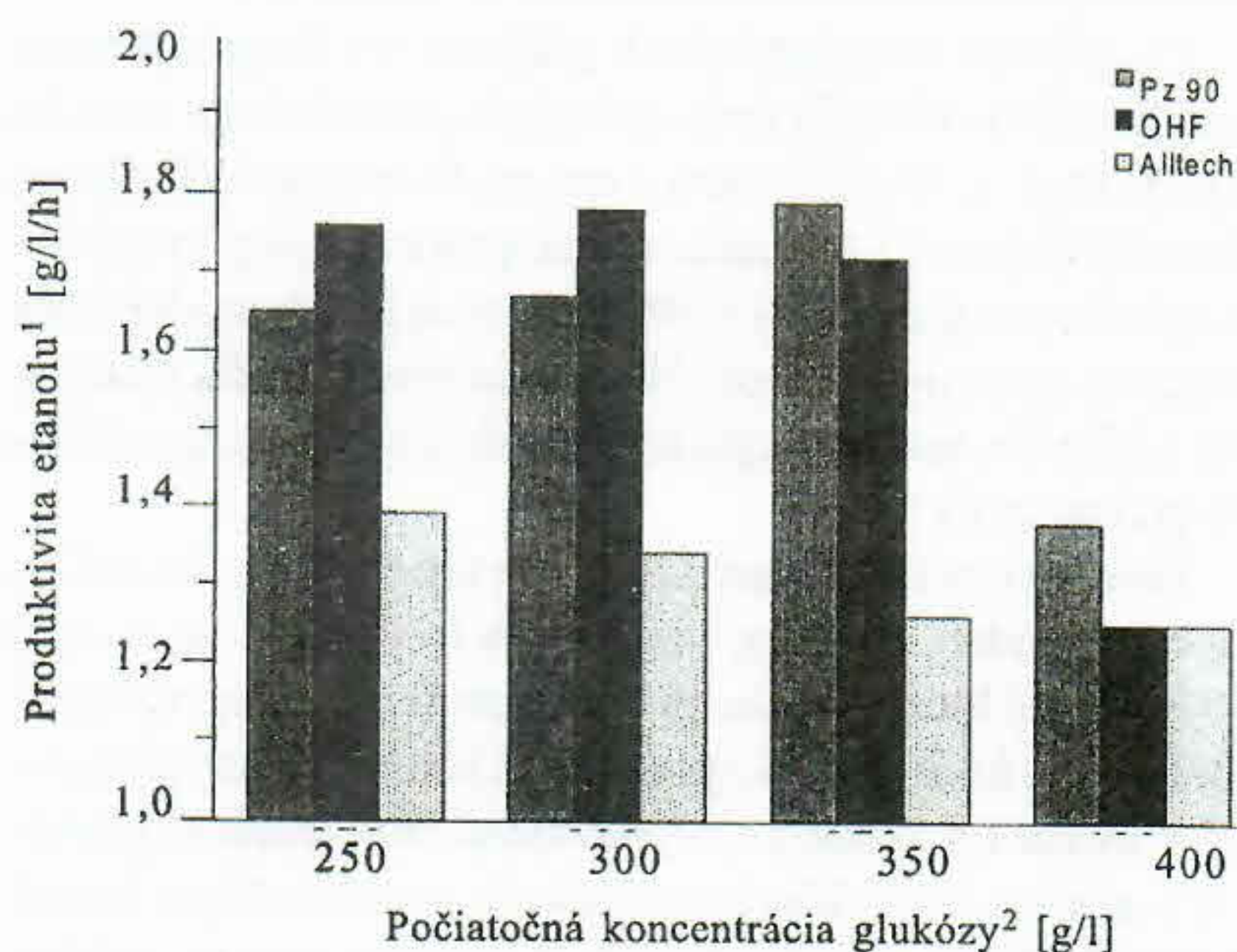
E = médium s obsahom 10 obj. % exogénne pridaného etanolu – E = medium with 10% by volume of exogenously added ethanol

¹strain; ²biomass increment; ³degree of glucose utilization; ⁴ethanol concentration



¹maximum ethanol concentration; ²initial glucose concentration

Obr. 1. Závislosť maximálnej koncentrácie etanolu od počiatočnej koncentrácie glukózy vo fermentačnom médiu pri vsádzkových fermentáciách s kvasinkami *S. cerevisiae* Pz 90, OHF a Alltech – Relation between maximum ethanol concentration and initial glucose concentration in fermentation medium during batch fermentations with the yeasts *S. cerevisiae* Pz 90, OHF and Alltech



