

**Rast kvasca *Trichosporon cutaneum* na deproteiniziranoj sirutki
u šaržnom i kontinuiranom uzgoju
(Yeast *Trichosporon cutaneum* on deproteinized Whey in
Batch-wise and continued Cultivation)**

Dr Slobodan GRBA, mr Vesna STEHLIK-TOMAS, Prehrambeno-biotehnološki
fakultet, Zagreb

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper

UDK: 637.344:579.24

Prispjelo: 28. 2. 1986.

Sažetak

Iz sirutke izdvojen kvasac *Trichosporon cutaneum* uzgaja se šaržno i kontinuirano u deproteiniziranoj sirutki pri pH 4,5 — 5,0 i temperaturi od 32 °C na tresilici i u laboratorijskom bioreaktoru.

Uz dodatak diamonijevog sulfata i kalijevog hidrogen fosfata deproteiniziranoj sirutki, kvasac *Trichosporon cutaneum* se dobro razmnožava pri svim istraživanim koncentracijama laktoze, a najbolja produktivnost procesa postiže se u podlozi sa 4% laktoze.

Stupanj konverzije laktoze u kvašćevu biomasu pri odabranim parametrima je 0,48 — 0,60, specifična brzina rasta do 0,26 sat⁻¹, a produktivnost procesa do 1,5 g/dm³/sat. Uz dodatak 0,1% kvašćevog ekstrakta osnovnoj podlozi, povećala se specifična brzina rasta na 0,30 sat⁻¹ i produktivnost procesa na 2,4 g/dm³/sat.

Slični rezultati (0,32 sat⁻¹ i 2,5 g/dm³/sat) se postižu kada se sirutka razrjeđuje mešasnom džibrom umjesto vodom.

Summary

Yeast *Trichosporon cutaneum* isolated from the whey has been cultivated on the rotary shaker and batch-wise or continuously in the laboratory bioreactor.

Yeast *T. cutaneum* grew well at all studied concentrations of lactose in substrate, but the highest productivity of the process was achieved with 0,48 — 0,60 g DM/g lactose with the specific growth rate of 0,26 h⁻¹ and the productivity of 1,5 g/dm³/h.

If 0,1% of the yeast extract was added to the basic medium, specific growth rate rised to 0,30 h⁻¹ and the productivity rised up to 2,4 g/dm³/h. Similar results (0,32 h⁻¹ and 2,5 g/dm³/h) may be achieved when the water necessary for whey dilution was exchanged with molasses slop.

Uvod

Za uspješan tehnološki proces mlijeka važno je da se proizvedu visokokvalitetni proizvodi i da se iskoriste nusproizvodi. Zato je u mljekarama korištenje sirutke postalo neobično važno. Iako se sirutka kao ekonomičan postupak, najčešće koristi za tov prasadi, u transportu na veće udaljenosti ograničena je zbog velike količine vode. Zbog toga su razrađeni mnogi procesi za njenu preradu (2, 9, 11). S obzirom na nedostatak proteinske hrane i na ograničenu mogućnost korištenja sirutke u ishrani prasadi, posebno su zanimljivi procesi pretvorbe laktoze iz sirutke u visokovrijednu mikrobnu biomasu.

U našem prethodnom radu (4) opisali smo proizvodnju mikrobnih proteina pomoću kvasca *Kluyveromyces fragilis*. U novije se vrijeme u proizvodnji mikrobnje biomase na sirutki sve češće spominje kvasac *Trichosporon cutaneum* koji metabolizira laktozu u vlastitu biomasu striktno oksidativnim putem. Taj kvasac se brzo razmnožava, pri pH 4,0, a to je istovremeno zaštita od bakterijske kontaminacije.

