



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262561

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/16

(22) Přihlášeno 23 10 87

(21) pv 7618-87.J

(40) Zveřejněno 16 08 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

VOLFOVÁ OLGA RNDr. CSc., KMENTOVÁ MIROSLAVA ing.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent, PRAHA

(54) Acidotolerantní metylotrofní kvasničný kmen mikroorganismu *Candida boidinii* CCY 29-37-9

Průmyslový kmen mikroorganismu *Candida boidinii* využívá k růstu metanol etanol, glycerol, sacharidy, směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy a hydrolyzáty lignocelulóзовých odpadů, přičemž produkuje na těchto substrátech v kyselém prostředí pH 2,8 až 3,5 za nesterilních podmínek vysoké množství snadno separovatelné biomasy bohaté na bílkoviny enzym alkohol oxidázu při současné produkci vitamínu B₂. Kmen je uložen ve sbírce kultur kvasinek Chemického centra SAV v Bratislavě /CC/ pod číslem CCY 29-37-9. Kmen je použitelný jako producent biomasy vhodné jako bílkovinné krmivo pro hospodářská zvířata a jako producent alkohol oxidázy, která se používá k detekci etanolu a metanolu v biologických materiálech ve formě detekčních činidel, enzymových a kvasničných elektrod a jako bělicí složka do pracích prášků.

Vynález se týká acidotolerantního metylotrofního kvasničného kmene mikroorganismu *Candida boidinii*.

Kmen kvasničného mikroorganismu označeného *Candida boidinii* 2 podle vynálezu, jehož biomasa je použitelná jako hodnotné bílkovinné krmivo pro hospodářská zvířata a jako zdroj enzymu alkohol oxidázy, využívá k růstu zejména metanol, etanol, sacharidy a směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy a hydrolyzáty lignocelulózových odpadů. Na těchto substrátech produkuje v kyselém prostředí za nesterilních kultivačních podmínek zvýšené množství biomasy, jež je bohatá na bílkoviny a esenciální aminokyseliny, dále na enzym alkohol oxidázu a vitamín B₂. Kmen je uložen ve sbírce kultur kvasinek Chemického centra SAV /CC/ pod číslem CCY 29-37-9.

Charakteristickým znakem tohoto nového průmyslového kvasničného kmene mikroorganismu je schopnost růstu s maximálními růstovými parametry i obsahem bílkovin v širokém rozmezí pH 2,8 až 4,5 média, s výhodou při pH 3,0 až 3,5, což umožňuje vést výrobní proces kvasničných bílkovin i alkohol oxidázy za nesterilních podmínek, dále se vyznačuje výrobními separačními vlastnostmi a zvýšenou rezistencí růstu buněk vůči inhibičnímu vlivu kyseliny mravenčí.

Tento nový kmen využívá k tvorbě biomasy bohaté na bílkoviny vedle metanolu a etanolu i glycerol, sacharidy jako glukosu, xylosu, ribosu, mannosu a d-arabinosu, dále směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy a hydrolyzáty lignocelulózových odpadů.

Na metanolu nebo směsích s metanolem produkuje kmen kromě biomasy i zvýšená množství enzymu alkohol oxidázy a extracelulární vitamín B₂, což umožňuje současnou výrobu třech produktů.

Tato biomasa je též použitelná jako hodnotné bílkovinné krmivo pro hospodářská zvířata a jako producent enzymu alkohol oxidázy a ostatních C₁ specifických produktů např. NAD, NADH, ATP aj. Alkohol oxidáza, která je používána k detekci etanolu a metanolu v biologických materiálech ve formě detekčních činidel, enzymových a kvasničných elektrod a dále jako bělicí složka do pracích prášků se dováží do ČSSR z kapitalistických států.

Kmen *Candida boidinii* 2 byl získán v laboratoři dlouhodobým šlechtěním průmyslového kvasničného kmene *Candida boidinii* 11 Bh (AO 172 014) ve třech stupních.

Šlechtění v prvním stupni bylo provedeno dlouhodobou kultivací kmene č. 11 Bh v chemostatu při limitaci růstu buněk metanolem na syntetické půdě s přidavkem malého množství kvasničného výluhu (100 mg.L⁻¹) a nepatrného množství biotinu (10 µg v 1 litru). Získaný kmen označený v tomto stupni šlechtění č. 1 se od původního kmene č. 11 Bh odlišuje hladkým povrchem kolonií na tuhých komplexních i minerálních půdách, homogenním růstem buněk ve fermentoru a vyšší růstovou rychlostí buněk. Protože kmen č. 1, tak jako výchozí kmen 11 Bh, hromadil při vyšších koncentracích metanolu a vyšších zředovacích rychlostech (nad D 0,1) v chemostatu kyselinu mravenčí v médiu, produkt, který je inhibitorem růstu buněk na metanolu ale i na jiných substrátech, byl kmen č. 1 šlechtěn v druhém stupni.

