

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

232830

(11) (B1)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 10 08 82

(21) [FV 5942-82]

(40) Zveřejněno 17 07 84

(45) Vydáno 15 01 87

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/32

(75)

Autor vynálezu ŠMIDRKAL MIROSLAV ing., PRAHA

(54) Způsob výroby kvasnic s vyšším obsahem bílkovin

1

2

Při používaných výrobních postupech dochází v kultivačním médiu k nahromadění dusíkatých metabolitů kvasinek, zejména při nepřetržité aerobní kultivaci spojené s vrácením odseparované zápary zpět do média. Zvýšená koncentrace metabolitů v médiu nepříznivě ovlivňuje biosyntézu bílkovin v buňkách kvasinek. Postupně se zhoršuje využívání všech surovin, energie a kapacity zařízení. Obsah dusíkatých látek v sušině kvasinek činí 49—53 %.

Použitím vynálezu se potlačuje nepříznivé působení metabolitů kvasinek na biosyntézu bílkovin. Do média se přidává v průběhu kultivace minerální neasimilovatelná kyselina nebo její aniont spolu s přebytkem kysličníku fosforečného v takovém množství, aby celkový obsah rozpustných minerálních neasimilovatelných aniontů v médiu byl neustále ekvivalentní 8—12 % celkového množství vneseného dusíku a dodávané množství kysličníku fosforečného činilo 4,8—5,5 % vznikající sušiny biomasy.

Z uváděných dvou příkladů je zřejmé, že využitím vynálezu dojde ke zvýšení obsahu dusíkatých látek v sušině biomasy až na 62 proc. a lepší se využítí surovin, energie i technologického zařízení.

Vynález se týká způsobu výroby kvasnic s vyšším obsahem bílkovin, jejich nepřetržitou aerobní kultivací v médiu, obsahujícím etanol, jako zdroj uhlíku.

V posledních letech byla vypracována řada technologických řešení a postupů, která využívají etanolu jako zdroje uhlíku v médiu při mikrobiální syntéze bílkovin, probíhající v kvasničných buňkách při jejich aerobní kultivaci.

Využívá se adaptace kvasinek *Candida utilis* *Torulopsis ethanolicolerans*, pro jejich kultivaci v médiích obsahujících buď čistý (rafinovaný) etanol, nebo surový syntetický etanol. Získané produkty se využívají pro jejich obsah bílkovin a dalších nutričně významných látek, buď k výrobě přípravků pro lidskou výživu, nebo přímo jako důležitá složka k přípravě krmných směsí.

Nevýhodou známých a využívaných postupů mikrobiální výroby kvasnic z etanolu je skutečnost, že nevyužívají v plné míře schopnosti používaných typů kvasinek vytvářet ve svých buňkách při aerobní kultivaci maximální obsah bílkovin. Obsah dusíkatých látek (resp. hrubého proteínu) činí pouze 49–53 % v sušně získávané biomase. Příčinou je nahromadění dusíkatých metabolitů kvasin v kultivačním médiu, k němuž dochází zejména při nejčastěji používaných postupech nepřetržitě aerobní kultivace spojených a recirkulací odseparované zápary.

Při vrácení odseparované zápary zpět do média v průběhu kultivace může dosáhnout zvýšená koncentrace dusíkatých metabolitů v médiu až desetnásobku množství vznikajícího při normálním způsobech kultivace, tj. bez recirkulace odseparované zápary. Zvýšená koncentrace metabolitů ovlivňuje velmi nepříznivě proces biosyntézy bílkovin probíhající v buňkách kvasinek. Se zvyšující se koncentrací metabolitů se postupně zhoršuje využívání etanolu, dusíkatých i fosforečných živin, zhoršuje se i využití technologického zařízení a zvyšuje se spotřeba elektrické energie. Obsah dusíkatých látek v sušně biomasy vyrobených kvasnic dosahuje v nejvýhodnějším případě 50–52 %.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob výroby kvasnic s vyšším obsahem bílkovin jejich aerobní kultivací v živném médiu obsahujícím etanol podle vynálezu, jehož podstatou je, že se k živnému médiu přidává v průběhu kultivace kyselina sírová, nebo její amonná, hořečnatá či draselná sůl, v takovém množství, aby celkové množství rozpustného síranového aniontu v živném médiu bylo neustále ekvivalentní 8–13 % z celkového množství dusíku vnášeného do procesu kultivace. Současně se přidává postupně do živného média v přebytku kyselina fosforečná, nebo sekundární fosforečnan amonný, v množství odpovídajícím 48–55 kg kyslíčiku fosforečného na 1000 kg vzniklé kvasničné sušiny a síran hořečnatý v množství, které odpovídá 6–8 kg MgO

na 1000 kg vzniklé kvasničné sušiny.