Halter et al. (5) (1983) su iscrpno opisali proces proizvodnje kvasca *T. cutaneum* na permeatu sirutke koji zaostaje nakon ultrafiltracije. Nakon poluindustrijskih procesa zaključili su da se semikontinuirani proces uzgoja kvasca *T. cutaneum* može voditi u neaseptičnim uvjetima pri pH 4 i 30 °C. Proizvodna cijena osušenog kvasca bila je niska. Proces je ekonomičan pogotovo ako se permeat mora obraditi prije ispuštanja u prirodne vodotoke. Osušena biomasa kvasca koristi se za ishranu stoke. Kod nas mljekare još uvijek sirutku ispuštaju s otpadnim vodama u sistem gradske kanalizacije ili u prirodne vodotoke. Zbog vrijednih organskih komponenata koje sadrži sirutka, kao što je na primjer laktoza, u ovom radu ispitan je uzgoj kvasca *T. cutaneum* na deproteiniziranoj sirutki sa različitim dodacima s namjerom da se pronade postupak koji bi omogućio jeftinu proizvodnju vrijedne mikrobnje biomase.

Materijali i metode

Mikroorganizmi

Za pokuse je odabran kvasac *Trichosporon cutaneum* izoliran iz kisele sirutke i determiniran u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i biološku obradu otpadnih voda na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Kultura kvasca održavana je na kosom sladnom agraru, u hladnjaku pri 2–4 °C.

Priprema inokuluma

Sa kosog agrara kvasac je precijepljen u epruvete koje su sadržavale po 10 ml tekuće sterilne podloge ovog sastava (u g/dm³): glukoza —20, Bacto pepton —10, kvašćev ekstrakt —5. Nakon inkubacije u termostatu pri 28 °C u toku 48 sati, cjepivo je prebačeno u tikvice od 500 ml koje su sadržavale po 100 ml sterilne razrijeđene sirutke slijedećeg sastava (u g/dm³): laktoza —20, (NH₄)₂SO₄ —2, kvašćev ekstrakt —1, mlječna kiselina —5. Tikvice su se tresle na rotacionoj tresilici 24 sata pri 30 °C i 150 o/min. Tako pripremljena kultura kvasca poslužila je kao inokulum za pokuse uzgoja kvasca u laboratorijskom reaktoru.

Rast kvasca *Trichosporon cutaneum* na ...

Uzgoj u biokemijskom reaktoru

Šaržni i kontinuirani uzgoj biomase kvasca *T. cutaneum* obavljen je u laboratorijskom reaktoru Vogelbusch (Austrija) od 5 litara (3 litre korisni volumen). Temperatura se regulirala uz pomoć ultra termostata, a pH i pjena su se korigirali ručno. Za mjerenje otopljenog kisika u kulturi uzeta je kisikova elektroda priključena na instrument OXI 39 WTW (Zapadna Njemačka).

Osnovni supstrat bila je deproteinizirana razrjeđena sirutka, a kao dodatni izvor dušika i fosfora uzete su soli diamonijev sulfat i kalijev dihidrogen fosfat.

Uzgoj je obavljen na slijedećim podlogama ovog sastava:

1. osnovna sirutka razrjeđena vodom u željenom omjeru, diamonijev sulfat 2 g/dm³, kalijev dihidrogen fosfat 1 g/dm³
2. sirutka razrjeđena vodom u omjeru 1 : 1, 2 g/dm³ diamonijev sulfat, 1 g/dm³ kalijev dihidrogen fosfat i 0,1% kvašćev ekstrakt
3. sirutka razrjeđena melasnom džibrom u omjeru 1 : 1, diamonijev sulfat 2 g/dm³ i kalijev dihidrogen fosfat 1 g/dm³.

Podloga se sterilizirala direktno u bioreaktoru ili u staklenim posudama od 5 litara, u autoklavu 20 minuta pri 120 °C.

Kontinuirani uzgoj kvasca *T. cutaneum* proveden je u jednostepenom ke-mostatu, gdje je podloga za prtok pumpana u bioreaktor peristaltičkim pumpama. Sterilnost se kontrolirala mikroskopski.

Analitičke metode

Sastav nativne sirutke i deproteinizirane sirutke određen je analitičkim metodama prilagođenim za sirutku (Vajić, 1960). Laktoza se određivala anthron reagensom. Čisti proteini određivani su BIORAD metodom. KPK se analizirao metodom oksidacije s K₂Cr₂O₇ (APHA STANDARD, 1971).

Da bi se pratio prirast biomase kvasca, uzimali su se u određenim vremenskim razmacima dvostruki uzorci od 5 ml komine i centrifugirali 5 minuta pri 4000 o/min. Jednom su bili oprani vodom i osušeni pri 105 °C do konstantne težine.

