



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262560

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/16

(22) Přihlášeno 22 10 87

(21) PV 7606-87.C

(40) Zveřejněno 16 08 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

VOLFOVÁ OLGA RNDr. CSc., DVOŘÁKOVÁ JANA RNDr., KYSLÍKOVÁ EVA ing. CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV, PRAHA

(54) Termotolerantní acidotolerantní metylotrofní kvasničný kmen
mikroorganismu Hansenula sp. CCY 38-34-1

Kvasničný kmen mikroorganismu Hansenula sp. využívá k růstu metanol, etanol, sacharidy a směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy, melasou a hydrolyzáty lignosulfitových odpadů, přičemž produkuje za zvýšených fermentačních teplot, tj. 38 až 40 °C v kyselém prostředí pH 2,8 až 3,5 za nesterilních podmínek vysoké množství biomasy bohaté na bílkoviny a termostabilní enzym alkohol oxidázu, kmen je uložen ve sbírce kultur kvasinek Chemického centra SAV v Bratislavě /CC/ pod číslem CCY 38-34-1. Kmen je použitelný jako producent biomasy vhodné jako bílkovinné krmivo pro výkrm hospodářských zvířat a jako producent termostabilního enzymu alkohol oxidázy, který se používá zejména k detekci etanolu v biologických materiálech, jako nezbytná složka detekčních činidel, enzymových a kvasničných elektrod i jako bělicí složka do pracích prášků.

Vynález se týká termotolerantního a acidotolerantního metylotrofního kvasničného kmene mikroorganismu *Hansenula* sp.

Kmen kvasničného mikroorganismu označeného *Hansenula* sp. 3 podle vynálezu využívá za termofilních podmínek ke svému růstu metanol, etanol, sacharidy a směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy, melasou a hydrolyzáty lignocelulózových odpadů, přičemž produkuje na těchto substrátech v kyselém prostředí za nesterilních podmínek biomasu bohatou na bílkoviny a esenciální aminokyseliny a na metanolu nebo na směsích s metanolem termostabilní enzym alkohol oxidázu. Kmen je uložen ve sbírcce kultur kvasinek Chemického centra SAV v Bratislavě /CC/ pod číslem CCY 38-34-1.

Charakteristickým znakem tohoto nového průmyslového kvasničného kmene mikroorganismu je schopnost růstu v širokém rozmezí kultivačních teplot 28 až 50 °C, s výhodou při 38 až 40 °C, 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 s maximálními růstovými parametry i obsahem bílkovin a alkohol oxidázy za nesterilních podmínek při snížených nárocích na chlazení fermentační kapaliny v průběhu kultivace.

Nový průmyslový kvasničný kmen je vhodný jako producent biomasy, která je použitelná jako hodnotné bílkovinné krmivo pro hospodářská zvířata a jako producent termostabilního enzymu alkohol oxidázy, která je použitelná k detekci etanolu a metanolu v biologických materiálech do detekčních směsí a enzymových a kvasničných elektrod i jako bělicí složka do pracích prášků.

Kmen *Hansenula* sp. 3 byl získán v laboratoři selekcí směsné kultury mikroorganismů izolované ze zahradní půdy na médiu s metanolem a následným dvojstupňovým šlechtěním.

Šlechtění v prvním stupni bylo provedeno pomocí selekčního tlaku fermentačních teplot vyšších než 30 °C. Postupným zvyšováním teploty kultivace po 2 °C a kultivací kultury tak dlouho až rostly buňky při vyšší teplotě na médiu s metanolem stejnými růstovými parametry jako buňky při teplotě o 2 °C nižší, byly postupně selektovány kultury buněk rostoucí optimálně při stále vyšších fermentačních teplotách. Termotolerantní mutant *Hansenula* sp. byl získán selekcí rychle rostoucích buněk při 40 °C. Po prověření stálosti nabytí termotolerance byl mutant v druhém stupni šlechtění podroben selekčnímu tlaku nízkých pH média v chemostatu při limitaci růstu buněk metanolem při 40 °C. Postupným snižováním pH média při vyšších zředovacích rychlostech byl konečně získán termotolerantní a acidotolerantní kmen *Hansenula* sp. 3.

