



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

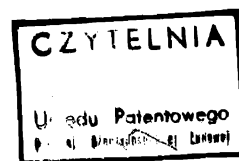
Int. Cl.³ C12N 1/16

Zgłoszono: 23.03.79 (P. 214376)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 14.07.80

Opis patentowy opublikowano: 31.01.1984



Twórcy wynalazku: Marek Kramarz, Władysław Leśniak, Jerzy Ziobrowski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Akademia Ekonomiczna im. Oskara Langego,
Wrocław (Polska)

Sposób otrzymywania biomasy drożdżowej z odbiałzonego soku ziemniaków

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biomasy drożdżowej z odbiałzonego soku ziemniaków, umożliwiający uzyskiwanie wysokobiałkowego produktu dla celów paszowych i spożywczych oraz redukcję zanieczyszczeń ścieków przemysłu krochmalniczego.

Podczas produkcji krochmalu z ziemniaków w okresie jesienno-zimowym, przedłużanym często z uwagi na zwiększające się zapotrzebowanie na ten produkt do maja, powstają duże ilości ścieków o wysokim ładunku zanieczyszczeń. Zastosowanie wirówek miazgowych umożliwia otrzymywanie praktycznie nierozcieńczonego soku komórkowego, z którego można na skalę techniczną wydzielać białko według jednej ze znanych metod, a sok odbiałzony ze względu na wysoką wartość biologiczną, dalej zagospodarowywać. Jedną z możliwości utylizacji soku komórkowego ziemniaka, a również soku odbiałzonego, jest stosowanie go do otrzymywania podłoża dla hodowli drobnoustrojów.

Znany jest sposób drożdżowania soku ziemniaka po wydzieleniu białka, na przykład według publikacji w czasopiśmie „Przemysł Fermentacyjny i Rolny” z 1976 r nr. 2 s. 2. Sposób ten prowadzony jest według schematu z dopływem pożywki w czasie hodowli szczepu *Candida tropicalis*, z dodatkiem źródeł azotu, fosforu, magnezu i potasu wzbogaconych w cukier przez dodatek melasowy lub hydrolu glukozowego. Wadą tego rozwiązania jest niepełne, bo tylko w 50% wykorzystania azotu zawartego w podłożu hodowlanym, niższe wykorzystanie fosforu, oraz cukru, przez co uzyskuje się niższe wydajności biomasy.

Znane są również sposoby hodowli drożdży paszowych w pianie. Ich wadą jest małe wykorzystanie objętości roboczej fermentora oraz trudności w oddzieleniu drożdży od piany, ze względu na jej trwałość.

Sok komórkowy ziemniaka może być dodawany do innych pożywek w charakterze stymulatora wzrostu mikroorganizmów np. do ługów posulfitowych, melasy w ilości do 20% objętościowych, do frakcji węglowodorowych (opis patentowy ZSRR nr 378 405) w ilości do 1%, przez co wzrasta plon biomasy. Wadą tych sposobów jest stosunkowo małe wykorzystanie, uzyskiwanego w dużych ilościach w przemyśle krochmalniczym soku ziemniaka, co nie pozwala rozwiązać problemu kompleksowej utylizacji tego odpadu.

Istotną niedogodnością znanych sposobów drożdżowywania soku komórkowego ziemniaka jest prowadzenie procesu hodowli metodami okresowymi, co przy wysokiej emisji tego odpadu znacznie ogranicza możliwości przerobowe drożdżowni lub wymaga dużych nakładów inwestycyjnych.

Ponieważ w krochmalni przerabiającej np. 1000 t ziemniaków w ciągu doby powstaje około 600 m³ odbiałzonego soku, konieczne jest stosowanie automatycznych metod ciągłego drożdżowywania tego odpadu.

Znany jest sposób automatycznej regulacji dopływu pożywki melasowej (podstawowego źródła węgla i energii dla drożdży), oparty o stężenie tlenu rozpuszczonego w środowisku hodowlanym, w czasie hodowli drożdży piekarskich na przykład z publikacji zamieszczonej w *Przemśle Fermentacyjnym i Rolnym* nr 7 i 11 z 1976 r. lub z opisu patentowego PRL nr 105760. Część pożywki melasowej wprowadzono do hodowli w sposób ciągły, poza układem regulacyjnym, a część pożywki poprzez zawór elektromagnetyczny sterujący dopływem pożywki na podstawie zmian stężenia tlenu rozpuszczonego w środowisku hodowlanym. Zasada automatycznej metody regulacji polega na wprowadzeniu pożywki do fermentora w chwili, kiedy wartość stężenia tlenu rozpuszczonego wyrażona w % nasycenia przekroczy wartość regulacyjną. Po wyczerpaniu przez drożdże źródeł węgla (cukrów) w brzeczce hodowlanej następuje ponowny wzrost pO₂.