Šlechtění v druhém stupni spočívalo ve vlivu selekčního tlaku kyseliny mravenčí v přítomnosti metanolu a vedlo k získání kmene se sníženou citlivostí vůči inhibičnímu vlivu kyseliny mravenčí na růst buněk. Dlouhodobým selekčním tlakem stále se zvyšující koncentrace kyseliny mravenčí v přítomnosti metanolu byly postupně získány kmeny se zvýšenou rezistentností růstu buněk na kyselinu mravenčí. Konečnou selekcí byl získán kmen, který roste na médiu s metanolem až do výše 1 % (hmot) kyseliny mravenčí v médiu a nehromadí při vyšších zředovacích rychlostech v chemostatu a při vyšších aktuálních koncentracích metanolu v médiu kyselinu mravenčí. Kmen jehož získané vlastnosti jsou stále byl označen *Candida boidinii* A7.

V třetím selekčním stupni byl kmen A7 podroben selekčnímu tlaku nízkých pH média a

při kontinuální kultivaci z chemostatu. Za postupného snižování pH média byl dlouhodobou kultivací při vyšších zředovacích rychlostech při limitaci růstu buněk metanolem získán acidotolerantní kmen *Candida boidinii* 2, který se vyznačuje zvýšenou rezistancí růstu jak vůči kyselině mravenčí tak i vůči nízkým pH média 2,6 až 2,8.

Dále je uvedena charakteristika vlastností nového acidotolerantního kmene *Candida boidinii* 2.

Morfologická a fyziologická charakteristika:

Na rozdíl od průmyslového kmene *Candida boidinii* 11 Bh je povrch kolonií nového acidotolerantního kmene na sladinkovém agaru i na agaru s minerální půdou obohacenou metanolem při 30 °C inkubací hladký, lesklý, barvy světle krémové bílé. V submersních kultivacích roste kmen homogenně, bez růstu buněk na povrchu stěn kultivačních baněk a fermentorů.

Kmen *Candida boidinii* 2 roste na minerální půdě, která obsahuje 0,005 až 6 % metanolu nebo etanolu, ale i glycerolu, glukosu, xylosy, mannosy, ribosy, d-arabiny, směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy a hydrolyzáty lignocelulóзовých odpadů, dále chlorid amonný nebo síran amonný, amoniak, fosforečnan sodný nebo draselný ale i amonný, kyselinu fosforečnou, síran hořečnatý, chlorid draselný nebo sodný ve vodovodní vodě, dále malá množství kvasničného výluhu nebo melasových výpalků a nepatrná množství biotinu nebo desbiotinu.

Nejvyšších výtěžností biomasy i nejvyšších růstových rychlostí buněk dosahuje kmen na minerální půdě s 0,05 až 0,2 % metanolu nebo etanolu, glukosu, mannosy, xylosy při 30 °C a při obohacení minerální půdy o kvasničný výluh nebo melasové výpalky (100 až 200 mg.L⁻¹) a biotin (10 µg.L⁻¹).

Na rozdíl od kmene č. 11 Bh se nový acidotolerantní kmen č. 2 vyznačuje 40% výtěžností na metanol, tj. o 7 % vyšší výtěžností než má rodičovský kmen, dále vyšší růstovou rychlostí na metanolu, která je u_{max} 0,16 až 0,2, vyšším obsahem dusíkatých buněčných látek, které dosahují u nového kmene 62 až 65 %, vyšším obsahem čistých bílkovin tj. 50 až 53 % bohatých na esenciální aminokyseliny zejména na lysin, valin, threonin a zvýšenou tvorbou vitamínu B₂.

Kmen produkuje intracelulárně zvýšená množství enzymu alkohol oxidázy, zejmén při limitaci růstu metanolem nebo metanolových směsí v chemostatu při nízkých zředovacích rychlostech D 0,03 až 0,1. Obsah alkohol oxidázy v buňkách dosahuje 15 až 20 % obsahu extrahovatelných buněčných bílkovin.

Dále na rozdíl od kmene *Candida boidinii* 11 Bh nový acidotolerantní kmen č. 2 roste na metanolu i v přítomnosti kyseliny mravenčí až do 0,8 až 1,0 % (hmot) přičemž do 0,4 % kyseliny mravenčí spolu s metanolem roste s maximálními růstovými parametry a nehromadí kyselinu mravenčí v médiu při vyšších zředovacích rychlostech v chemostatu na metanolu. Na rozdíl od kmene č. 11 Bh, který má optimum růstu při pH 4,2 až 4,5, roste nový acidotolerantní kmen č. 2 s maximálními růstovými parametry i obsahem bílkovin v buňkách nejen při nízkých pH média, ale i v širokém rozmezí pH 2,8 až 4,5.

Nový kmen umožňuje vést kultivace kvasinek, tj. výrobní proces, kontinuální i vsádkové, přípravy kvasničných mikrobiálních bílkovin a alkohol oxidázy za nesterilních podmínek bez nebezpečí infekce a znehodnocení produktu z metanolu, ale i z jiných výše uvedených surovin, při nízkých pH média 3,0 až 3,5 při zachování maximálních růstových parametrů i obsahu bílkovin a enzymu za současné výroby vitamínu B₂.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Acidotolerantní metylotrofní kvasničný kmen mikroorganismu *Candida boidinii* CCY 29-37-9 jehož biomasa je použitelná jako hodnotné bílkovinné krmivo pro hospodářská zvířata a jeho zdroj enzymu alkohol oxidázy.