



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU 200 792

(11) (B1)

## K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 14 07 78

(21) PV 4706-78

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>C 12 N 1/22

(40) Zverejnené 31 01 80

(45) Vydané 30 11 82

(75)

Autor vynálezu VOJTKOVÁ-LEPŠÍKOVÁ ANNA RNDr. CSc., ŠANDULA JOZEF RNDr. CSc.,  
KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc. a MASLER LADISLAV ing. CSc.,  
BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie mikrobiálnej biomasy

1

Vynález sa týka spôsobu produkcie mikrobiálnej biomasy kvasinkami rodu *Trichosporon* izolovaných z odpadných vôd drevospracujúceho a papierenského priemyslu, schopných utli-  
zovať netradičné substráty: upravený, zahustený predhydrolyzáť, vznikajúci pri sulfátovej  
výrobe celulózy, -xylocel sirup vznikajúci pri výrobe xylózy a drevný hydrolyzáť.

Nedostatok tradičných surovín a obavy z ich vyčerpania obrátili v posledných desať-  
ročiach pozornosť výskumu na nové zdroje a medzi nimi aj odpady drevospracujúceho priemys-  
lu. Izolácia a štúdium rozličných mikroorganizmov schopných ich využívať pre prípravu biel-  
kovinnej biomasy a celulolytických enzýmov je teda vážny teoretický problém a má veľký vý-  
znam pre prax. Izolácia mono a oligosacharidov z uvedených odpadov a ich nasledovné využí-  
tie ako uhľíkatých zdrojov je z technologického a ekonomického hľadiska nevýhodná a naj-  
vhodnejšia cesta je v hľadaní mikroorganizmov schopných využívať netradičné uhľíkaté zdroje  
- odpady bez veľkých úprav náročných na technologické zariadenia.

Z mikroorganizmov sú kvasinky najvhodnejšími producentami bielkovín, ich sušina obsa-  
huje 40 až 65 % bielkovín a majú podobné zloženie aminokyselín ako živočíšne bielkoviny  
s výnimkou síruobsahujúcich aminokyselín.

Pestovanie kvasiniek na drevených hydrolyzátoch a odpadných vodách drevospracujúceho  
priemyslu s cieľom získať krmné bielkoviny je predmetom mnohých prác. V literatúre sa však  
nachádzajú ojedinele zmienky o schopnosti kvasiniek rozkladať polysacharidy, celulózu

a xylán, prípadne hemicelulózy. Schopnosť utilizovať celulózu bola študovaná u rodu *Trichosporon* (C. Dennis J. Gen. Microb. 71, 409 1972) a niektoré kmene druhu *Areobasidium pullulans* (B. Flannigan, Trans. Brit. Mycol. Soc. 55; 277, 1970) u kmeňa *Cryptococcus diffluens*, ktorý rastie na sulfitových výluhoch a dá sa využiť na tvorbu bielkovinného krmiva (J. Hojnosť a spol. Pap. Celulóza 27, V. 31, 1972).

Využívanie sulfitových výluhov fermentačnou cestou je známe, ich sacharidická zložka sa využíva na produkciu etanolu a kŕmneho droždía (Vraná, Papír a cel. 15, 74 (1960), Bárta a spol., Papír a celulóza 23, 333 (1968). Tekuté odpady zo spracovania sulfátovým spôsobom sa doteraz mikrobiálnou cestou nevyužívajú, využívajú sa priamym skrmovaním (Bukovanský, Papír a celul. 30/10 (1975).

Podstatou vynálezu je spôsob produkcie mikrobiálnej biomasy kultiváciou na upravenom zahustenom predhydrolyzáte, alebo sirupe zostávajúcim po výrobe xylózy, alebo drevnom hydrolyzáte, vyznačujúci sa tým, že k zdrojom uhlíka sa pridá síran amónny, kyselý fosforečnan draselný a kvasničný autolyzát, pH média sa upraví na 4,8 až 5,5 a sterilné médium sa zaočkuje kmeňom *Trichosporon pullulans* 6/A-CCY 30-1-4 alebo kmeňom *Trichosporon pullulans* 6/B-CCY 30-1-5 alebo *Trichosporon cutaneum* 15/A-CCY 30-5-13 a kultivuje pri 28 °C počas 3 až 4 dní, potom sa kultúra odstredí, premyje vodou a vysuší, výhodne lyofilizáciou.

