



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 333

(21) PV 3445-88.R
(22) Přihlášeno 20 05 88

(40) Zveřejněno 14 11 89
(45) Vydáno 19 03 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/32

(75) Autor vynálezu VOLFOVÁ OLGA RNDr. CSc.,
KYSLÍKOVÁ EVA ing. CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV,
PRAHA

(54) Způsob výroby kvasničných produktů
z metanolu

(57) Řešení se týká oboru mikrobiologie, biotechnologie, krmivářství a případně výroby speciálních chemikálií mikrobiální syntézou jako jsou alkohol oxidáza, formaldehyd- a formát dehydrogenáza, dihydroxyaceton syntáza, kataláza, redukovaný glutathion, redukovaný nikotinadenin dinukleotid a adenosintrifosfát. Mikrobiální biomasa a uvedené produkty se získávají kultivací methylotrofních kmenů kvasinek v médiu obsahujícím methanol v koncentraci 0,3 až 1 % hm. a xylózu v koncentraci 0,1 až 0,3 % hmot., a to při teplotě 30 až 40 °C a pH 3,0 až 3,5. Kultivace je prováděna za sterilních podmínek pomocí kmenů kvasinek Candida boidinii 11Bh, C. boidinii 1, Hansenula polymorpha, Pichia nebo jejích směsí a nebo za nesterilních podmínek kultivace a acidotolerantními kmeny kvasinek C. boidinii 2 a Hansenula sp. 3. Odpadní xylózou obsaženou v lignocelulózových hydrolyzátech lze nahradit až z 50 % hmot. surovinu metanol a tak snížit náklady na výrobu krmných kvasnic i C₁ specifických produktů. Takto získaná kvasničná biomasa je bohatá na bílkoviny, esenciální aminokyseliny a vitamíny B₁ a B₂.

Vynález se týká způsobu výroby kvasničných produktů z metanolu.

Xylóza, zejména ve formě odpadních lignocelulóзовých hydrolyzátů slouží jako levný uhlíkatý zdroj pro výrobu krmných kvasnic pomocí jiných než metylotrofních kvasinek (autorské osvědčení č. 1888457 a č. 244335). Xylózu je však možno použít jako surovinu, buď samotnou, nebo v kombinaci s metanolem pro růst metylotrofních kvasinek k získání vysoce hodnotné kvasničné biomasy použitelné jako bílkovinné a vitamínové krmivo pro hospodářská zvířata a jako zdroj pro přípravu C_1 specifických produktů jako alkohol oxidázy, formaldehyd- a formát dehydrogenázy, dihydroxyaceton-syntázy, dále katalázy, redukovaného glutathionu (GSH), redukovaného nikotinadenin-dinukleotidu (NADH) a adenosintrifosfátu (ATP).

Na rozdíl od zahraničních postupů, kdy je pro výrobu biomasy a C_1 specifických produktů, jako je alkohol oxidáza (German Patent 2557623, Unilever PLC, EEC Patent Application 823035), glutathion (Japan Kokai 77, 156, 994) a ATP (Agr. Biol. Chem. 49, 637, 1985) použit čistý metanol a sterilní kultivační podmínky, je možno podle vynálezu nahradit metanol až z 50 % hmot. odpadní xylózou obsaženou v lignocelulóзовých hydrolyzátech při zachování stejné kvality kvasničné biomasy a obsahu C_1 specifických produktů jako ze samotného metanolu a při užití acidotolerantních kmenů metylotrofních kvasinek použít i nesterilní kultivační podmínky. Tím je možno snížit ekonomické náklady jak na surovinu metanol, tak na energii potřebnou ke sterilaci média, zařízení i vedení kultivace.

Předmětem vynálezu je způsob výroby kvasničných produktů z metanolu, jehož podstatou je, že kvasničné metylotrofní kmeny se kultivují v médiu obsahujícím metanol v koncentraci 0,3 až 1 % hmot. a xylózu v koncentraci 0,1 až 0,3 % hmot. při teplotě 30 až 40 °C a pH 3,0 až 3,5.