Přídavek kyseliny sírové, nebo její amonné, hořečnaté či draselné soli do živného média, spolu s přebytečným množstvím kyslíčniku fosforečného, váže v médiu prostřednictvím uvolněných aniontů většinu dusíkatých metabolitů, které jsou zásadité povahy a snižuje tak jejich retardační účinek na vznik aminokyselin a biosyntézu bílkovin v kvasničných buňkách.

Uvedený přídavek kyseliny sírové, nebo její amonné a hořečnaté soli zajišťuje v průběhu kultivace postupné zvyšování koncentrace amoniakálního dusíku v médiu až na konečných 0,7–1,2 g dusíku/l média. Zvýšená koncentrace amoniakálního dusíku podporuje tvorbu bílkovin v kvasničných buňkách i při vyšší koncentraci metabolitů v kultivačním médiu. Přídavek kyseliny sírové, nebo síranu amonného, hořečnatého či draselného lze nahradit ekvivalentním množstvím kyseliny chlorovodíkové nebo příslušných chloridů.

V tomto případě se však docílí nižšího výsledného efektu.

Použití vynálezu a výhody plynoucí z jeho použití jsou blíže objasněny na dvou příkladech výroby kvasnic jejich nepřetržitou aerobní kultivací v živném médiu, obsahujícím surový syntetický alkohol. V obou případech je používána recirkulace, odseparovaná zápara.

Příklad 1

Kultivace byla prováděna v mechanicky míchaném provozním fermentoru s užitečným plněním 80 m³ média. V průběhu kultivace byla médium provětráváno vzduchem v množství 6500 m³/hod.

Při uvedených podmínkách činila rychlost rozpouštění kyslíku v médiu 170 mmol O₂·l⁻¹·hod.⁻¹. Celková doba trvání nepřetržitě kultivace činila 50 hod. Z této doby trvalo 6 hod. rozkvašení média, včetně jeho doplnění technologickou vodou na celkový objem 80 m³. Další 44 hodin probíhala separace média, při níž byly oddělovány vyrobené kvasnice ve formě kvasničného mléka. Odseparované médium se vracelo zpět do fermentoru místo technologické vody. Veškeré použité suroviny byly pravidelně dávkovány do média v průběhu celých 50 hodin kultivace. Surový syntetický alkohol v koncentraci 92 % hmotových byl do média dodáván automatickým dávkovacím zařízením v závislosti na jeho koncentraci v médiu, která byla udržována v rozsahu 0,06–0,15 % hmotových.

Čpavková voda se přidávala do média automatickým dávkovacím zařízením v závislosti na změně pH, které bylo udržováno v rozsahu pH 4,3–4,5. Ostatní suroviny byly přidávány do média v průběhu kultivace ve formě společného rozboku v závislosti na spotřebě čpavkové vody. Teplota při kultivaci byla udržována v rozmezí 32–33 °C.

Koncentrace kvasničné sušiny byla udržována v rozsahu 20—25 kg/m³.

Ke kultivaci byla použita kvasinka *Torulopsis ethanolitolerans*. Jako inokula bylo použito 4 m³ kvasničného mléka, získaného z předcházející kultivace. Toto kvasničné mléko obsahovalo 155 kg kvasničné sušiny/m³. Před použitím bylo aktivováno kyselou preparační lázní po dobu 1 hod. při pH 2,1.

Celková spotřeba surovin v průběhu kultivace:

19 614 kg absolutního etanolu
 5 090 kg čpavkové vody, 25 % NH₃
 40 kg kyseliny sírové, 96 % H₂SO₄
 75 kg síranu amonného
 525 kg kysličníku fosforečného (ve formě kyseliny — 75% H₃PO₄)
 300 kg heptahydrátu síranu hořečnatého
 300 kg hydroxidu draselného
 3 000 kg zahuštěných lihovarských melasových výpalků, 78 % sušiny

Kromě uvedených surovin byly do média přidávány potřebná mikrobiogenní prvky ve formě síranů: železnatého, zinečnatého, manganatého a měďnatého.

V průběhu kultivace a při jejím ukončení bylo získáno ve formě kvasničného mléka celkem 13 120 kg sušiny biomasy. Po odečtu 620 kg sušiny biomasy, obsažené v násadním kvasničném mléce, činí výtěžek kultivace 12 500 kg sušiny biomasy, tj. 63,7 % sušiny biomasy na zpracovaný absolutní etanol. Průměrná hodinová produkce fermentoru činila 250 kg sušiny biomasy.