Kmene rodu *Trichosporon* boli izolované z odpadných vôd drevospracujúceho a papieren-ského priemyslu a pri ich charakterizácii kmene nejavili žiadne patogénne a toxické vlastnosti. Kmene sú uložené v Československej zbierke kvasiniek v Bratislave pod uvedenými číslami:

- Trichosporon pullulans* 6/A-CCY 30-1-4
- Trichosporon pullulans* 6/B-CCY 30-1-5
- Trichosporon cutaneum* 15/A-CCY 30-5-13.

Uvedené kmene sa vyznačujú tým, že produkujú ureázu, asimilujú lyzín a triptofan a tvoria pravé mycélium - arthrohónie, nevyužívajú laktózu, ribózu, trehalózu, 1-arabínózu, fukózu, arabitol, ribitol, inulín, inozitol. Odlišujú sa v asimilácii dusičnanu draselného, kmene *Trichosporon pullulans* asimilujú dusičnan draselný, kmeň *Trichosporon cutaneum* neasimiluje dusičnan draselný a v asimilácii cukrov ako je vidieť v tab. 1. Pri sledovaní optimálnej teploty rastu 5 °C, 28 °C a 40 °C najlepšie rastú všetky skúmané kmene pri 28 °C.

Ako substráty - jediné zdroje uhlíka pre produkciu mikrobiálnej biomasy sa použili:

1. zahustený predhydrolyzát vznikajúci pri sulfátovej výrobe celulózy z bukového dreva.

Predhydrolyzáty z biologického hľadiska obsahujú sacharidy A-xylózu, 1-arabínózu, D-glukózu, D-galaktózu, D-manózu, oligosacharidy xylózy ako aj nerozštiepené hemicelulózy.

2. Sirup pri výrobe xylózy - zostávajúci ako vedľajší produkt pri výrobe kryštalickej D-xylózy z bukového dreva, ktorý obsahuje sacharidy D-xylózu, arabínózu, ramnózu, galaktózu, manózu.
3. Drevný hydrolyzát - získaný z bukových pilín pôsobením 1 % kyseliny sírovej pri 120 °C po dobu 2 hod., čistený karborafínom a odsolený pomocou vymieňačov iónov.

## Príklad 1

Prípraví sa kultivačné médium, na 1 lit. sa použije 100 ml zahusteného upraveného predhydrolyzátu (xylocelu), 3 g síranu amónneho, 1 g kyslého fosforečnanu draselného a 1 g kvasničného autolyzátu, pH média sa upraví na 5. Sterilné médium sa zaočkuje suspenziou kvasiniek rodu *Trichosporon* a kultivuje na reciprokej trepačke s počtom kyvov 108/min. pri 20 °C po dobu 3 až 4 dní. Potom sa kultúra odcentrifuguje, premyje vodou, biomasa sa lyofilizuje alebo iným vhodným spôsobom suší.

Počas rastu sa sleduje závislosť medzi rastom kultúry a úbytkom substrátu zdroja uhlíka.

Výťažok biomasy bol u uvedených kmeňov 4 až 6 g sušiny na 1 lit. kultivačného média.

## Príklad 2

Do kultivačného média uvedeného v príklade 1 sa pridá sirup zostávajúci po výrobe xylozy tak, aby obsah redukujúcich látok v médiu bol 2 %. Podmienky kultivácie boli také isté ako u príkladu č. 1 s tým, že počas sledovania rastu rastovej krivky (optimálna doba kultivácie bola u sledovaných kmeňov 3 až 4 dni) sa sledoval aj úbytok substrátu. Výťažok biomasy bol u uvedených kmeňov 4 až 7 g sušiny na 1 liter kultivačného média.

