



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 198 690

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 04 04 78

(21) PV 2154-78

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 17 09 79

(45) Vydáno 15 04 82

(75)

Autor vynálezu RYBÁŘOVÁ JOHANNA, ing.,
ŠTROS FRANTIŠEK, ing.CSc.,
PECKA KAREL, doc.ing.CSc.,
RUT MILOSLAV, ing., PRAHA

(54) Způsob aerobní kultivace kvasinek

1

Vynález se týká aerobní kultivace kvasinek a především pak způsobu přidavku stopových prvků do kultivačního média.

Při aerobních kultivacích kvasinek je pro dosažení optimálních výsledků nutné, aby kultivační médium obsahovalo nejen potřebné množství biogenních prvků, ale i nepatrné množství některých dalších, tzv. stopových prvků. Význam stopových prvků neboli mikroelementů spočívá v tom, že jsou složkami některých koenzymů nebo se uplatňují jako aktivátory enzymů. Mezi nejvýznamnější stopové prvky patří například zinek, mangan, železo, kobalt, měď a další.

Při kultivacích kvasinek na klasických surovinách jako jsou melasa, melasové výpalky, sulfitové výluhy a podobně, nebyl přídavek stopových prvků do kultivačního média nutný, protože dostatečná množství těchto prvků obsahoval výchozí zdroj uhlíku, ředící voda, popřípadě minerální živiny technické čistoty. Některé stopové prvky se do média dostávají i následkem koroze fermentačního zařízení. Přejít na netradiční, například petrochemické suroviny, vyvinutí účinných větracích systémů umožňujících kultivace při vysokých koncentracích kvasničné sušiny a stále častější uplatňování kultivačních postupů s recirkulací odstředěného média způsobují, že množství stopových prvků, přecházejících do kultivačního média z přirozených zdrojů nedostačuje a musí být doplňováno.

V britském patentu č. 1 206 466, který chrání kultivace kvasinek na uhlovodících, se doporučuje přídavek solí zinku, manganu a železa. Při kultivacích kvasinek na etanolu se doporučuje v USA patentu č. 3 865 691 dávkování solí železa, manganu, zinku, molybdenu,

jódu a kobaltu, v USA patentu č. 3 868 305 přidavek solí sodíku, železa, manganu a vápníku v patentu SSSR č. 448 219 sodíku, vápníku, železa, zinku a manganu.

Stanovení optimálních dávek stopových prvků je velmi obtížné, protože u některých prvků je důležitý nejen jejich obsah v médiu, ale i poměr k jiným mikroelementům. Obtížné bývá i zjištění potřebnosti stopových prvků, které musí být v médiu přítomny ve velmi nízkých prahových koncentracích.

Tyto nevýhody odstraňuje způsob aerobní kultivace kvasinek podle vynálezu, při němž se do kultivačního média jako zdroj stopových prvků přidává potašárenská šáma v množství 20 až 500 mg sušiny na 1 litr kultivačního média.

Před přidávkem do média je vhodné rozpustit šámu v kyselině, s výhodou v kyselině fosforečné nebo chlorovodíkové.

Potašárenská šáma neboli černý kal je ve vodě nerozpustný odpad, který se v potašárnách při rozpuštění výpalkevého uhlí odděluje od louhů filtrací nebo sedimentací. Podstatná část sušiny šámy je tvořena sloučeninami vápníků, hlavně uhličitanem, a ve větších koncentracích jsou přítomny i sloučeniny draslíku a hořčíku. Kromě toho však šáma obsahuje v menších koncentracích celou řadu dalších prvků, mezi nimiž je většina nejdůležitějších mikroelementů. Vzhledem k tomu, že jde o směs prvků, získanou v podstatě z popela organického materiálu, odpovídá poměr hmot většiny přítomných mikroelementů požadavkům optimálního biologického účinku. Příklad složení potašárenské šámy je uveden v tabulce 1. Prvky jsou v šámě přítomny ve formě uhličitanů, kysličníků, fosforečnanů, případně křemičitanů.

Tabulka 1

Prvek	% v sušině	Prvek	% v sušině
K	4,06	Mn	0,176
Na	0,94	Al	0,162
Ca	57,50	Co	0,009
Mg	3,64	Pb	0,016
Fe	1,73	Ni	0,034
Zn	0,18	Cr	0,038
Cu	0,174		

Výhodou postupu podle vynálezu je skutečnost, že potašárenská šáma je prozatím bezcenným odpadem a že dávkování jediného zdroje stopových prvků je podstatně jednodušší a méně pracné než přidávání solí jednotlivých mikroelementů. Další výhodou je již zmíněný výhodný vzájemný poměr stopových prvků.

Postup podle vynálezu je objasněn, nikoliv však omezen, následujícími příklady.

Příklad 1

V laboratorním fermentoru o obsahu 30 litrů a užitečném plnění 17 litrů byla provedena série srovnávacích kultivací kvasinky *Candida utilis* CCY 29-38-64 na syntetickém eta-

nolu. Fermentor je opatřen samonasávacím míchadlem a cirkulačním válcem a dosahovaný přenos kyslíku odpovídá siřičitanovému číslu $190 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Při všech kultivacích bylo použito totéž základní médium, které v 1 litru obsahovalo tyto živiny:

- 0,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 1,0 g H_3PO_4 - 85 % hmot.,
- 0,45 g KOH
- 0,45 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$.