Rezultati i diskusija

Sastav deproteinizirane sirutke

Za sve pokuse koristila se deproteinizirana sirutka iz RO »DUKAT« — ZAGREE.

Sirutka se deproteinizirala termički pri 100 °C, u toku 30 minuta. Nakon hlađenja koagulirani proteini su odfiltrirani na filter papiru Whatman No 1., a tekući dio korišten je za daljnje pokuse. Prosječni kemijski sastav deproteinizirane sirutke prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Sastav deproteinizirane sirutke
Table 1. Composition of deproteinized Whey

Komponente	g/dm ³
Suha tvar Dry matter	56,7—62,8
Organska tvar Organic matter	50,4—56,5
Anorganska tvar Anorganic matter	5,25—6,28
Laktoza Lactose	38,2—44,0
Čisti proteini Pure proteins	0,3— 0,5
Ukupni fosfati (P ₂ O ₅) Total phosphate	0,11—0,17
KPK COD	58,8—63,2
pH	4,3— 4,8

Utjecaj koncentracije laktoze na kinetiku procesa

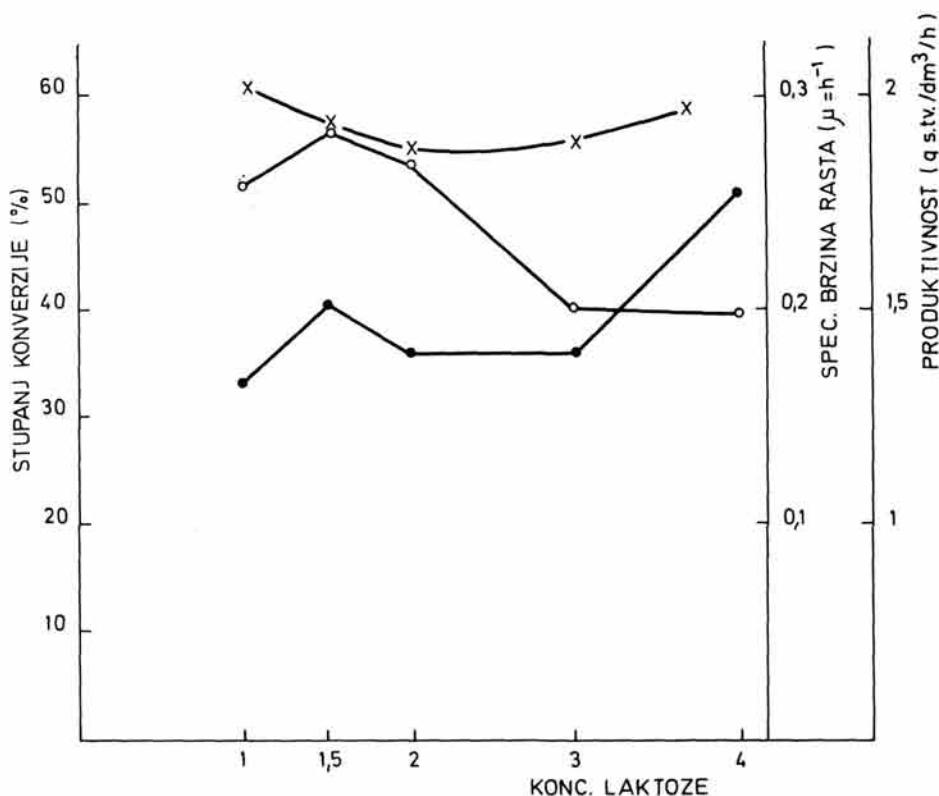
Utjecaj količine laktoze u podlozi na kinetiku procesa prikazan je na slici 1. Sirutka je razrijeđena sa vodom u omjerima, da bi se postigla koncentracija laktoze u podlogama 1, 1,5, 2, 3 i 4 g/dm³ i dodaju se soli diamonijev sulfat i kalijev dihidrogen fosfat proračunate prema razrjeđenosti sirutke.