Jako metylotrofní kmeny kvasinek se používají *Candida boidinii* 11Bh, *C. boidinii* 1, *Hansenula polymorpha*, *Pichia* nebo jejich směsi za sterilních kultivačních podmínek a nebo acidotolerantní metylotrofní kmeny kvasinek *Candida boidinii* 2 a *Hansenula* sp. 3 za nesterilních kultivačních podmínek.

Způsob výroby podle vynálezu je umožněn tím, že metylotrofní kmeny kvasinek jsou schopny během růstu na xylóze v přítomnosti metanolu, na rozdíl od glukózy nebo etanolu, syntetizovat enzymy specifické pro metabolismus metanolu v množství dosahující až 100 % výše hladiny enzymů syntetizovaných v buňkách vyrostlých na samotném metanolu. Tato skutečnost je podmíněna tím, že xylóza je na rozdíl od glukózy a etanolu slabým katabolickým represorem syntézy enzymů specifických pro metabolismus metanolu a v množství 0,1 až 3 g v litru média v přítomnosti i malého množství metanolu jako induktoru nereprimuje syntézu C_1 specifických enzymů vůbec.

Tím, že je xylóza během kultivace metylotrofních kvasinek využívána nezávisle a současně s metanolem s maximálními výtěžky biomasy, je výsledné množství vyrobené kvasničné biomasy na směsích xylózy a metanolu aditivní. Aditivní je tím i výroba všech produktů, které se pomocí biomasy z metanolu vyrábějí.

Schopnost metylotrofních kvasinek produkovat na xylóze s metanolem C_1 specifické produkty a biomasu stejné kvality jako na samotném metanolu, umožňuje šetřit surovinou metanolem a zvýšit výtěžnost biomasy metylotrofních kvasinek vztahenou na spotřebovaný metanol ze 40 % hmot., která je maximální pro metanol, až na 85 % hmot.

Příklad 1

V laboratorním mechanicky míchaném fermentoru s celkovým objemem 5 litrů a plněním 2,5 litru byla provedena jednorázová kultivace kvasinky *Candida boidinii* 2 na minerálním médiu s xylózou. Složení minerálního média bylo: 1 litr vodovodní vody, 3 g NH_4Cl ; 7 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g NaCl ; 100 mg kvasničného extraktu a 10 μg biotinu. Xylóza byla použita v množství 3 g v 1 litru média. pH média během kultivace bylo udržováno automaticky na konstantní výši pH 3,0 dávkováním 3 % hmot. KOH nebo NaOH a teplota na 30 °C. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu byla udržována v rozmezí 50 až 70 % nasycení vzduchem. Inokulem byly buňky kvasinky *C. boidinii* 2 předkultivované na médiu s xylózou a metanolem, s výhodou na médiu s 1 % hmot. metanolem. Využitím xylózy byla získána biomasa kvasinek se 43 % výtěžkem vztaženým na spotřebovanou xylózu. V získané biomase byla detekována hladina specifické aktivity alkohol oxidázy (stanovena na metanol), která byla 40 až 50 % rel. v přepočtu na hladinu aktivity enzymu v buňkách vyrostlých na médiu s metanolem.

Příklad 2

V laboratorním mechanicky míchaném fermentoru o objemu 5 litrů byla provedena jednorázová kultivace kvasinky *C. boidinii* 2 jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že zdrojem uhlíku byla xylóza ve směsi s metanolem v poměru 1 : 1, tj. 3 g xylózy a 3 g metanolu v 1 litru média. Hladina specifické aktivity alkohol oxidázy v získaných buňkách dosahovala 100 % rel. Výtěžek kvasničné biomasy z obou zdrojů byl aditivní. Při přepočtu na spotřebovaný metanol byl 85 %. Pro srovnání byly provedeny ještě další 3 kultivace s poměrem xylózy a metanolu jak uvádí tabulka č. 1

Tabulka 1

Aktivita alkohol oxidázy a výtěžnost biomasy kvasinky *C. boidinii* 2 vyrostlé na směsích xylóza-metanol

		Fermentor			
		1	2	3	4
metanol	g/l	3	3	3	3
xylóza	g/l	1	2	3	7
sp. aktivita alkohol oxidázy rel.	%	100	100	100	40
výtěžnost biomasy vztažené na metanol	%	56	70	85	85