Dále je uvedena charakteristika vlastností nového termotolerantního a acidotolerantního kmene *Hansenula* sp. 3.

Morfologická a fyziologická charakteristika:

Povrch kolonií nového kmene na sladinkovém agaru při 40 °C po 48hodinové inkubaci je hladký, barvy bílé až světle krémové.

Sporulace pozitivní:

Buňky se množí pučením, po 48hodinové inkubaci při 40 °C jsou sferoidní až mírně oválné, velikosti 2,5 až 4 μm.

Kmen fermentuje glukosu a asimiluje glukosu, sacharosu, xylosu, mannosu, ribosu, maltosu, cellobiosu, manitol, ribitol, glycerol, metanol, etanol a dusičnan draselný.

K optimálnímu růstu na metanolu vyžaduje malá množství thiaminu a biotinu. Optimální růstová teplota je 38 až 40 °C. Maximální růstová teplota je 50 °C.

Kmen roste na minerálním médiu s metanolem, etanolem, sacharidy a směsím různých substrátů s maximálními růstovými výtěžky i obsahem bílkovin a enzymu alkohol oxidázy v širokém rozmezí pH 2,8 až 4,5.

V submersních kultivacích roste kmen homogenně, bez růstu buněk na povrchu stěn kultivačních nádob.

Nový produkční kmen se odlišuje od známých metylotrofních kmenů *Hansenula* vyšší termotolerantností a acidotolerantností.

Kmen *Hansenula* sp. 3 roste na minerální půdě, která obsahuje 0,5 až 5 % metanolu nebo etanolu, ale i glycerolu, glukosu, xylosy, sacharosy, mannosy, ribosy, směsi metanolu se sacharidy, sulfitovými výluhy, melasou, hydrolyzáty lignocelulózových odpadů, dále chlorid amonný nebo síran amonný, amoniak, fosforečnan draselný nebo sodný i amonný, kyselinu fosforečnou, síran hořečnatý, chlorid sodný ve vodovodní vodě, dále nízká množství kvasničné-
ho výluhu nebo melasových výpalků a nepatrné 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, ale i sacharidů a jejich směsí při 38 až 40 °C při obohacení minerální půdy o kvasničných výluh nebo melasové výpalky (100 až 200 mg.L⁻¹) a biotin (10 µg.L⁻¹).

Při růstu v chemostatu při limitaci růstu metanolem se nový kmen vyznačuje 36 až 38% výtěžností na substrát při 40 °C a pH 3,0. Biomasa obsahuje 55 % dusíkatých látek (hrubých bílkovin) bohatých na esenciální aminokyseliny zejména na lysin. Při vyšších zředovacích rychlostech na metanolu v chemostatu nehromadí v médiu kyselinu mravenčí.

Kmen produkuje na metanolu nebo na směsích s metanolem zvýšená množství enzymu alkohol oxidázy. Zejména při růstu v chemostatu za limitace růstu metanolem, při nízkých zředovacích rychlostech D 0,03 až 0,1 při 40 °C a pH 3,0 obsah alkohol oxidázy v buňkách dosahuje 16 až 20 % obsahu extrahovatelných bílkovin.

Alkohol oxidáza nového termotolerantního a acidotolerantního kmene vykazuje maximální aktivitu při 45 až 50 °C a značnou termostabilitu.

Nový kmen umožňuje vsádkovou i kontinuální přípravu kvasničné biomasy, použitelnou buď jako hodnotné mikrobiální bílkoviny nebo jako zdroj enzymu alkohol oxidázy, nebo obou současně, za nesterilních podmínek při nízkých pH média 3,0 až 3,5 a vysokých teplot 38 až 40 °C při zachování maximálních růstových parametrů i obsahu bílkovin a alkohol oxidázy.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Termotolerantní, acidotolerantní metylotrofní kvasniční kmen mikroorganismu *Hansenula* sp. CCY 38-34-1 jehož biomasa je použitelná zejména jako hodnotné bílkovinné krmivo pro hospodářská zvířata a jako zdroj termostabilního enzymu alkohol oxidázy.