Slika prikazuje da je najveća brzina rasta od 0,34⁻¹ postignuta u podlozi sa 1% laktoze, a najveći stupanj konverzije laktoze u biomasi bio je u podlozi sa 1,5% laktoze (0,50 g s.tv./g. laktoze), vjerojatno zbog toga što se jedan dio laktoze troši na održavanje energije. Produktivnost procesa najbolja je u podlozi sa 4% laktoze (1,75 g s.tv./dm³/h). Soj kvasca *T. cutaneum* ima isključivo asimilacijske sposobnosti pa bi se zbog toga bolje mogle koristiti podloge s većom koncentracijom laktoze, gdje je produktivnost procesa veća. Ako se željenoj podlozi doda 0,1% kvašćevog ekstrakta, povećava se brzina umnožavanja kvašćevih stanica. To je prikazano na slici 2.

Iz slike se vidi da se dodatkom kvašćevog ekstrakta povećava specifična brzina rasta kvašćevih stanica za 95% i produktivnost procesa za 63%. Vrijeme kultivacije kvasca *T. cutaneum* znatno je smanjeno i uzgojem na podlozi s kvašćevim ekstraktom (podl. 2). Stimulirajući efekt kvašćevog ekstrakta na rast stanica kvasca postiže se zbog potrebe kvasaca za tvarima rasta i mineralnim tvarima koje sadrži kvašćev ekstrakt. Međutim, ta je sirovina skupa pa se pokušalo pronaći sirovinu koja bi imala sličan učinak na proizvodnju kvašćeve biomase na sirutki.

Pretpostavlja se da bi melasna džibra mogla imati pozitivan učinak na kultivaciju kvasca u sirutki, jer u svom sastavu ima mnoštvo mineralnih tvari, tvari rasta i organskih spojeva koje kvasac može asimilirati.

Rast kvasca *Trichosporon cutaneum* na ...



Sl.1. Ovisnost stupnja konverzije laktoze u biomasu, specifične brzine rasta kvasca *T. cutaneum* i produktivnost procesa o koncentraciji laktoze u podlozi.

- o-o- stupanj konverzije
- x-x- specifična brzina rasta
- produktivnost procesa

Fig. 1. Effect of Lactose Concentration on biomass Yield, specific Growth Rate of *T. cutaneum* and the Productivity of the Process.

- o-o- Conversion
- x-x- Specific Growth Rate
- Productivity

Utjecaj melasne džibre na kinetiku rasta *T. cutaneum* prikazan je na slici 3. Umjesto vodom, sirutka je razrijeđena melasnom džibrom. Takvoj podlozi dodane su samo aminijeve soli.

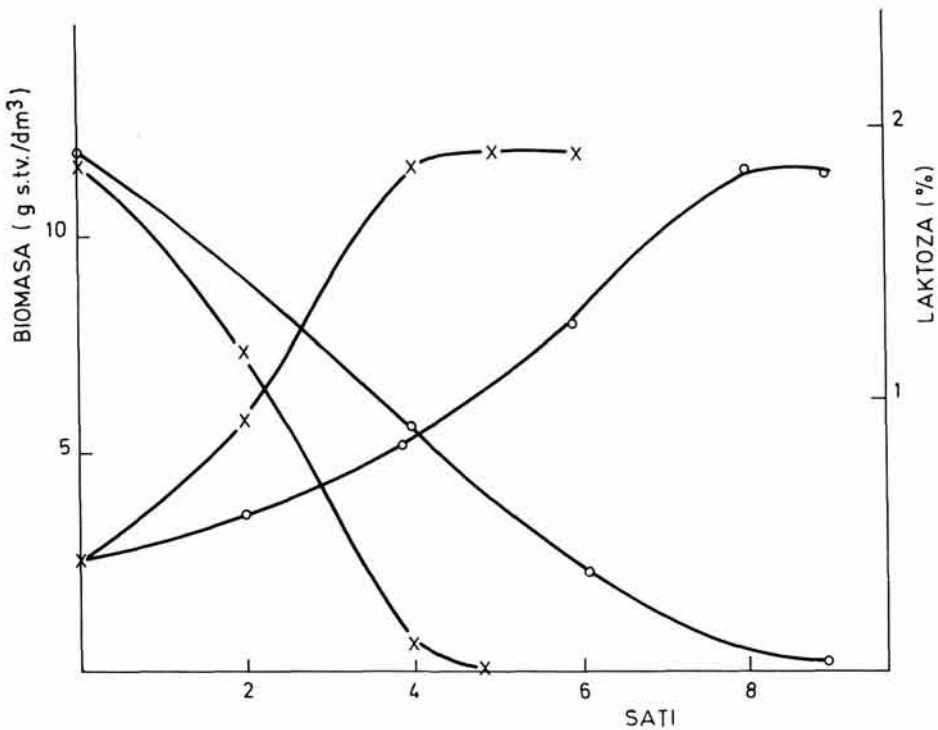
Iz slike se vidi da se prinos biomase povećao za 2,0—2,5 g s.tv. kvasca u odnosu na dva prethodna uzgoja te da se kvašćeve stanice razmnožavaju brzo ($\mu = 0,32 \text{ sat}^{-1}$).

