



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Kl. 53g,3/03

Zgłoszono: 15.07.1969 (P.134840)

Pierwszeństwo: _____

MKP A23k 1/06

Zgłoszenie ogłoszono: 15.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 30.09.1974

BIBLIOTEKA

Urząd Patentowy
PRL

Twórcy wynalazku: Jerzy Trojanowski, Andrzej Leonowicz

Uprawniony z patentu: Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, Lublin
(Polska)

Sposób otrzymywania biomasy bogatej w substancje białkowe z ługów posulfitowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biomasy bogatej w substancje białkowe z ługów posulfitowych.

Ługi posulfitowe, stanowiące odciek otrzymywany przy produkcji celulozy metodą siarczynową, wykorzystuje się dotychczas do wytwarzania biomasy na drodze drożdżowania tych ługów. Znane jest wykorzystywanie jako źródła węglowodanów heksoz i heksozanów, obecnych w ługach posulfitowych do hodowli drożdży fermentacyjnych z grupy Saccharomycetes, jak i do produkcji alkoholu etylowego. Na pozostałych w odcieku po fermentacji alkoholowej pentozach i pentozanach można następnie hodować drożdże z grupy Torulopsis. Produkowana w ten sposób masa drożdżowa wykorzystywana jest jako wysokobiałkowy dodatek do paszy dla zwierząt hodowlanych. Utylizacja odcieku pozostałego po hodowli drożdży, nie zawierającego węglowodanów, stanowi poważny problem, tym bardziej, że odciek ten nie może być odprowadzony do rzek ze względu na pozostające w nim składniki toksyczne takie, jak kwasy lignosulfonowe. W celulozowniach odciek ten najczęściej wysokim kosztem zagęszcza się, przy czym odpady z procesu zagęszczania i innych etapów odprowadza się bezpośrednio do rzek, powodując ich poważne zanieczyszczenie.

Celem wynalazku było wykorzystanie odcieków, otrzymywanych po drożdżowaniu ługów posulfitowych do otrzymywania biomasy bogatej w substancje białkowe przez hodowlę na tych odciekach grzy-

2

bów z grupy Basidiomycetes. Znane pożywki, stosowane do hodowli grzybów z grupy Basidiomycetes, wymagają węglowodanowego źródła węgla na przykład glukozy (Fahreus G., Reinhammar B. Acta Chimica Scandinavica 21 2367: 1967). Podstawą teoretyczną do zamiany węglowodanowego źródła węgla na źródło fenolowe, na przykład kwasy lignosulfonowe, jest występowanie w tych grzybach enzymu rozkładającego pierścień aromatyczny pomiędzy grupami fenolowymi, oksygenazy kwasu protokatechowego (Flaig W. Landwirtsch. Forsch. 15 1: 1962). Enzym ten pozwala przekształcić toksyczny dla mikroorganizmu dwufenol lub metoksyfenol w odpowiedni ketokwas, który może stać się substratem do cyklu Krebsa. Praktyczne stosowanie fenolu jako źródła węgla dla grzybów dotychczas jednak nie zostało zrealizowane ze względu na toksyczny dla tych mikroorganizmów charakter fenolu. Maksymalne stężenie związków fenolowych w pożywkach konwencjonalnych nie może przekroczyć 1×10^{-3} mola na litr, czyli około 0,1%.

Tak mała ilość substancji organicznej w środowisku nie może być wystarczającym źródłem węgla. W pożywkach konwencjonalnych jako źródło węgla stosuje się minimum 1% stężenie łatwo przyswajalnej substancji organicznej na przykład glukozy. Podczas produkcji celulozy metodą siarczynową wytwarza się znaczna ilość szkodliwego fenolowego odcieku, tak zwanego płynu posulfitowego, zawierającego około 5% fenolu w postaci kwasów lignosulfonowych

w przeliczeniu na suchą masę. Kwasy lignosulfonowe są to wysoko spolimeryzowane elementy fenylopropanowe o ciężarze cząsteczkowym około 20 000, zawierające grupy sulfonowe przy węglu alfa lub gamma łańcucha bocznego (Schubert S. W. Tappi 50 187: 1967). Pozostałe składniki odcieku to oligosacharydy i cukry monomeryczne, pochodzące z rozkładu hemielulozy i częściowo celulozy. Jakkolwiek znana jest zdolność przyswajania ligniny przez grzyba Basidiomycetes, jednak nieoczekiwane było, że przy odpowiednim doborze składu pożywki, grzyby te będą rosły na podłożu, zawierającym kwasy lignosulfonowe, jak też inne substancje toksyczne.

Stwierdzono, że wprowadzenie do odcieków, otrzymanych po drożdżowaniu ługów posulfitowych, dodatku 0,1% mocznika, eliminuje toksyczne działanie składnika fenolowego, dzięki czemu kwasy lignosulfonowe mogą być wykorzystane jako źródło pokarmu dla grzybów. Pożywkę sporządza się przez zmieszanie z wodą 0,1% wagowych mocznika, 0,3% wagowych superfosfatu, 0,08% drożdży piekarniczych i 5% wagowych suchej masy odcieku po drożdżowaniu, składającego się głównie z kwasów lignosulfonowych. Hodowlę szczepu prowadzi się na wymienionej pożywce po uprzednim zaadaptowaniu szczepów na drodze kilkakrotnego, korzystnie dziesięciokrotnego, pasażowania na pożywce o wyżej wymienionym składzie, lecz zawierającej dodatkowo glukozę w ilości stopniowo zmniejszanej w kolejnych pasażach od 1 do 0% wagowych.