## Príklad 3

Do kultivačného média uvedeného v príklade 1 a 2 sa pridá ako jediný zdroj uhlíka drevený hydrolyzáat tak, aby obsah reagujúcich cukrov bol 2 %. Podmienky kultivácie, ako boli uvedené v predchádzajúcich príkladoch. Optimálna doba kultivácie u uvedeného substrátu bola 3 dni a výťažok biomasy bol u uvedených kmeňov 4 až 5 g sušiny na 1 lit. kultivačného média.

Tabuľka č. 1/a

| K m e n e                                | Asimilácia dusíkatých látok |       |           | Asimilácia cukrov |     |   |    |      |    |    |      |   |    |  |  |
|------------------------------------------|-----------------------------|-------|-----------|-------------------|-----|---|----|------|----|----|------|---|----|--|--|
|                                          | KNO <sub>3</sub>            | Lyzín | Triptofan | Ga                | Glc | S | Ma | La   | Ce | Tr | Ra   | X | So |  |  |
| <i>Trichosporon pullulans</i> CCY 30-1-4 | +                           | +     | +         | +                 | +   | + | +  | zdl. | +  | +  | zdl. | + | -  |  |  |
| <i>Trichosporon pullulans</i> CCY 30-1-5 | +                           | +     | +         | +                 | +   | + | +  | zdl. | +  | +  | zdl. | + | -  |  |  |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> CCY 30-5-13 | -                           | +     | +         | +                 | +   | - | -  | -    | -  | -  | -    | - | +  |  |  |

## Vysvetlenie skratiek:

|     |             |    |             |
|-----|-------------|----|-------------|
| Ga  | - galaktóza | Ce | - celobióza |
| Glc | - glukóza   | Tr | - rehalóza  |
| S   | - sacharóza | Ra | - ramnóza   |
| Ma  | - maltóza   | X  | - xylóza    |
| La  | - laktóza   | So | - sorbóza   |

Tabuľka č. 1/b

| K m e n e                         | Asimilácia cukrov |   |   |    |      |    |    |    |     |     |       |      |        |     |
|-----------------------------------|-------------------|---|---|----|------|----|----|----|-----|-----|-------|------|--------|-----|
|                                   | Me                | A | R | Fu | Gluc | In | Er | Ri | Man | Mel | Škrob | Urea | Artkon | Gal |
| Trichosporon pullulans CCY 30-1-4 | +                 | - | - | -  | +    | -  | +  | -  | +   | +   | +     | +    | +      | -   |
| Trichosporon pullulans CCY 30-1-5 | +                 | - | - | -  | +    | -  | +  | -  | +   | +   | +     | +    | +      | -   |
| Trichosporon cutaneum CCY 30-5-13 | -                 | - | - | -  | -    | -  | -  | -  | -   | +   | +     | +    | +      | -   |

Vysvetlenie skratiek:

Me - melibióza

A - arabinóza

R - ribóza

Fu - fukóza

Gluc - glucitol

In - inozitol

Er - erytritol

Ri - ribitol

Man - manitol

Mel - melicitóza

Škrob - test tvorby škrobových látok

Urea - hydrolýza úrey

Artkon - artrokonídie

Gal - galaktitol

## P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob produkcie mikrobiálnej biomasy kultiváciou na upravenom zahustenom predhydrolyzáte, alebo sirupe zostávajúcom po výrobe xylózy, alebo drevenom hydrolyzáte, vyznačujúci sa tým, že k zdrojom uhlíka sa pridá síran amónny, kyselý fosforečnan draselný a kvasničný autolyzát, pH média sa upraví na 4,8 až 5,5 a sterilné médium sa zaočkuje kmeňom Trichosporon pullulans 6/A-CCY 30-1-4 alebo kmeňom Trichosporon pullulans 6/B-CCY 30-1-5 alebo Trichosporon cutaneum 15/A-CCY 30-5-13 a kultivuje pri 28 °C počas 3 až 4 dní, potom sa kultúra odstredí, premyje vodou a vysuší, výhodne lyofilizáciou.