Znana jest na przykład z opisu patentowego CSSR nr 158991 oraz opisu patentowego RFN nr 2546236 metoda automatycznej regulacji dozowania pożywki, według której około 80% niezbędnych źródeł węgla wprowadza się razem z solami amonowymi mocnych kwasów nieorganicznych, zwykle (NH₄)₂SO₄, na podstawie zmian pH, a pozostała ilość źródeł węgla jest dozowana w oparciu o zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego. Istota powyższego rozwiązania polega na tym, że wartość pH środowiska hodowlanego w fermentorze kształtowania jest wyłącznie przez kwas wyzwalany w wyniku asymilacji N amonowego przez drożdże. Ilość jego jest proporcjonalna do zużytej ilości źródeł węgla, a tym samym wielkości przyrostu biomasy.

Opisany sposób ma zastosowanie wyłącznie w odniesieniu do syntetycznych pożywek z takimi źródłami węgla jak etanol, metanol, frakcje węglowodorowe. Przy użyciu takich jednorodnych związków węgla łatwo jest wyliczyć ilość niezbędnego azotu w postaci soli amonowej mocnego kwasu nieorganicznego. W tym celu należy wziąć pod uwagę współczynnik wydajności biomasy drożdży wynoszący np. dla etnaolu 0,68 oraz założyć, że w suchej masie drożdży znajduje się 10% azotu. Regulacja pH w tak szerokim zakresie od 2 do 6 może wywołać przedozowanie pożywki zawierającej źródła węgla i występowanie efektu Crabtree, obniżającego wydajność biomasy. Natomiast dopływ związków węgla dopiero po wzroście stężenia tlenu rozpuszczonego w brzeczce najkorzystniej o 20–30% może powodować przerwy w syntezie biomasy i pogorszenie stanu fizjologicznego komórek drożdży.

Sposób według wynalazku polega na tym, że do środowiska hodowlanego wprowadza się pożywkę podstawową, którą stanowi odbiałczony sok z ziemniaków, w oparciu o zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego oraz dozuje się pożywkę uzupełniającą w postaci wodnego roztworu kwasu mineralnego, ewentualnie z dodatkiem źródeł węgla, najkorzystniej węglowodanów na podstawie zmian wartości pH. Wzrost pH uruchamia dopływ pożywki uzupełniającej w ilości odpowiadającej co najwyżej 25% ogólnej ilości źródeł węgla, które poddaje się drożdżowaniu w całym procesie hodowli. Pożywka uzupełniająca, zależnie od okresu przeprowadzania hodowli zawiera w 1 m³ około 550 moli kwasu siarkowego oraz cukier w ilości około 300 kg. Stosuje się również pożywkę uzupełniającą w skład której wchodzi: kwas siarkowy w ilości około 550 moli/1 m³ i cukier w ilości 150 kg/1 m³, albo stosuje się 5% roztwór wodny kwasu siarkowego nie zawierający źródeł węgla. W hodowlach używa się szczepu drożdży *Candida pseudotropicalis*. W charakterze źródeł węgla w pożywce uzupełniającej, stosuje się hydrol glukozowy, melasę buraczaną, hydrolizat wycierki ziemniaczanej.

Sposób według wynalazku dotyczy produkcji drożdży, zwłaszcza paszowych i spożywczych z odbiałzonego soku ziemniaka, a więc substratu o różnym składzie chemicznym, zależnie od odmiany ziemniaka i okresu przechowywania. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że sok odbiałczony z różnych odmian ziemniaków, a zwłaszcza po różnym okresie przechowywania na niekorzystną zawartość związków źródeł węgla występujących w postaci cukrów, kwasów organicznych aminokwasów, natomiast odznacza się właściwą relacją azotu i fosforu.

Ustalono optymalny stosunek $C:N:P_2O_5$ wynoszący 9,9 : 1 : 0,4, przy czym stwierdzono, że w okresie jesiennym i zimowym przeciętna relacja $C:N:P_2O_5$ kształtuje się jak 7,35 : 1 : 0,4. Z tego względu odbiałczony sok ziemniaka w tym okresie musi być uzupełniony w źródła węgla. Natomiast w okresie wiosennym wzrasta zawartość w soku komórkowym substancji redukujących, głównie cukrów dlatego stosunek $C:N:P_2O_5$ odpowiada optymalnemu.