¹ethanol productivity; ²initial glucose concentration

Obr. 2. Závislosť produktivity etanolu od počiatočnej koncentrácie glukózy vo fermentačnom médiu pri vsádzkových fermentáciách s kvasinkami *S. cerevisiae* Pz 90, OHF a Alltech – Relation between ethanol productivity and initial glucose concentration in fermentation medium during batch fermentations with the yeasts *S. cerevisiae* Pz 90, OHF and Alltech

Tab. 3. Parametre etanolovej fermentácie kvasinkami *S. cerevisiae* OHF, Alltech a Pz 90 pri koncentrácii glukózy v médiu 250, 300, 350 a 400 g/l. Počiatočná koncentrácia biomasy v rozmedzí 2–3 g/l, koncentrácia kvasničného autolýzátu 3 g/l – The parameters of ethanol fermentation with the yeasts *S. cerevisiae* OHF, Alltech and Pz 90 at glucose concentrations in medium 250, 300, 350 and 400 g/l. Initial biomass concentration ranged from 2–3 g/l, concentration of yeast autolysate 3 g/l

Fermentačné parametre ¹	<i>S. cerevisiae</i> OHF				<i>S. cerevisiae</i> Alltech				<i>S. cerevisiae</i> Pz 90			
	počiatočná koncentrácia glukózy ² [g/l]											
	250	300	350	400	250	300	350	400	250	300	350	400
Maximálna dosiahnutá koncentrácia etanolu ³ [g/l]	94,98	89,76	92,63	67,46	75,27	72,19	68,25	62,73	89,24	85,74	89,31	74,40
Výtťažok etanolu z max. teoretického množstva ⁴ [%]	74,3	58,5	51,8	33,0	58,9	47,1	38,1	30,7	69,8	55,9	49,9	36,4
Stupeň využítácie glukózy ⁵ [%]	79	71	67	51	63	56	48	40	80	79	69	48
Výtťažok biomasy z max. teoretického množstva ⁶ [%]	4,7	3,9	3,4	4,8	5,1	5,2	3,8	4,6	6	3,4	3,2	3,6
Výtťažkový koeficient etanolu z glukózy ⁷ [g/g]	0,465	0,398	0,381	0,341	0,448	0,431	0,438	0,391	0,419	0,348	0,407	0,375
Energia bazálneho metabolizmu ⁸ [g/g/h]	0,044	0,108	0,159	0,239	0,02	0,036	0,035	0,133	0,05	0,152	0,092	0,138
Viabilita na začiatku fermentácie ⁹ [%]	90	86	86	86	87	87	87	87	89	89	89	89
Viabilita na konci fermentácie ¹⁰ [%]	47	69	73	70	68	59	56	35	50	47	46	44

¹fermentation parameters; ²initial glucose concentration; ³maximum achieved ethanol concentration; ⁴ethanol yield from max. theoretical quantity; ⁵degree of glucose utilization; ⁶biomass yield from max. theoretical quantity; ⁷coefficient of ethanol yield from glucose; ⁸energy of basal metabolism; ⁹viability at the beginning of fermentation; ¹⁰viability at the end of fermentation

koncentrácia naprodukovaného etanolu (až 74,4 g/l) pozorovaná pri fermentácii s kmeňom Pz 90 (tab. 3).

Pri nižších koncentráciách glukózy vo fermentačnom médiu (250–350 g/l) bola najvyššia produktivita etanolu (1,76, resp. 1,78 g/l/h) stanovená pri fermentáciách s kmeňom OHF (obr. 2). Pri koncentrácii glukózy 400 g/l v porovnaní s fermentáciami pri nižších koncentráciách produktivita etanolu výrazne poklesla. Najvyššia produktivita etanolu, až 1,38 g/l/h, bola pri tejto koncentrácii glukózy dosiahnutá pri kmeni Pz 90.

Energia bazálneho metabolizmu predstavuje tú časť zo spotrebovanej glukózy, ktorá nebola použitá na tvorbu etanolu ani biomasy, ale na udržanie životných pochodov bunky. Jej hodnota v prípade všetkých testovaných kmeňov kvasiniek rástla so zvyšovaním koncentrácie glukózy v médiu. Najvyššia hodnota bola dosiahnutá pri kmeni OHF, kedy sa energia bazálneho metabolizmu zvýšila z hodnoty 0,044 g/g.h (pri koncentrácii glukózy 250 g/l) na 0,239 g/g.h (pri koncentrácii 400 g/l).