Příklad 3

Ve čtvrtprovozním mechanicky míchaném fermentoru o objemu 75 litrů s plněním 40 litrů minerálního média byla provedena jednorázová kultivace kvasinky *C. boidinii* 2 jako v příkladu č. 2 s tím rozdílem, že 25 až 50 % hm. směs xylóza-metanol byla přidávána do fermentoru odděleně od média přítokovým způsobem v závislosti na koncentraci rozpuštěného kyslíku v médiu během fermentace. Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla udržována automaticky v rozmezí 20 až 40 % nasycení média. pH média bylo udržováno na konstantní výši 3,0 až 3,2 automatickým dávkováním 50 % hm. KOH, NaOH

s výhodou čpavkové vody a teplota na 30 °C. Hladina specifické aktivity alkohol oxidázy i výtěžek biomasy byl jako v příkladu č. 2. Obsah bílkovin v biomase byl 55 %.

Příklad 4

Bylo postupováno stejně jako v příkladu č. 3 s tím rozdílem, že byl použit kvasničný kmen *Hansenula* sp. 3 při kultivační teplotě 37 až 40 °C.

Příklad 5

Bylo postupováno stejně jako v příkladu č. 3 s tím rozdílem, že xylóza byla přidána do směsi ve formě hydrolyzátu lignocelulózových odpadů, s výhodou hydrolyzátu slámy (AO 188457) nebo odpadních xylózových výluhů dřevozpracujícího průmyslu.

Příklad 6

Ve čtvrtprovozním mechanicky míchaném fermentoru o objemu 75 litrů jako v příkladu č. 3 byla provedena kontinuální kultivace kvasinky *C. boidinii* 2 za nesterilních podmínek. Zdrojem uhlíku byla xylóza s metanolem ve směsi jako v příkladě č. 3 nebo jako v příkladě č. 5 s tím rozdílem, že xylóza přitékala do fermentoru spolu s minerálním médiem a metanol byl dávkován odděleně přítokovým způsobem v závislosti na zředovací rychlosti média a na koncentraci rozpuštěného kyslíku v médiu jako v příkladu 3. Zředovací rychlost média byla v rozmezí 0,05 až 0,1 h⁻¹, s výhodou při 0,05 až 0,08. Hladina specifické aktivity alkohol oxidázy, ale i katalázy byla v buňkách 100 % rel. a výtěžek vztahený na spotřebovaný metanol byl 85 %. Obsah bílkovin v kvasničné biomase byl 60 % hmot.

Příklad 7

Bylo postupováno stejně jako v příkladu 6 s tím rozdílem, že byl použit kvasničný kmen *Hansenula* sp. 3 při teplotě 37 až 40 °C a zředovací rychlost média, s výhodou 0,05 až 0,1 h⁻¹.

Kvasničná biomasa získaná způsobem podle vynálezu je bohatá na bílkoviny, esenciální aminokyseliny a vitamíny B₁ a B₂ a lze ji s výhodou použít jako hodnotné bílkovinné a vitamínové krmivo pro hospodářská zvířata a jako zdroj pro výrobu C₁ specifických produktů, jako jsou alkohol oxidáza, formaldehyd- a formát dehydrogenáza, dihydroxyaceton syntáza, dále kataláza, NADH, GSH a ATP.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby kvasničných produktů z metanolu, vyznačený tím, že kvasničné metylotrofní kmeny se kultivují v médiu obsahujícím metanol v koncentraci 0,3 až 1 % hmot. a xylózu v koncentraci 0,1 až 0,3 % hmot, a to při teplotě 30 až 40 °C a pH 3,0 až 3,5.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že jako metylotrofní kmeny kvasinek se používají *Candida boidinii* 11Bh, *Candida boidinii* 1, *Hansenula polymorpha*, *Pichia* nebo jejich směsi za sterilních podmínek a nebo acidotolerantní metylotrofní kmeny kvasinek *Candida boidinii* 2 a *Hansenula* sp. 3 za nesterilních kultivačních podmínek.