Usporedni prikaz uzgoja kvasca *T. cutaneum* na podlogama 1, 2 i 3 prikazuje tablica 2.

Tablica 2. Usporedni prikaz uzgoja kvasca *T. cutaneum* na podlogama 1, 2 i 3.

Table 2. Parallel Review of the Yeast Growing in Medium 1, 2 and 3

Podloga	Stupanj konverzije laktoze u biomasu ($y = \frac{x}{s}$)	Specifična brzina rasta ($u = \text{sat}^{-1}$)	Produktivnost procesa ($\text{g/dm}^3/\text{h}$)
Substrate	Lactose Conversion to Biomass	Specific growth rate	Productivity of the Process
1	0,45	0,18	1,1
2	0,50	0,28	1,6
3	0,59	0,31	2,0

Sl. 2. Promjene koncentracije biomase i laktoze u toku kultivacije kvasca *T. cutaneum* u podlozi br. 1 i podlozi br.2.

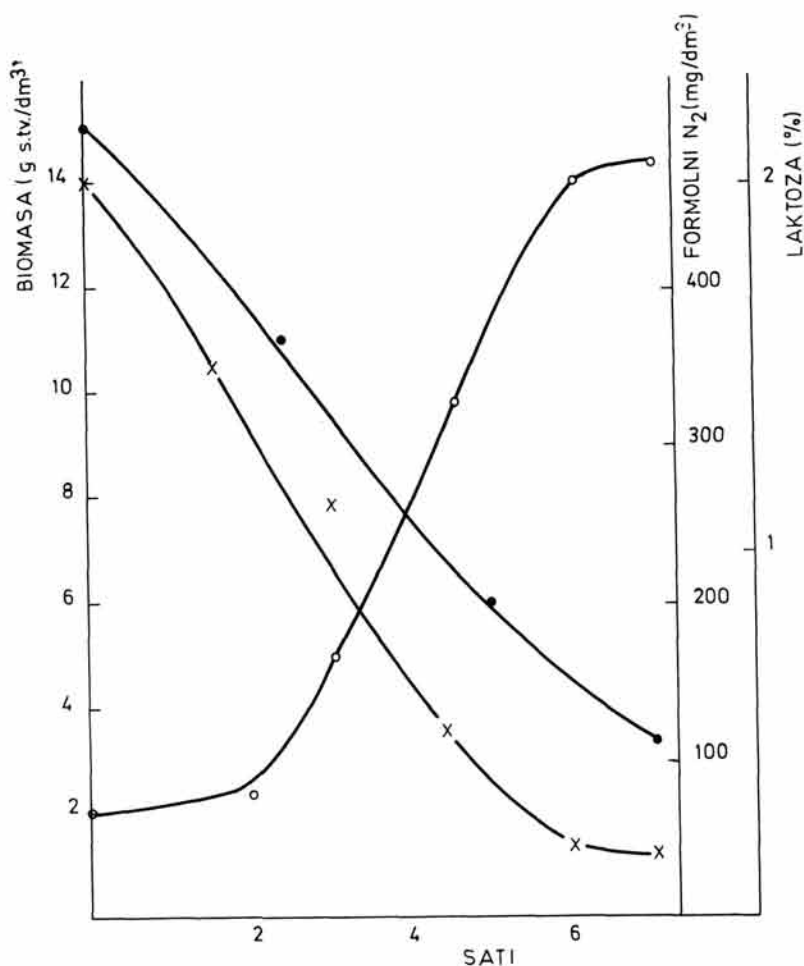
- x-x- koncentracija biomase i laktoze u podlozi br.2.
- o-o- koncentracija biomase i laktoze u podlozi br.1.