Uzyskana przez wysuszenie i zmielenie grzybni mączka zawiera około 40–50% białka oraz wysoki procent aminokwasów egzogennych i aromatycznych. Mączka, o składzie witaminowym, jakościowo lepszym od borowika, równym pieczarce, o przyjemnym charakterystycznym zapachu i smaku grzybów, zastępuje białkowy składnik w paszy dla drobiu, a składnik fenolowy pożywki po hodowli grzyba jest bądź przyswajany przez rosnące mycelium, bądź utle-

niany do produktów nietoksycznych, co pozwala na odprowadzenie pozostałości do rzeki.

Przykład. Strzępek mycelium jadalnego grzyba *Pleurotus ostreatus* (Bocznika ostrygowatego) ze skosu agarowego zawierającego w litrze roztworu wodnego 10 g asparaginy, 0,5 g siarczanu magnezu siedmiowodnego, 0,45 g kwaśnego fosforanu potasu, 0,47 g kwaśnego fosforanu sodu dwunastowodnego, 0,00002 g wapnia, 0,0000027 g jonów manganu, po 0,000001 g jonów żelaza, cynku i miedzi, 0,00005 g aneuryny i 20 g agaru, hodowanego przez 3 tygodnie na tym skosie w temperaturze 20°C, przeniesiono na 150 ml uprzednio wysterylizowanej pożywki o składzie 0,1% wagowych mocznika, 0,3% wagowych superfosfatu, 0,08% wagowych autolizatu drożdży piekarniczych, 5% wagowych suchej masy odcieku po drożdżowaniu, zawierającej ponadto 1% wagowy glukozy. Hodowlę prowadzono w zaciemnionym miejscu w sposób stacjonarny w temperaturze 20°C.

Po 2 tygodniach strzępek grzybni z hodowli przeniesiono na wysterylizowaną pożywkę o składzie wyżej podanym, z tym, że dodatek glukozy wynosił 0,9% wagowych. Hodowlę prowadzono analogicznie, jak poprzednio. Cykl powtórzono jeszcze kilkakrotnie, biorąc za każdym razem mniej o 0,1% glukozy. W ostatnim pasażu uzyskano szczep przystosowany do hodowli na pożywce bez dodatku glukozy. Grzybnie, rosnące na tej pożywce, homogenizowano sterylnie, wytrząsając ze szklanymi kulkami, które wprowadzono uprzednio do pożywki ostatniej hodowli. 10 ml homogenatu wprowadzono do 150 ml sterylnej pożywki, zawierającej odciek po drożdżowaniu, jak też dodatek mocznika o składzie wyżej podanym i prowadzono hodowlę w sposób opisany wyżej w temperaturze 20°C przez 2 tygodnie, po czym grzybnie odsączono przez gazę, wysuszono w temperaturze 105°C, zważono, zmielono na proszek w młynie tarciowym i oznaczono zawartość białka. Ilościowe wyniki dla omówionego przykładu, oraz dla innych grzybów Basidiomycetes ilustruje załączona tabela.

Gatunek	% suchej masy grzybni po dwóch tygodniach inkubacji*)	% białka**)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacqu.) Fr Nr 13	16,4	41
<i>Trametes versicolor</i> (Schum ex Fr.) Nr 21	10	53
<i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fe. (Pil.) Nr 20	18	40,1
<i>Polistictus versicolor</i> (Fr) Nr 9	19	43
<i>Xanthochrous pini</i> Nr 4	15,5	42
<i>Coriolus versicolor</i> Nr 2	11,6	40,1

*) % suchej masy grzybni obliczono w stosunku do suchej masy odcieku zawartego w pożywce.

**) % białka przeliczono w stosunku do suchej masy grzybni.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania biomasy bogatej w substancje białkowe z ługów posulfitowych, **znamienny tym**, że ługi posulfitowe poddaje się najpierw w znany sposób drożdżowaniu, po czym na odcieku, otrzymanym po oddzieleniu drożdży, prowadzi się hodowlę grzybów Basidiomycetes, dobierając skład ciekłej pożywki tak, aby zawierała ona 5% wagowych suchej masy odcieku po drożdżowaniu, 0,1% 10

wagowych mocznika, 0,3% wagowych superfosfatu i 0,08% wagowych autolizatu drożdży piekarniczych.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do hodowli stosuje się grzyby Basidiomycetes uprzednio zaadaptowane do podłoża hodowlanego na drodze kilkakrotnego, korzystnie dziesięciokrotnego, pasażowania ich na pożywcę o składzie podanym w zastrz. 1 i zawierającej dodatkowo glukozę w ilości stopniowo zmniejszanej w kolejnych pasażach od 1 do 0% wagowych.