



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

214802
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/32

(22) Přihlášeno 23 12 77

(21) (PV 8778-77)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 23 12 76
(30798 A/76) Itálie

(40) Zveřejněno 10 09 81

(45) Vydáno 15 10 84

(72)
Autor vynálezu

ZAFFARONI PASQUALE, MENTANA, SENNI ANTONIO, BRANDUZZI.
PAOLO, ŘÍM, FORMICONI LAMBERTO, MONTEROTONDO (Itálie)

(73)
Majitel patentu

SNAMPROGETTI S. p. A., MILÁN (Itálie)

(54) Způsob výroby biomasy o vysokém obsahu bílkovin

1

2

Způsob produkce biomasy o vysokém obsahu bílkovin fermentací živné půdy novým kmenem Candida NRRL Y-11062, který metabolizuje methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Teploty 20 až 35 °C a pH 2,5 až 6,5 jsou účelné pro dosažení vysokých výtěžků.

Vynález se týká způsobu výroby mikrobiální biomasy o vysokém obsahu bílkovin kultivací kmene kvasinky rodu *Candida*, který je schopen využívat methanolu jako jediného zdroje uhlíku a energie.

V důsledku vysoké reprodukční rychlosti mikroorganismů i jejich obsahu bílkovin představuje tvorba mikrobiálních biomas velmi rychlý způsob výroby bílkovin.

Pro výrobu biomas byly dosud používány odpadní cukry, například melasy z cukrovarů nebo odpadní sulfitové louhy z papíren.

V poslední době byly na základě značné dostupnosti a nízké ceny ropy adaptovány způsoby výroby biomasy používající jako substrát buď surové frakce ropy, nebo vysoce čistěné směsi normálních parafinů.

Použití takových substrátů založených na ropě má z technologického hlediska několik nedostatků, které jsou způsobeny jejich nerozpustností ve vodě, značným množstvím kyslíku, který potřebují mikroorganismy k asimilaci a značným množstvím tepla, které se tvoří během fermentace. Běžné náklady při výrobě biomasy jsou kromě toho zvyšovány hutností dokonalého čištění substrátu nebo/a pečlivým promýváním vznikající biomasy, aby se odstranily potenciálně nebezpečné složky ropy.

K takovým potížím nedochází, jestliže se výroba biomasy provádí za použití nižších alkoholů, například methanolu nebo ethanolu jako substrátů. V důsledku jejich dokonalé rozpustnosti ve vodě, těkavosti i skutečnosti, že jsou dostupné ve vysoké čistotě, je možné získávat biomasu, která je prostá nežádoucích zbytků. Mísitelností s vodou jsou odstraněny problémy s mísením, s kterými se setkáváme u frakcí ropy, zatímco skutečnost, že v jejich molekulách je již obsažen kyslík, snižuje potřebu kyslíku na jejich asimilaci: z této skutečnosti pramení další výhoda, totiž, že tvorba biomasy je provázena sníženým vývojem tepla, čehož důsledkem je snížení nákladů na chlazení.

Ethanol je využíván velkým množstvím mikroorganismů a měl by být ideálním substrátem pro výrobu biomas, avšak jeho cena je poměrně vysoká. Methanol naopak lze vyrábět levně a ve vysokém stupni čistoty. Tato skutečnost se stala podkladem pro úsilí, které bylo vynaloženo na nalezení mikroorganismů, které jsou schopny účinně využívat methanol. Z technické a patentové literatury je známo, že těmto požadavkům si ce vyhovují četné bakterie, zatímco účinnost dosud popsaných kvasinek je spíše nízká.

Obohacením kultivačního média a izolací získaných kvasinkových buněk při kontinuální kultivaci se podle vynálezu podařilo izolovat nový výhodný kmen kvasinky (NRRL Y-11062), který je schopen využívat methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Podstata zdokonaleného způsobu výroby biomasy o vysokém obsahu bílkovin kultivací kvasinkového kmene rodu *Candida*, kte-

rý se provádí při teplotě v rozsahu 20 až 35 °C a při pH o hodnotě 2,5 až 6,5 na živné půdě, která sestává z roztoku solí a která jako jediný zdroj uhlíku a energie obsahuje methanol, a izolací získaných kvasinkových buněk, spočívá podle přítomného vynálezu v tom, že se jako kvasinkového kmene používá kmen *Candida* NRRL Y-11062.

Uvedený nový kmen je uložen ve veřejné sbírce kultur mikroorganismů NRRL (Northern Regional Research Laboratory v městě Peoria, Illinois, Spojené státy americké) pod depozitním registračním označením Y-11062. Vlastnosti tohoto kmene budou zřejmě z následující specifikace jeho znaků.