Porovnaním produktív jednotlivých etanolových fermentácií testovaných kmeňov bol ako kmeň vhodný pre skvasovanie vysoko koncentrovaných substrátov vybraný liehovarský kmeň kvasiniek *S. cerevisiae* Pz 90. Pri kmeni Alltech boli pozorované nižšie produktivity a aj nižšie koncentrácie naprodukovaného etanolu v porovnaní s kmeňom Pz 90. Pri nižších koncentráciách glukózy (250 až 350 g/l) mali kmene OHF a Pz 90 porovnateľné maximál-

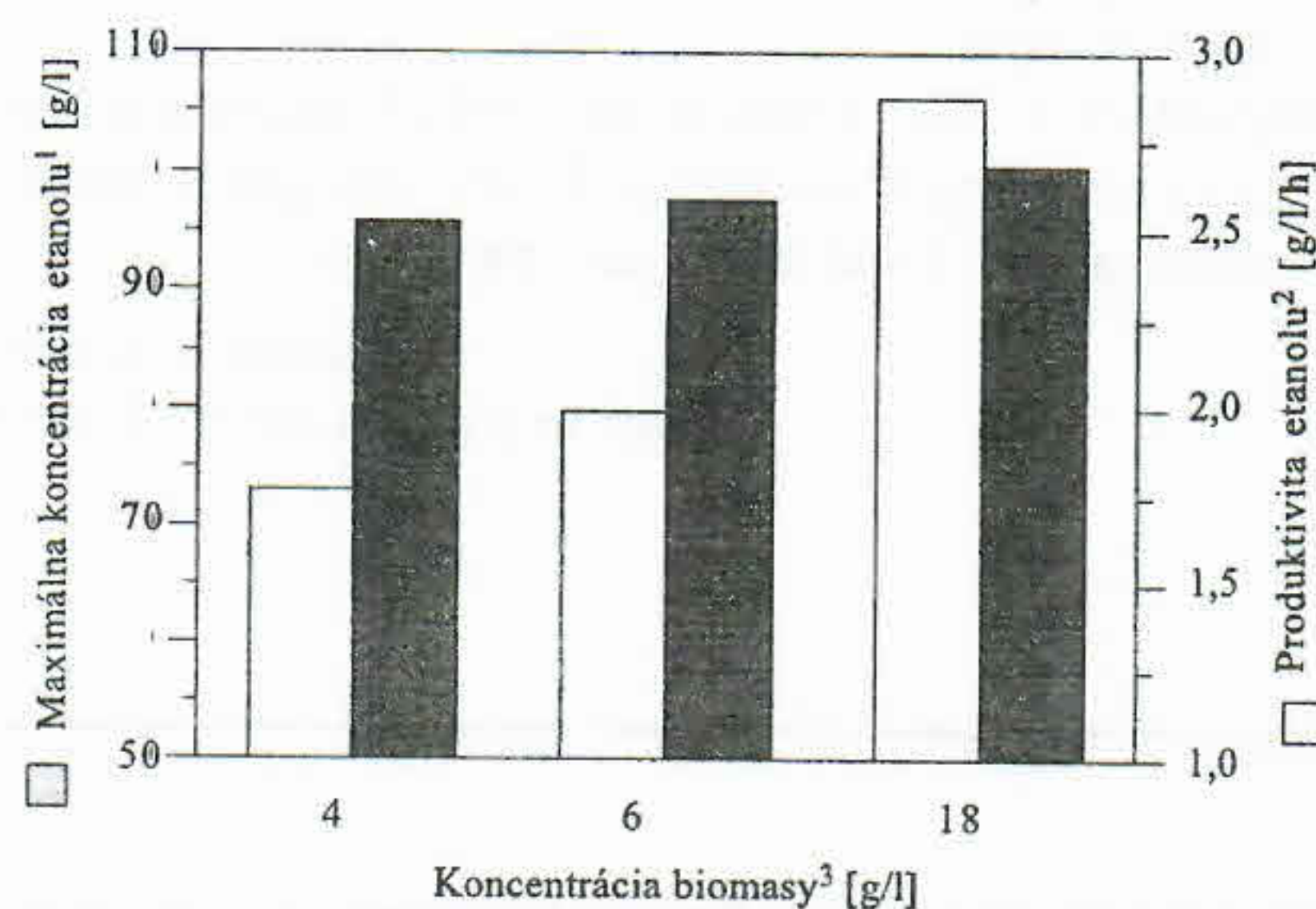
ne dosiahnuté koncentrácie etanolu a produktivity etanolu. Avšak pri koncentrácii 400 g/l glukózy v médiu bola pri kmeni Pz 90 dosiahnutá najvyššia koncentrácia etanolu 74,40 g/l a najvyššia produktivita etanolu 1,38 g/l/h. Stupeň využitia glukózy bol v tomto prípade 48 %. Dobrá fermentačná aktivita pri vysokých koncentráciách glukózy v médiu bola rozhodujúcim výberovým kritériom.