Po przeprowadzeniu szeregu wstępnych hodowli drożdży paszowych z ręcznie regulowanym dopływem pożywki w warunkach ciągłego pomiaru stężenia tlenu rozpuszczonego pH, analizy gazów odlotowych okazało się, że wyczerpywanie się źródeł węgla w środowisku hodowlanym sygnalizowane jest przez charakterystyczny cykliczny i powtarzalny wzrost wartości pH i stężenia tlenu rozpuszczonego, przy czym wzrost pH wyprzedza w czasie wzrost koncentracji tlenu rozpuszczonego. Wzrost pH spowodowany jest asymilacją przez drożdże kwasów organicznych i aminokwasów i przy braku regulacji tego parametru może być tak duży, że następuje zahamowanie rozwoju komórek. Zaobserwowano ponadto, że przeciętna ilość 5% roztworu kwasu siarkowego wprowadzonego do fermentora za pomocą automatycznej regulacji jest wielkością charakterystyczną i wynosi średnio 20 milimoli na 1 dm^3 soku odbiałczonego, niezależnie od odmiany ziemniaka i okresu przechowywania. Dobrano szczep drożdży paszowych *Candida pseudotropicalis*, który pozwala na otrzymanie wysokiej wydajności biomasy, bogatej w białko oraz umożliwia wysoki stopień redukcji BZT₅, przy małej tendencji do tworzenia piany.

Na tej podstawie zaproponowano sposób drożdżowywania odbiałczonego soku ziemniaka z zastosowaniem automatycznej regulacji dozowania pożywki, nie wymagający dodatku soli azotowych i fosforowych.

Podłoże hodowlane stanowi oprócz pożywki podstawowej tzn. odbiałczonego soku ziemniaka również pożywkę uzupełniającą w celu zbilansowania składników środowiska hodowlanego i prawidłowego ukształtowania proporcji $C:N:P$ oraz skorygowania pH środowiska hodowlanego. Pożywkę uzupełniającą otrzymuje się przez dodatek cukrów w ilości zależnej od okresu prowadzenia kampanii krochmalniczej, do roztworu wodnego kwasu mineralnego. Wykorzystując charakterystyczne dla podbiałczonego soku ziemniaka zjawisko cyklicznego i równomiernego wzrostu stężenia tlenu rozpuszczonego i wyprzedzającego go w czasie wzrostu pH w momencie wyczerpywania się źródeł węgla, wdozowuje się co najwyżej 25% ogólnej ilości źródeł węgla razem z pożywką uzupełniającą, w momencie wzrostu pH powyżej wartości optymalnej. Umożliwia to pełną asymilację nadmiaru związków azotowych i fosforowych przez drożdże, pozostających w środowisku hodowlanym. Występujący jednocześnie dalszy wzrost stężenia tlenu rozpuszczonego powyżej wartości zadanej powoduje uruchomienie urządzenia dozującego świeżą porcję soku odbiałczonego.

Pożywka uzupełniająca stosowana w okresie jesiennym zawiera w 1 m^3 około 550 moli H_2SO_4 oraz 300 kg cukru. W okresie zimowym dodatek cukru jest mniejszy o około 50%, natomiast w czasie wiosennej kampanii krochmalniczej używa się 5% roztwór H_2SO_4 bez dodatku uzupełniającego źródła węgla.

Sposób według wynalazku umożliwia ciągły i zautomatyzowany przerób odbiałczonego soku ziemniaka. Minimalny dodatek cukrów, wyeliminowanie dodatku azotu i fosforu obniżają koszty produkcji biomasy drożdżowej. Dozowanie dodatkowych ilości cukru razem z roztworem kwasu (pożywka uzupełniająca) według zmian pH zapobiega kumulowaniu się nadmiaru niezasymilowanych organicznych związków azotowych i fosforowych, co stwarzałoby warunki do rozwoju szkodliwej mikroflory bakteryjnej. Pożywka uzupełniająca jest stosunkowo sterylna z uwagi na niskie pH i może być przechowywana w dłuższym okresie. Plon biomasy, uzyskany przy optymalnej koncentracji cukru wynoszącej około 2% jest o blisko 50% wyższy, aniżeli z roztworu melasy wzbogaconej w azot, fosfor o tym samym stężeniu węglowodanów tzn. rozcieńczeniu końcowym 1 : 25. Przystawalność węgla z jego związków ogółem wynosi przeciętnie 85% a asymilacja związków organicznych przez drożdże kształtuje się na poziomie 80%, co przyczynia się do znacznej redukcji uciążliwości ścieków krochmalni.