K rozpuštění živin byla použita vodovodní voda.

Kultivace byly vedeny při 30°C , pH kultivačního média se udržovalo na hodnotě 4,0 automatickým dávkováním čpavkové vody. Společně se čpavkovou vodou používanou jako zdroj N a k regulaci pH se podle čs. autorského osvědčení č. 158954 do média dával i etanol. Použitá směs etanolu a amoniaku obsahovala 4 objemové díly syntetického lihu 90 % hmotových a jeden objemový díl čpavkové vody (21 % hmot. NH_3). Při všech kultivacích bylo takto do média přidáno shodné množství syntetického lihu, které odpovídalo 348,6 g absolutního etanolu. Na počátku kultivací se přidávalo inokulum odpovídající počáteční koncentraci kvasničné sušiny 1,9 g/l.

První kultivace sloužila jako kontrolní pokus a byla vedena na základním médiu. Při dalších kultivačních pokusech se k základnímu médiu přidávala odstupňovaná množství potašarenské šámy, rozpuštěné v kyselině fosforečné.

Výsledky srovnávacích kultivací jsou shrnuty v tabulce 2 a vyplývá z nich, že přidávek šámy zvyšoval výtěžnostní koeficient o 3 až 13 % a ve dvou případech zkrátil dobu kultivace. Optimální výsledky byly dosaženy při dávkách šámy 60 až 120 mg/l média.

Tabulka 2

Pokus číslo	1	2	3	4	5	8
Přídavek šámy v mg sušiny na litr média	0	30	60	120	180	300
Doba kultivace (minut)	320	320	300	290	320	330
Přírůstek kvasničné sušiny (g)	222	230	243	255	232	231
$Y_{x/s} - \text{g/g}$	0,638	0,660	0,697	0,732	0,666	0,663

Příklad 2

Ve fermentoru popsaném v příkladu 1 byla opakována série srovnávacích kultivací kvasinky *Candida utilis* CCY 29-38-64 na syntetickém etanolu. Pro modelování podmínek kontinuální kultivace s recirkulací odstředěného média a s vracením kondenzátu z odparky kvasnič-

ného mléka do fermentoru byla k rozpuštění minerálních živin použita destilovaná voda a jako inokulum se používaly kvasinky, v nichž byl obsah stopových prvků snížen pětinasobným pasážováním v médiu připraveném z destilované vody. Jinak byly metodika pokusů i podmínky kultivací stejné jako v příkladu 1. Výsledky srovnávacích kultivací jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Pokus číslo	9	10	11	12
Přídavek šámy v mg sušiny na liter média	0	120	240	360
Doba kultivace (minut)	470	360	360	360
Přírůstek kvasničné sušiny (g)	180	230,5	222,5	222,5
$Y_{x/s}$ - g/g	0,516	0,661	0,638	0,638

Přídavek šámy ke kultivačnímu médiu zkrátit ve všech případech podstatně dobu kultivace a zvýšil výtěžnostní koeficient. Optimální zvýšení výtěžnostního koeficientu o 28 % bylo dosaženo při přídavku 120 mg šámy na liter média.

Příklad 3

V laboratorním fermentoru popsaném v příkladu 1 byly provedeny srovnávací kultivace kvasinky *Candida lipolytica* CCY 29-26-14 na izolovaných n-alkánech. Použitá surovina obsahovala 99,5 % látek tvořících adukt s močovinou, převážně n-alkány s C_{14} až C_{17} , a měla specifickou hmotnost $0,77 \text{ kg/m}^3$.

Základní médium mělo stejné složení jako v příkladu 1 a k jeho přípravě byla použita vodovodní voda. Před zahájením kultivací se do média přidávalo najednou 220 ml izolovaných n-alkánů (169,4 g). Přidané inokulum odpovídalo počáteční koncentraci kvasničné sušiny 2,1 g/l. Při kultivacích se udržovala teplota 30°C a pH se přídavkem öpavkové vody regulovalo na hodnotu 4,5. Jednotlivé kultivační pokusy se od sebe lišily pouze přídavkem potašarenské šámy k základnímu médiu. Výsledky kultivací jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4

Pokus číslo	13	14	15	16
Přídavek šámy - mg suš. na liter média	0	30	120	240
Doba kultivace (minut)	450	420	435	460
Přírůstek kvasničné sušiny (g)	157,5	166,0	174,5	171,0
$Y_{x/s}$ - g/g	0,93	0,98	1,03	1,01

Přídavek šámy k základnímu médiu zkracoval dobu kultivace a zvyšoval výtěžnostní koeficient. Při dávce 120 mg sušiny šámy na litr média se výtěžnostní koeficient zvýšil až o 11 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob aerobní kultivace kvasinek, vyznačený tím, že se jako zdroj stopových prvků do kultivačního média přidává potašarenská šáma v množství 20 až 500 mg sušiny na litr kultivačního média.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se před přidáváním do média šáma rozpustí v kyselině, s výhodou v kyselině fosforečné nebo chlorovodíkové.