Fig.2. Changes of Biomass and Lactose Concentrations during the Cultivation of *T. cutaneum* in Medium 1 and 2.

- x-x- Biomass and Lactose Concentration in Medium 1.
- o-o- Biomass and Lactose Concentration in Medium 2.

Rast kvasca *Trichosporon cutaneum* na ...

Iz tablice 2. se vidi da su najbolji stupanj konverzije laktoze u biomasu, specifična brzina rasta i produktivnost procesa postignuti uzgojem kvasca *T. cutaneum* na podlozi gdje je sirutka razrijeđena melasnom džibrom u omjeru 1:1.



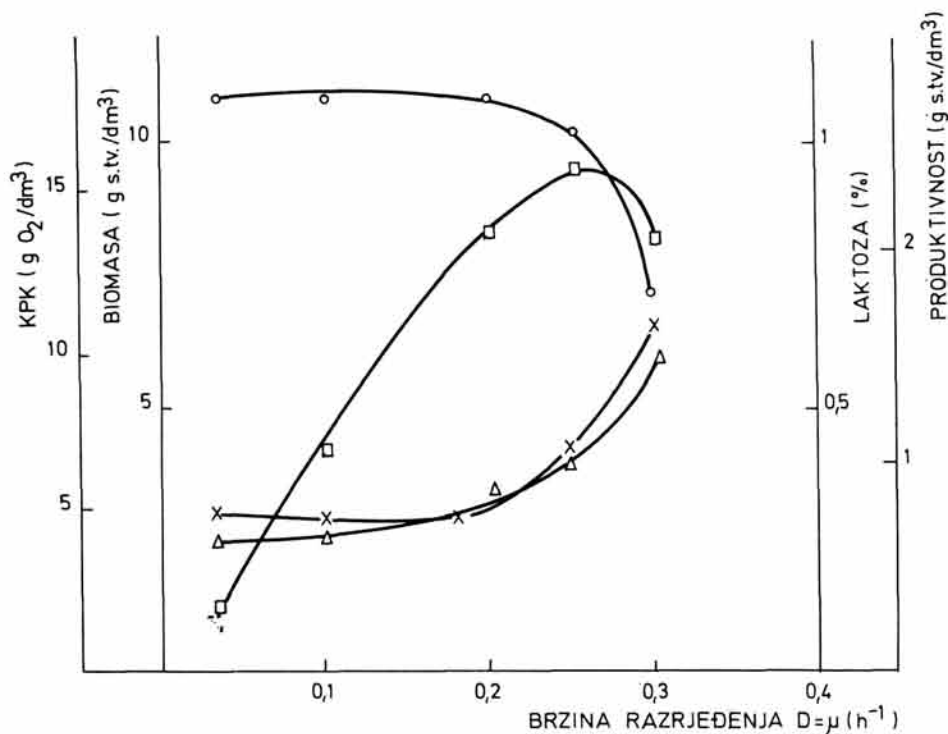
Sl. 3. Promjene koncentracije biomase, laktoze i formolnog dušika tokom kultivacije kvasca *T. cutaneum* u podlozi br.3.

- o-o- koncentracija biomase
- x-x- koncentracija laktoze
- koncentracija formolnog dušika

Fig.3. Changes of Biomass, Lactose and formol -N₂ Concentrations during the Cultivation of *T. cutaneum* in medium 3

- o-o- Biomass Concentration
- x-x- Lactose Concentration
- Formol - N₂ Concentration

Stimulirajući učinak melasne džibre na rast stanice kvasca postignut je vjerojatno zbog hranjivih tvari koje ona sadrži, kao što su preostali šećeri te spojevi s dušikom i mineralne tvari. U toku kontinuiranog uzgoja kvasca *T. cutaneum* u jednostepenom kemostatu i sa 2% laktoze u podlozi, istraženi su utjecaj brzine razrjeđenja na koncentraciju laktoze i kvašćeve biomase u reaktoru, produktivnost procesa uzgoja i KPK vrijednost efluenta nakon izdvajanja biomase. Povećanjem brzine razrjeđenja od $0,2 \text{ sat}^{-1}$ ne mijenja se ustaljeno stanje pa se u reaktoru održavaju stalne vrijednosti i koncentracije kvasca (11 g s.tv./dm^3) i laktoze (do $0,3\%$).



