



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

206 996

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Přihlášeno 29 10 79

(21) PV 7319-79

(51) Int. Cl. C 12 N 1/22

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 11 83

(75)
Autor vynálezu KUZMOVÁ ELENA ing., MAJERČÍKOVÁ DANIELA dipl. tech. a KRČMAŘ STANISLAV ing. CSc.
BRATISLAVA

(54) Spůsob fermentační přípravy bioproteinů sekvestrační fermentací živných médií

1

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy mikrobiálních proteinů na tekutých živných půdách, obsahujících jako zdroj uhlíka hydrolyzáty odpadných lignocelulózových materiálů, představujících zmes pentózových a hexózových monosacharidů, dále zdroj dusíka a fosforu.

Nevýhodou doterajšího fermentačního zpracování živných půd, obsahujících zmes pentózových a hexózových monosacharidů, je zpomalení růstu produkčního mikroorganismu, způsobené katabolickou represíou - růst mikroorganismů probíhá podle dvojstupňové růstové křivky, přičemž hexózy potlačují syntézu induktivních enzymů, nutných na rozštěpení pentóz. Pentózy se využívají až po indukční periodě, která je tím delší, čím vyšší je obsah monosacharidů v půdě. Fermentační zpracování takovýchto substrátů se potom stává neekonomické v důsledku vysoké energetické náročnosti /míchání, vzdušnění/ počas indukční periody.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob fermentační přípravy podle vynálezu, kterého podstata spočívá v tom, že v prvním stupni fermentace se využívají hexózy kultivací kmeňů *Candida robusta* CCY 29-14-2 a v druhém stupni se využívají pentózy kultivací kmeňů *Panizomyces variotii* CCM F-653.

Spůsob fermentační přípravy bioproteinů s využitím dvojstupňové sekvestrační fermentace hydrolyzátů odpadných lignocelulózových materiálů popisují následující

208 898
príklady:

P r í k l a d 1

Kmeňom *Candida robusta* CCY 29-14-2, adaptovaným na rast na hydrolyzátových pôdach, sa zaočkuje 2,5 % hydrolyzátový agar so zložením: celkové redukujúce látky /ďalej RL/ 1,5 %; KH_2PO_4 : 0,8 g/l; 26 % NH_4OH : 6 ml/l; pH 5,2. Kultivačné nádoby: 250 ml Erlenmayerove banky po 50 ml agaru; kultivácia: termostat 37 °C po dobu 48 hod. Vyrastená kultúra sa rozsuspenderuje v tekutej hydrolyzátovej pôde so zložením: celkové RL: 4 %; KH_2PO_4 : 0,8 % 1/1,5 % RL; 26 % NH_4OH : 5 ml/l; pH = 4,6 a použije sa ako inokulum pre fermentáciu v 5 l laboratórnom fermentéri, plnenom 3 l hydrolyzátovej fermentačnej pôdy rovnakého zloženia, pričom množstvo inokula je 0,27 % ako sušina. Pri miešaní 550 ot/min a vzdušnení 3,5 l/objem/min sa v 24 hod. batch-fermentácii spotrebuje 1,5 % RL a vyprodukuje sa 7,6 g sušiny biomasy/l so zložením: popol: 8,8 %; celkový N: 5,96 %; bielkoviny /N x 6,25/: 37,25 %. Vyfermentovaná pôda sa použije jednak na prípravu inokula *Paecilomyces variotii* Bainier 9N, /CCM F-653/, jednak na druhý stupeň sekvestračnej fermentácie. Inokulum sa pomnoží na agare, pripravenom úpravou pH vyfermentovanej pôdy z hodnoty 4,6 na hodnotu 5,2 26 % NH_4OH a jej stužením 2,5 % agaru. Takto pripravený agar sa rozleje do 250 ml Erlenmayerových baniek po 50 ml/ 1 banka, zaočkuje sa kmeňom *P. variotii* CCM F-653 a kultivuje sa v termostate pri 37 °C po dobu 48 hod. Vytvorené spóry boli spláchnuté do tekutej hydrolyzátovej pôdy /vyfermentovaná pôda po prvom stupni fermentácie bez akejkoľvek ďalšej úpravy /po 5 ml/ 1 banka a takto získanou spórovou suspenziou boli v množstve 10 obj. % zaočkované 500 ml guľaté kultivačné banky so zarážkami, plnené 100 ml tekutej hydrolyzátovej pôdy. Po 72 hod. kultivácii na rotačnej trepačke, 220 ot/min pri 37 °C boli zvyškové RL: 0,12 %, pričom sa vyprodukovalo 18,0 sušiny biomasy/l /včítane sušiny inokula - 1,6 g/l/.

P r í k l a d 2

S kmeňom *Candida robusta* CCY 29-14-2 bol pripravený inokulačný materiál rovnakým spôsobom, ako bolo uvedené v príklade 1. Zloženie hydrolyzátovej pôdy pre fermentačnú prípravu biomasy na 5 l fermentéri LH Engineering, bolo nasledovné: celkové RL: 3,9 %; KH_2PO_4 : 0,8 g/l/1,5 % RL; 26 % NH_4OH : 5 ml/l; pH: 4,7. Touto pôdou bol naplnený fermentér v množstve 3,1 l a zaočkovaný inokulačnou suspenziou *C. robusta* v množstve 0,1 g/l ako sušina. Fermentácia bola vedená kontinuálne, zriedovacia rýchlosť: 0,15 h⁻¹, teplota 37 °C vzdušnenie 3,5 l/objem/min; miešanie 550 ot/min. V 44 hod. kontinuálnej fermentácie /z toho 24 hod. batch-fáza, 20 hod. kontinuálna fáza/ klesli celkové RL na hodnotu 2,4 %, pričom sa vyprodukovalo v kontinuálnej fáze 6,9 g sušiny biomasy /l s nasledovným zložením: popol: 8,3 %, celkový N: 6,45 %; bielkoviny /N x 6,25/: 40,4 %. Vyfermentované médium po odseparovaní biomasy *C. robusta* bolo potom použité bez akejkoľvek nasledujúcej úpravy ako fermentačná pôda pre druhý stupeň fermentácie s použitím kmeňa *Paecilomyces variotii* Bainier 9N /CCM F-653/. Inokulum *P. variotii* bolo v prvom stupni pomnožené rovnakým spôsobom, ako je uvedené v príklade 1. V druhom stupni bolo pomnožené zaočkovaním fermentačnej pôdy v 500 ml guľatých bankách so zarážkami /po 100 ml pôdy/1 banka/ spórovou suspenziou /10 obj. %/ a 48 hod. kultiváciou na rotačnej trepačke s 220 ot/min pri