Proponowany sposób został scharakteryzowany przy pomocy następujących przykładów:

Przykład I. Jako pożywkę podstawową w ciągłym procesie hodowli używano odbiałczony sok ziemniaka, otrzymany z surowca po 3 miesiącach przechowywania, zawierający 1,48% substancji redukujących ogółem, 1950 mg/dm³ azotu ogólnego, 995 mg/dm³ P_2O_5 , 16,42 g/dm³ węgla

ogółem. Sucha masa wynosiła 4,37% BZT, 263000 mg O_2/dm^3 . W skład źródeł węgla ogółem wchodziły: cukry w 35,7% kwasy organiczne 24,2% aminokwasy 21,3% i amidy 9,8%. Pożywkę uzupełniającą przygotowywano następująco: 330 g hydrolu glukozowego, czyli około 150 g cukru i 510 milimoli kwasu siarkowego uzupełniano wodą do 1 dm^3 . Pożywkę podstawową dozowano do fermentora na podstawie zmian rzeczywistego stężenia tlenu rozpuszczonego przy pomocy oxysteru skonstruowanego w Instytucie Technologii Przemysłu Chemicznego i Spożywczego AE we Wrocławiu sterującego pracą pompy dozującej świeży sok odtłuszczony. Zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego oscylowały wokół wartości zadanej wynoszącej 12% stanu nasycenia w granicach od 4 do 16%. Pożywkę uzupełniającą wprowadzono na podstawie zmian pH środowiska hodowlanego stosując pH-ster skonstruowany w tym samym Instytucie, sterujący pracą pompy dozującej kwas siarkowy wraz z niezbędnym dodatkiem cukru. Jednonaczyniowy proces prowadzono w ciągu 72 godzin przy objętości roboczej fermentora 2 dm^3 z zastosowaniem mieszania 600 obr/min i aeracji około 25 $dm^3/godz$. Nadmiar środowiska hodowlanego był odbierany przelewem poprzez króciec umieszczony na wysokości odpowiadającej wymienionej objętości roboczej. Każdorazowo po odebraniu 1 dm^3 brzeczki z drożdżami przeprowadzono analizy na zawartość biomasy drożdżowej, analizę składu chemicznego otrzymanych drożdży i analizę soku poddrożdżowego pozwalającą określić stopień asymilacji składników pożywki w trakcie procesu.

W warunkach hodowli ciągłej zmiany pH i stężenia tlenu rozpuszczonego mają charakter cykliczny, przy czym jeden cykl (czas pomiędzy kolejnymi dozowaniami, pożywki podstawowej i uzupełniającej) trwał średnio 80 sekund. Amplituda zmian pH wynosiła 0,04, a stężenie tlenu rozpuszczonego wahało się w granicach od 4% (wartość minimalna) do 16% (wartość maksymalna) stanu nasycenia. Wzrostowi rzeczywistego stężenia tlenu rozpuszczonego każdorazowo towarzyszył wzrost pH, a różnica pomiędzy momentem otwarcia przez pH-ster zaworu dozującego pożywkę uzupełniającą i momentem otwarcia przez oxyster zaworu wprowadzającego do fermentora pożywkę podstawową (sok odtłuszczony wynosiła średnio 7 sekund. Łączenie w ciągu 72 godzin zdrożdżowano około 22,5 dm^3 odtłuszczonego soku oraz 1,1 dm^3 pożywki uzupełniającej, otrzymując 350 g D_{100} .

Równolegle prowadzona hodowla ciągła w analogicznych warunkach na melasie rozcieńczonej w stosunku 1 : 20 (2,5% cukru) umożliwiła otrzymanie około 300 g D_{100} . W rezultacie zdrożdżowania 1150 g tego podłoża. Wydajność w przeliczeniu na cukier w przypadku melasy wynosiła około 52%, natomiast dla odtłuszczonego soku ziemniaka — 78%.

Drożdże wykorzystywały węgiel ogółem w procesie hodowli na odtłuszczonym soku ziemniaka w około 88%, azot ogólny w ponad 80%, fosfor — 68%, kwasy organiczne w 97%, BZT, ulegało redukcji w blisko 90%. Uzyskana biomasa drożdży odznaczała się wysoką zawartością białka surowego (ponad 60%), fosforu (4,5%) i korzystnym składem aminokwasowym.