Sl. 4. Utjecaj razrjeđenja (D) na promjenu koncentracije biomase, laktoze i produktivnost procesa u toku kontinuiranog uzgoja kvasca *T. cutaneum*.

- o-o- koncentracija biomase
- x-x- koncentracija laktoze
- produktivnost procesa
- Δ-Δ- KPK vrijednost

Fig. 4. The Influence of Dilution Rate (D) on the biomass and Lactose Concentration and the Productivity of the continuous Cultivation of *T. cutaneum* in Medium 1

- o-o- Biomass Concentration
- x-x- Lactose Concentration
- Productivity
- Δ-Δ- COD

Rast kvasca *Trichosporon cutaneum* na . . .

KPK vrijednost efluenta prati promjenu koncentracije laktoze u reaktoru. Daljnjim povećanjem brzine razrjeđenja smanjuje se prinos biomase i povećava koncentracija laktoze. Međutim, s povećanjem brzine razrjeđenja, produktivnost procesa raste do kritične vrijednosti brzine razrjeđenja ($0,25 \text{ sat}^{-1}$), kada produktivnost doseže $2,3 \text{ g s.tv./dm}^3/\text{h}$.

Halter i sur. (1983) su, nakon prethodnih laboratorijskih pokusa proveli kontinuiranu fermentaciju s kvascem *T. cutaneum* i postigli slične rezultate.

Zaključak

Na temelju prikazanih rezultata zaključuje se da se kvasac *T. cutaneum* može uspješno uzgajati na kiseloj deproteiniziranoj sirutki. Najbolja brzina rasta postignuta je u podlozi sa $1 - 1,5\%$ laktoze, ali je produktivnost procesa najbolja u podlozi sa 4% laktoze.

Međutim, ako se osnovnoj podlozi doda $0,1\%$ kvašćevog ekstrakta ili ako se sirutka razredi melasnom džibrom umjesto vodom, znatno su poboljšani kinetika kvašćevih stanica, prinos biomase i produktivnost procesa.

Autori se zahvaljuju dr Berislavu Govorčinu, suradniku Laboratorija za tehnologiju vrenja i biološku obradu otpadnih voda na Prehrambeno-biotehno-
loškom fakultetu, na izdvajanju i određivanju kvasca *T. cutaneum* iz sirutke.

Literatura

1. American Public Health Yssociation, Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 13th ed., Amer. Public. Health Yssoc., New York, 1971.
2. BECHTLE, R. M. and CLAYDON, T. I. (1971): **J. Dairy Sci.** **54**, 1959.
3. BLAKEBROUGH, N. and MORESI, M. (1981): Second European Congress of Biotechnology, (5—10) Abstracts of Communications.
4. GRBA, S. i STEHLIK-TOMAS, V. (1985) **Mljekarstvo**, **5**, 138.
5. HALTER, N. and PUHAN, Z.: In Production and Feeding of single Cell Protein — Edited by M. P. Ferranti and A. Fiechter Zürich, 147, 1983.
6. MAIORELLA, B. L. and CASTILLO, F. J. (1984): **Proc. Biochem**, **8**, 157.
7. MORESI, M., COLICCHIO, A. and SALISOUINI, F. (1980): **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, **9**, 173.
8. SANDHU, D. K. and WARAICH, M. K. (1983): **Biotechnology and Bioengineering**, **25** (797—808).
9. VANANUVAT, P. and KINSELLA, J. E. (1975): **J. Food Sci.** **40**, 336.
10. VAJIĆ, B. (1960): Živežne namirnice — Određivanje osnovnih sastojaka (Skriptita), Zagreb.
11. WASSERMAN, A. E. (1961): **J. Dairy Sci.** **44**, 379.