Vplyv zvýšenej koncentrácie biomasy

Zvýšená koncentrácia buniek má pozitívny vplyv na priebeh etanolovej fermentácie. THOMAS a INGLEDEW (1992) uvádzajú, že pri vysokých inokulačných dávkach je možné dosiahnuť koncentráciu etanolu až 21,5 % obj., a to aj bez zvýšeného obsahu kvasničného extraktu alebo iných živín. Použitím vysokej koncentrácie buniek sa dá dosiahnuť zvýšenie rýchlosti etanolovej fermentácie a hĺbky prekvasenia aj pri teplotách nad 40 °C (D'AMORE *et al.* 1989). Porovnaním produkcie etanolu rôznymi koncentraciami biomasy možno získať informácie o vhodnosti využívania vysokých koncentrácií buniek pri VHGF-fermentáciách.

Etanolové fermentácie prebiehali pri koncentráciách biomasy 4, 6 a 18 g/l v médiách s koncentraciou glukózy 300 g/l a so zvýšenou koncentraciou zdroja dusíka vo forme kvasničného autolýzátu (12 g/l). Maximálna koncentrácia etanolu bola pri koncentrácii biomasy 18 g/l dosiahnutá už v 35. h, pri 6 g/l v 46. h, a pri 4 g/l až v 52. h fermentácie (obr. 3). Najvyššia koncentrácia naproduko-

vaného etanolu 100,6 g/l (čo zodpovedá 12,75 % obj.) bola stanovená pri koncentrácii biomasy 18 g/l. Maximálna produktivita etanolu (2,87 g/l.h) bola tiež dosiahnutá v médiu s najvyššou koncentráciou biomasy, čo v porovnaní s produktivitou pri koncentrácii 4 g/l predstavuje zvýšenie o 38 %. Stupeň využitia glukózy bol pri koncentrácii 4 g/l biomasy vo fermentačnom médiu 97 % a pri koncentraciách 6 a 18 g/l až 99 % (tab. 4).



¹maximum ethanol concentration; ²ethanol productivity; ³biomass concentration

Obr. 3. Závislosť maximálnej koncentrácie etanolu a produktivity etanolu od koncentrácie biomasy vo fermentačnom médiu pri vsádzkových fermentáciách s kvasinkami *S. cerevisiae* Pz 90 – Relation between maximum ethanol concentration and ethanol productivity, and biomass concentration in fermentation medium during batch fermentations with the yeasts *S. cerevisiae* Pz 90

Pri zvýšenej koncentrácii biomasy a zvýšenom prídavku kvasničného autolýzátu 12 g/l (tab. 4) bol oproti fermentácii s koncentráciou biomasy 2–3 g/l a kvasničného autolýzátu 3 g/l (tab. 3) s kmeňom Pz 90 dosiahnutý vyšší výťažok biomasy z teoretického množstva. Jeho hodnota stúpala z 3,4 % (tab. 3) na 7,6 % pri počiatočnej koncentrácii biomasy 4 g/l, resp. na 6,3 a 8,2 % pri koncentraciách biomasy 6 a 18 g/l (tab. 4). Zvýšená koncentrácia kvasničného autolýzátu sa prejavila aj zvýšením stupňa využitia glukózy, koncentrácie vyprodukovaného etanolu a výťažku etanolu z maximálneho teoretického množstva etanolu počítaného na počiatočnú koncentráciu glukózy.

Porovnaním parametrov jednotlivých fermentácií možno konštatovať, že zvýšená počiatočná koncentrácia biomasy sa výrazne neprejavila na výťažku etanolu z teoretického množstva etanolu počítaného na počiatočnú koncentráciu glukózy, stupni využitia glukózy a na výťažkovom koeficiente etanolu zo spotrebovanej glukózy. Množstvo naprodukovaného etanolu sa zvýšilo iba o 5 % (z 95,78 na 100,60 g/l). Zvýšená koncentrácia biomasy (18 g/l) mala však pozitívny vplyv na rýchlosť fermentácie, čo sa prejavilo zvýšenou produktivitou etanolu (2,87 g/l/h) v porovnaní s ostatnými testovanými koncentraciami buniek (4 a 6 g/l).