Przykład II. Proces hodowli drożdży *Candida pseudotropicalis* miał przebieg okresowy przy zastosowaniu automatycznej regulacji jak w przykładzie I. Jako pożywkę stosowano odtłuszczony sok ziemniaka o zawartości 0,86% substancji redukujących po hydrolizie. Hodowlę przeprowadzono w okresie jesiennym, stosując pożywkę uzupełniającą, zawierającą w 1 dm^3 660 g hydrolu glukozowego tzn. około 150 g cukru, 510 milimoli H_2SO_4 i wodę do podanej objętości. Ogólna ilość źródła węgla w soku odtłuszczonym wynosiła 13,97 g/ dm^3 w tym około 25% to węgiel zawarty w cukrach 37% w kwasach organicznych, 21% w aminokwasach i ponad 10% w amidach. Zawartość azotu ogólnego w pożywce wynosiła 1.760 mg/ dm^3 a fosforu wyrażonego jako P_2O_5 — 1053 mg/ dm^3 .

Ogółem wprowadzono do fermentora w ciągu 8 godzin 2,5 dm^3 pożywki podstawowej oraz około 100 cm^3 pożywki uzupełniającej uzyskując 17,85 g D_{100}/dm^3 czyli wydajność 89,2% w stosunku do wprowadzonego cukru. W wyniku procesu hodowli drożdże zasymilowały 88% azotu ogólnego, 91% źródeł węgla oraz 69% fosforu zawartych w pożywce podstawowej i uzupełniającej.

Przykład III. Proces hodowli okresowej prowadzono w warunkach jak w przykładzie II z tym, że pożywkę podstawową stanowił sok odtłuszczony z ziemniaków po 6 miesiącach przechowywania o zawartości 2,06% cukrów, 2450 mg/ dm^3 azotu ogólnego i 1080 mg/ dm^3 P_2O_5 . W bilansie związków źródeł węgla największy udział, około 46% miały węglowodany, następnie aminokwasy 22,4% kwasy organiczne 16,2% i amidy 9,9%. Ze względu na właściwą proporcję C : N : P_2O_5 w podłożu, pożywkę uzupełniającą stanowił 5% H_2SO_4 , bez dodatku węglowodanów. Proces

hodowli trwał 9 godzin. Łącznie wdozowano 2–5 dm³ odbiałzonego soku ziemniaka i około 100 cm³ 5% H₂SO₄. Uzyskano 18,16 g D₁₀₀ z 1 dm³ soku odbiałzonego, czyli wydajność 90,8% w stosunku do wprowadzonego cukru.

Proces drożdżowania pozwolił wykorzystać 89% związków źródeł węgla zawartych w podłożu, 82% azotu ogólnego i 70% P₂O₅ oraz zredukować PZT₅ w 90%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania biomasy drożdżowej z odbiałzonego soku ziemniaków, uzyskiwanego w czasie procesu produkcji krochmalu po koagulacji i wydzieleniu białka z soku komórkowego, polegający na prowadzeniu hodowli drożdży paszowych na odbiałczonym soku ziemniaka jako pożywce podstawowej z dodatkiem substratów stanowiących źródło węgla, w warunkach automatycznej regulacji dopływu świeżej pożywki w oparciu o zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego, **znamienny tym**, że do środowiska hodowlanego wprowadza się pożywkę podstawową, którą stanowi odbiałczony sok w oparciu o zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego oraz dozuje się pożywkę uzupełniającą w postaci wodnego roztworu kwasu mineralnego ewentualnie z dodatkiem źródeł węgla, najkorzystniej węglowodanów, na podstawie zmian wartości pH, przy czym wzrost pH uruchamia dopływ pożywki uzupełniającej w ilości odpowiadającej co najwyżej 25% ogólnej ilości źródeł węgla, które poddaje się drożdżowaniu w całym procesie hodowli.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę uzupełniającą, zawierającą w 1 m³ około 550 moli kwasu siarkowego oraz cukier w ilości około 300 kg.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę uzupełniającą zawierającą w 1 m³ około 550 moli kwasu siarkowego oraz około 150 kg cukru.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pożywkę uzupełniającą stosuje się 5% wodny roztwór kwasu siarkowego.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako szczep drożdży stosuje się *Candida pseudotropicalis*.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pożywkę węglowodanową wchodzącą w skład pożywki uzupełniającej stosuje się hydrol glukozowy, melasę buraczaną, hydrolizat wycierki ziemniaczanej.