V získané sušině biomasy bylo obsaženo v průměru 50,5 % dusíkatých látek. Průměrný obsah tzv. čistých bílkovin obsažených v sušině biomasy činil 43,9 %. Ze 100 kilogramů absolutního etanolu bylo získáno 32,2 kg dusíkatých látek, resp. 28 kg tzv. čisté bílkoviny. Konečná koncentrace amoniakálního dusíku v médiu byla 0,2 g/l. Konečné celkové množství síranového aniontu z vnesené kyseliny sírové a síranu amonného a hořečnatého v 80 m³ média bylo 259 kilogramů. Toto množství síranového aniontu je ekvivalentní 75 kg N, tj. 6,8 % z celkového množství dusíku vzneseného do kultivace. Při kultivaci bylo spotřebováno k výrobě 1 t sušiny biomasy, 42 kg kysličníku fosforečného a 4 kg kysličníku hořečnatého.

Příklad 2

Kultivace byla prováděna na stejném zařízení a za stejných podmínek jako v příkladě 1 opět po dobu 50 hodin. Alkohol a čpavková voda byly do média dávkovány stejným dávkovacím zařízením jako v příkladě 1. Při přípravě společného roztoku

ostatních surovin bylo použito zvýšeného množství kysličníku fosforečného a kysličníku hořečnatého. Tento roztok byl dávkován do média v pravidelných hodinových dávkách. Kromě toho byl do každé dávkován síran amonný v takovém množství, aby obsah amoniakálního dusíku v médiu byl udržován v rozsahu 0,6—0,9 g N/l.

K inokulaci bylo použito 4 m³ kvasničného mléka, získaného z předchozí kultivace, které obsahovalo 600 kg sušiny biomasy. Kvasničné mléko bylo aktivováno kyselou preparační lázní jako v příkladu 1.

Celková spotřeba surovin v průběhu kultivace:

21 076 kg absolutního etanolu
 8 447 kg čpavkové vody, 25 % NH₃
 40 kg kyseliny sírové, 96 % H₂SO₄
 600 kg síranu amonného
 900 kg kysličníku fosforečného (ve formě kyseliny — 75 % H₃PO₄)
 635 kg heptahydrátu síranu hořečnatého
 400 kg hydroxidu draselného
 3 000 kg zahuštěných lihových melasových výpalků, 78 % sušiny

Kromě těchto surovin bylo do média přidáváno stejné množství biogenních prvků jako v příkladu 1.

V průběhu kultivace a při jejím ukončení bylo získáno ve formě kvasničného mléka celkem 17 250 kg sušiny biomasy. Po odečtu 600 kg sušiny biomasy, obsažené v násadním kvasničném mléce, činí výtěžek kultivace 16 650 kg sušiny biomasy, tj. 79 % na zpracovaný absolutní etanol. Průměrná hodinová produkce fermentoru činila 333 kilogramů sušiny biomasy (tj. o 33 % více než v příkladu 1). Spotřeba elektrické energie při vlastní kultivaci byla na jednotku produkce o cca 25 % nižší než v příkladu 1.

V získané sušině biomasy bylo obsaženo průměrně 61,5 % dusíkatých látek, obsah tzv. čistých bílkovin činil 53,5 %. Ze 100 kg absolutního alkoholu bylo získáno 48,6 kg dusíkatých látek, resp. 42,3 kg tzv. čistých bílkovin tj. o 50 % více než v příkladu 1. Spotřeba elektrické energie k výrobě 1 t dusíkatých látek, resp. čistých bílkovin je o 33 % nižší než v příkladu 1.

Konečná koncentrace amoniakálního dusíku v médiu byla 0,8 g N/l. Celkové konečné množství síranového aniontu v 80 m³ média bylo 770 kg. Toto množství síranového aniontu je ekvivalentní 225 kg dusíku tj. 11,8 % z celkového množství dusíku vzneseného do kultivace. Při kultivaci bylo spotřebováno na 1 t získané sušiny biomasy 54 kg kysličníku fosforečného a 6 kg kysličníku hořečnatého.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby kvasnic s vyšším obsahem bílkovin jejich aerobní kultivací v živném médiu, obsahujícím etanol, minerální živiny a zředovací vodu, vyznačený tím, že se k živnému médiu přidává v průběhu kultivace kyselina sírová, nebo její amonná hořečnatá či draselná sůl společně s kyselinou fosforečnou a síranem hořečnatým v takovém množství, aby celkové množství roz-

pustných síranových aniontů v živném médiu bylo neustále ekvivalentní 8—13 % z celkového množství dusíku vneseného do procesu kultivace, množství kysličníku fosforečného odpovídalo 4,8—5,5 % a množství kysličníku hořečnatého odpovídalo 0,6 až 0,9 % z celkového množství sušiny biomasy vznikající v průběhu kultivace.