Kmen NRRL Y-11062 se reprodukuje multipolární germinací a vytváří oddělené vejčité buňky nebo shluky tvořené množstvím podlouhlých buněk (pseudomycelium).

V tekutém kultivačním prostředí tvoří sediment, zatímco v pevném prostředí to jsou buď hladké a lesklé kolonie nebo neprůhledné a svažité kolonie. Při přípravě subkultur kmene na pevném prostředí kmen nabývá stále více hladkého a lesklého vzhledu, což odpovídá v tekutém prostředí odděleným buňkám, zatímco při kultivaci kmene za určitých podmínek v tekutém prostředí převládá pseudomyceliární forma odpovídající zvrásněným a opakním buňkám. Spóry jakéhokoli druhu nebyly pozorovány. Na základě takových morfologických znaků se dospělo k závěru, že kmen náleží do rodu *Candida* podle klasifikace navržené J. Lodderovou v díle „The Yeasts; A Taxonomic Study“, 1970.

Fyziologické vlastnosti uvedeného nového kmene jsou následující:

1. Fermentační využívání některých zdrojů uhlíku:

D-glukóza	+
D-galaktóza	—
sacharóza	—
maltóza	—
trehalóza	—
laktóza	—

2. Růst:

D-glukóza	+
D-galaktóza	—
L-sorbóza	—
sacharóza	—
maltóza	—
cellobióza	+
trehalóza	—
laktóza	—
malibióza	—
rafinóza	—
melezitóza	—
inulin	—
škrob	—
D-xylóza	+
L-arabinóza	—

1. Fermentační využívání některých zdrojů uhlíku:

D-arabinóza	—
D-ribóza	+ (slabě)
L-rhamnóza	—
ethanol	+
glycerol	—
erythrit	—
D-glucit	+
kyselina mléčná	—
kyselina jantarová	—
kyselina citrónová	—
inosit	—
dusičnan	—
bez vitamínů	—
při teplotě 37 °C	+ (slabě)

Srovnání fyziologických vlastností uvedeného nového kmene s vlastnostmi uvedenými vpředu ve studii Lodderové, jakož i s vlastnostmi uvedenými v knize J. A. Barreta a R. J. Pankhursta „A New Key to the Yeasts“ ukázalo, že tento kmen se liší od všech druhů kvasinek popsanych v těchto knihách.

V technické a patentové literatuře bylo popsáno mnoho kvasinek schopných využívat methanol (viz C. L. Cooney a D. W. Levine: „Singlo-cell protein“ II-MIT Press, 1975), avšak vlastnosti kmene SP M 180 se liší od všech kmenů, které jsou vynálezům známé.

Pro tento kmen je svého druhu příznačnou jeho schopnost asimilovat účinněji methanol než ethanol. Kmen lze kultivovat v diskontinuálních i kontinuálních kulturách, avšak jeho vlastnosti se lépe využívají v kontinuálních kulturách.

Kromě toho, v důsledku jeho schopnosti

dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4	2,0 g v litru
dihydrogenfosforečnan sodný NaH_2PO_4	2,0 g v litru
síran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g v litru
síran hořečnatý $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g v litru
síran železnatý $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
chlorid vápenatý CaCl_2	2,0 g v litru
síran zinečnatý $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g v litru
Kvasničný extrakt	200,0 v litru
Biotin	25,0 μg v litru
Stopové prvky (roztoky)	1 ml v litru

Roztok stopových prvků, připravený ve zředěné kyselině chlorovodíkové (1 ml kon-

vytvářet pseudomycelium, lze získat kulturu, která velice snadno sedimentuje: této vlastnosti lze využít pro kontinuální kultivaci s částečným odebráním nebo recyklováním biomasy, což je skutečnost, která umožňuje vyšší hodinovou produkci. Snadná sedimentace činí mimo to izolaci biomasy pohodlnější.

Při praktickém provádění sestává způsob z naočkování půdy kmenem NRRL Y-11062, kterážto půda obsahuje esenciální prvky (dusík, fosfor, draslík, hořčík, železo, vápník), růstové faktory (kvasničné extrakty a biotin), minerální stopové prvky a methanol jako zdroj uhlíku a energie. Živná půda se inkubuje za míchání při teplotě v rozsahu 20 °C až 30 °C, s výhodou mezi 30 °C a 33 °C, přičemž hodnota pH se udržuje mezi 2,5 a 6,5, s výhodou mezi 4 a 4,5, přičemž se kontinuálně dodává plynná směs s obsahem kyslíku, například vzduch.

Buňky kvasinek, které se množí na útraty dodávaných živin, se izolují pomocí sedimentace a filtrace, promývají se vodou a suší zahříváním.