Tab. 4. Parametre etanolovej fermentácie kvasinkami *S. cerevisiae* Pz 90 pri rôznych koncentraciách biomasy (4, 6 a 18 g/l). Počiatočná koncentrácia glukózy 300 g/l a kvasničného autolýzátu 12 g/l – The parameters of ethanol fermentation with the yeasts *S. cerevisiae* Pz 90 at different biomass concentrations (4, 6 and 18 g/l). Initial glucose concentration 300 g/l, concentration of yeast autolysate 12 g/l

Fermentačné parametre ¹	Počiatočná koncentrácia biomasy ² [g/l]		
	4	6	18
Maximálna dosiahnutá koncentrácia etanolu ³ [g/l]	95,78	97,68	100,6
Výťažok etanolu z max. teoretického množstva ⁴ [%]	62,4	63,7	65,6
Stupeň využitia glukózy ⁵ [%]	97	99	99
Výťažok biomasy z max. teoretického množstva ⁶ [%]	7,6	6,3	8,2
Výťažkový koeficient etanolu z glukózy ⁷ [g/g]	0,321	0,317	0,324
Energia bazálneho metabolizmu ⁸ [g/g/h]	0,132	0,123	0,063
Viabilita na začiatku fermentácie ⁹ [%]	97	97	97
Viabilita na konci fermentácie ¹⁰ [%]	13	16	18

¹fermentation parameters; ²initial biomass concentration; ³maximum achieved ethanol concentration; ⁴ethanol yield from max. theoretical quantity; ⁵degree of glucose utilization; ⁶biomass yield from max. theoretical quantity; ⁷coefficient of ethanol yield from glucose; ⁸energy of basal metabolism; ⁹viability at the beginning of fermentation; ¹⁰viability at the end of fermentation

Práca bola zameraná na skríning kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, určených pre VHG fermentáciu. Spomedzi 35 testovaných kultúr boli vybrané tri najvhodnejšie, ktoré by však mali byť ďalej šľachtené, aby boli dosiahnuté fermentačné parametre vhodné aj pre praktické využitie. Zvýšenie výťažkov etanolu a produktivity by bolo možné dosiahnuť aj použitím recyklu biomasy, alebo fed-batch systému. Významný stimulačný efekt na priebeh fermentácie má aj obohatenie kultivačného média o rôzne výživové doplnky a protektívne látky (BAFRNCOVÁ *et al.* 1999).

Literatúra

- BAFRNCOVÁ P., ŠMOGROVIČOVÁ D., SLÁVIKOVÁ I., PÁTKOVÁ J., DÖMÉNY Z. (1999): Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 10: 337–341.
- D'AMORE T., CELOTTO G., RUSSELL I., STEWART G. G. (1989): Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 11: 411–416.

- D'AMORE T., PANCHAL C. J., RUSSELL I., STEWART G. G. (1990): A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **9**: 287–304.
- D'AMORE T., STEWART G. G. (1987): Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**: 322–330.
- HARALDSON Å., BJÖRLING T. (1981): Yeast strains for concentrated substrates. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**: 34–38.
- JONES R. P. (1988): Intracellular ethanol-accumulation and exit from yeast and other cells. *FEMS Microbiol. Rev.*, **54**: 239–258.
- OLSON B. H., JOHNSON M. J. (1949): Factors producing high yeast yields in synthetic media. *J. Bacteriol.*, **57**: 235–246.
- THOMAS K. C., HYNES S. H., INGLEDEW W. M. (1996): Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentations. *Process Biochem.*, **31**: 321–331.
- THOMAS K. C., HYNES S. H., JONES A. M., INGLEDEW W. M. (1993): Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: Effect of sugar concentration and fermentation temperature. *Appl. Biochem. Biotech.*, **43**: 211–225.
- THOMAS K. C., INGLEDEW W. M. (1990): Fuel alcohol production: Effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2046–2050.
- THOMAS K. C., INGLEDEW W. M. (1992): Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *J. Ind. Microbiol.*, **10**: 61–68.

Došlo 8. 3. 1999

Přijaté na publikovanie 11. 5. 1999

Kontaktná adresa:

Ing. PETRA BAFRNCOVÁ, Slovenská technická univerzita, Chemickotechnologická fakulta, Katedra biochemickej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, tel.: + 421 7 59 32 54 86, tel./fax: + 421 7 52 96 70 85, e-mail: bafrn@chtf.stuba.sk