37 °C. Takto vytvorená biomasa bola použitá ako inokulum /10 obj. %/ pre druhý stupeň fermentácie na 5 l laboratórnom fermentéri LH Engineering. Druhý stupeň fermentácie bol periodický a pri miešaní 350 ot/min a vzdušnení 3,5 l/obj./min pri teplote 37 °C v 33 hod. fermentácii klesli celkové RL na hodnotu 0,11 %, pričom sa vytvorilo 14,2 g/l sušiny biomasy /včítane sušiny inokula - 1,0 g/l/ s nasledujúcim zložením: popol: 9,0 %; celkový N: 5,1 %; bielkoviny /N x 6,25/: 31,9 %. V priebehu fermentácie sa regulovala hodnota pH prídavkom 26 % NH_4OH .

P r í k l a d 3

Inokulum *Candida robusta* CCY 29-14-2 bolo v prvom stupni pomnožené rovnako, ako je uvedené v príklade 1. Po 48 hod. kultivácii v termostate sa vytvorená biomasa rozsuspenderuje v tekutej fermentačnej pôde so zložením: celkové RL: 1,9 %; KH_2PO_4 : 0,8 g/l/1,5 % RL: 26 % NH_4OH : 15 ml/l; pH = 4,7 a pomnoží sa v druhom stupni kultiváciou na 5 l laboratórnom fermentéri LH Engineering, plnenom 1500 ml fermentačnej pôdy rovnakého zloženia. Kultivácia sa vedie 24 hod. pri teplote 37 °C, miešaní 350 ot/min a vzdušnení 1,5 l/objem/min. Po 24 hod. kultivácii sa vytvorená biomasa odseparuje centrifugovaním, rozsuspenderuje sa v 100 ml fermentačnej pôdy rovnakého zloženia a použije sa ako inokulum pre prvý stupeň sekvestračnej fermentácie na 5 l laboratórnom fermentéri LH Engineering, plnenom 3 000 ml pôdy rovnakého zloženia, pričom množstvo inokula je 0,31 % ako sušina. Fermentácia bola vedená kontinuálne, zriedčovací rýchlosť $0,2 \text{ h}^{-1}$, teplota 37 °C, vzdušnenie 3,5 l/objem/min, miešanie 550 ot/min. V 54 hod. kontinuálnej fermentácii /z toho 24 hod. batch-fáza, 30 hod. kontinuálna fáza/ klesli celkové RL na hodnotu 0,98 %, pričom sa vytvorilo 4,2 g sušiny biomasy/l s nasledovným zložením: popol: 7,9 %; celkový N: 6,96 %; bielkoviny /N x 6,25/: 43,6 %. Vyfermentované médium po odseparovaní biomasy *C. robusta* bolo potom použité bez akýchkoľvek nasledujúcich úprav ako fermentačná pôda pre druhý stupeň fermentácie s použitím kmeňa *Paecilomyces variotii* Bainier 9N /CCM F-653/. Inokulum *P. variotii* bolo pripravené rovnakým spôsobom, ako je uvedené v príklade 2. Druhý stupeň fermentácie bol vedený periodicky na 5 l laboratórnom fermentéri LH Engineering, plnenom 3 200 ml pôdy a pri miešaní 350 ot/min, vzdušnení 3,5 l/objem/min, teplote 37 °C v 24 hod. fermentácii celkové RL klesli na hodnotu 0,08 %, pričom sa vytvorilo 10,0 g/l sušiny biomasy /včítane sušiny inokula - 1,1 g/l/ s nasledovným zložením: popol: 11,3 %; celkový N: 8,46 %; bielkoviny /N x 6,25/: 53,05 %. V priebehu fermentácie sa regulovala hodnota pH prídavkom 26 % NH_4OH .

výhodou spôsobu fermentačnej prípravy bioproteínov podľa vynálezu spočíva v tom, že sa skráti celková doba fermentácie, potrebná na čo možno najvyššiu utilizáciu prítomných RL, čím sa súčasne zníži spotreba energie, potrebná na miešanie a aeráciu. Celkové vyprodukované množstvo biomasy je pritom vyššie, než pri jednostupňovej fermentácii a obsah proteínov v sušine *P. variotii* je taktiež vyšší, než v *C. robusta*.

206 996

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob fermentačnej prípravy bioproteínov sekvestračnou fermentáciou živných pôd, obsahujúcich ako zdroj uhlíka hydrolyzáty odpadných lignocelulóзовých materiálov, vyznačujúci sa tým, že v prvom stupni fermentácie sa využívajú hexózy kultiváciou kmeňa *Candida robusta* CCY 29-14-2 a v druhom stupni sa využívajú pentózy kultiváciou kmeňa *Paecilomyces variotii* CCM F-653.