Takto získanou biomasu lze užívat jako takovou jako bílkovinný souhrn pro potraviny a krmiva, nebo z ní mohou být izolovány z ušlechťených produktů, například bílkoviny, aminokyseliny a nukleové kyseliny.

Následující příklady vynález ilustrují, avšak neomezují jeho rozsah.

Příklad 1

500 ml Erlenmeyerovy baňky obsahovaly každá 500 ml živného prostředí o následujícím složení:

síran měďnatý $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	200 mg v litru
kyselina boritá H_3BO_3	500 mg v litru
síran manganatý $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	500 mg v litru
jodid draselný KJ	10 mg v litru
chlorid kobaltnatý $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10 mg v litru
kysličník molybdenový MoO_3	10 mg v litru

centrované kyseliny chlorovodíkové v 1 litru vody), měl následující složení:

Hodnota pH prostředí byla upravena na hodnotu 5,0 a baňka byla potom sterilizována po dobu 20 minut při teplotě 116 °C. Do dvou baněk bylo potom přidáno 0,75 ml (1,9 % objem/objem) methanolu a baňka byla potom zaočkována kmenem NRRL Y-11062 na šikmém agaru. Baňky byly inkubovány po dobu 72 hodin na rotačním míchacím zařízení (220 ot./min., průměr 3,5 centimetru), přičemž teplota 32,5 °C se udržuje termostaticky.

Ostatní baňky, obsahující totéž prostředí a do kterých bylo přidáno 1 % (objem/objem) methanolu, 2 % (objem/objem) ethanolu a 2 % (hmotnost/objem) glukózy byly zaočkovány jednotlivě 5 ml výše specifikované subkultury. Po 24 hodinách inkubace bylo do každé baňky přidáno další 1 % (objem/objem) methanolu. Po celkem 48 hodinách inkubace byl měřen obsah biomasy v baňce, přičemž byly získány následující výsledky:

Substrát	Optická hustota (1 : 10) při 660 nm	Suchá biomasa	
		gramy v litru	bílkoviny
glukóza	0,340	3,99	54,5
methanol	0,270	3,63	51,0
ethanol	0,095	1,18	54,1

Obsah bílkovin byl stanoven biuretovou metodou.

Příklad 2

Do fermentoru s účinným objemem asi 8 litrů a obsahujícím kultivační médium z příkladu 1 byla naočkována suspenze kmene NRRL Y-11062. Do fermentoru, jehož teplota byla řízena termostatem na 32,5 °C byl přidáván methanol tak, aby se zajistilo, že zbytková koncentrace živného prostředí nepřekročí 1 % objemu, vyjádřeno objemově.

Když kultura dodatečně narostla, započalo se s kontinuálním přidáváním sterilního živného prostředí do fermentoru, přičemž sterilní živné prostředí obsahovalo 29,6 g methanolu v litru, zatímco se současně odebíralo množství živné kultury rovnající se množství přidanému ke kultivačnímu prostředí. Množství přidaného prostředí a odběr živné kultury byly zvyšovány, až dosáhly rychlosti ředění ($D = \text{poměr vstupního přítoku ku objemu kultury}$) $0,166 \text{ h}^{-1}$. Vycházející proud obsahoval za těchto pod-

mínek 10,28 g suché biomasy v litru a 146 ppm zbytkového methanolu, s výtěžkem 35 proc. a hodinovou produkcí 1,72 g biomasy na litr. Takto získaná biomasa obsahovala 55,6 % bílkovin (podle biuretové metody).

Příklad 3

K fermentoru druhu popsaného v příkladu 2 byl připojen usazovací tank pro vycházející proud, a část živného prostředí obohacená biomasou byla pravidelně vracena do fermentoru. Přidáváním čerstvého živného prostředí do fermentoru, přičemž živné prostředí obsahovalo 24 g methanolu v litru, za takového přítoku, aby se dosáhlo rychlosti ředění $P, 267 \text{ h}^{-1}$, byla získána v nerecyklovaném podílu vycházejícím ze sedimentačního tanku vyfermentovaná kultura obsahující 7,80 g biomasy v litru a 120 ppm zbytkového methanolu, s výtěžkem 32,5 % a hodinovou produkcí 2,08 g v litru. Takto získaná biomasa obsahovala 53,0 % bílkovin (podle biuretové metody).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby biomasy o vysokém obsahu bílkovin kultivací kvasinkového kmene rodu *Candida* při teplotě v rozsahu 20 až 35 °C a při pH o hodnotě 2,5 až 6,5 na živné půdě, která sestává z roztoku solí, a která

jako jediný zdroj uhlíku a energie obsahuje methanol, s izolací získaných kvasinkových buněk, vyznačující se tím, že se jako kvasinkového kmene používá kmen *Candida* NRRL Y-11062.