



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 379

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 20 11 78
(21) PV 7523-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/00

(40) Zveřejněno 30 04 80

(45) Vydáno 01 04 83

(75)

Autor vynálezu ŠTROS FRANTIŠEK ING. CSC. a ADÁMEK LUBOMÍR DR., PRAHA

(54) Způsob dávkování substrátu a minerálních živin při aerobních
kultivacích mikroorganismů

1

Předmětem vynálezu je způsob dávkování substrátu a minerálních živin při aerobních
kultivacích mikroorganismů na kyselině octové.

Jedním z petrochemických produktů přicházejícím v úvahu jako výchozí surovina pro
mikrobiální procesy je syntetická kyselina octová. Na bázi kyseliny octové jako substrátu
jsou vyvíjeny především postupy pro výrobu mikrobiálních bílkovin nebo pro fermentační
přípravu aminokyselin.

Ve srovnání s jinými substráty je kyselina octová zdrojem uhlíku, který již při po-
měrně nízkých koncentracích inhibuje růst mikroorganismů. Při příliš nízkých koncentra-
cích je však růstová rychlost mikroorganismů podle známého Monodova vztahu opět bržděna
nedostatkem substrátu. Proto je třeba při kultivacích na kyselině octové udržovat koncen-
traci substrátu v médiu v poměrně úzkém rozmezí.

Podobně jako při kultivacích mikroorganismů na většině jiných substrátů je i při
zpracovávání kyseliny octové výhodnější nelimitovat růstovou rychlost zdrojem uhlíku,
ale kultivovat v limitu kyslíku. Pro zajištění těchto kultivačních podmínek je třeba u-
držovat v médiu nadlimitní koncentraci substrátu a doplňovat substrát spotřebovávaný mi-
kroorganismy. Při kontinuálních kultivacích je třeba stejným způsobem dávkovat i minerál-
ní živiny.

Problémy dávkování substrátu a minerálních živin řeší jednoduchým způsobem postup

202 379

podle vynálezu, při němž se při aerobní kultivaci mikroorganismů na kyselině octové za udržování pH kultivačního média v určeném rozmezí dává do kultivačního média, obsahujícího 0,1 až 2 g/l, s výhodou 0,3 až 1 g/l, octanu amonného, při vzestupu pH nad horní mez určeného rozmezí směsný roztok kyseliny octové, kyselého fosforečnanu draselného, síranu hořečnatého, amoniaku a případně i dalších živin a že se při zpomalení růstu mikroorganismů do kultivačního média přidává amoniak.

Amoniak je ve směsném roztoku obsaženo jen 80 až 90 % z vypočteného množství, zajišťujícího živění mikroorganismů dusíkem.

Zpomalení růstu, při kterém se do kultivačního média přidává amoniak, je indikováno prodloužením časového intervalu mezi dvěma po sobě následujícími dávkami směsného roztoku, vzestupem koncentrace kyslíku rozpuštěného v kultivačním médiu nebo vzestupem obsahu kyslíku, případně poklesem obsahu kysličníku uhličitého ve výdechu fermentoru.

Postup dávkování substrátu do kultivačního média podle vynálezu je založen na skutečnosti, že v octanu amonném je poměr mezi kyselinou octovou a amoniakem (3,5 : 1) mnohem menší, než je poměr množství obou živin spotřebovávaných pro tvorbu mikrobiální biomasy (20,8 : 1 až 25,8 : 1). Proto se při růstu mikroorganismů na octanu amonném podstatně rychleji spotřebovává aniont a do média se uvolňuje amoniak, který způsobuje vzestup pH. Při úpravě pH na určenou hodnotu kyselinou octovou se uvolněný amoniak zneutralizuje a předložená koncentrace octanu amonného v médiu se obnovuje.

Spolu s kyselinou octovou je možno při úpravě pH do média dávkovat i minerální živiny, a to ve formě směsného roztoku, ve kterém poměr jednotlivých živin odpovídá jejich spotřebě při syntéze biomasy. Umožňuje to skutečnost, že přídavek minerálních živin ke kyselině octové nesnižuje její neutralizační schopnost a že směsný roztok je čirý. Při regulačním postupu podle vynálezu je třeba jako zdroj kysličníku fosforečného a draslíku použít kyselý fosforečnan draselný, ve kterém je kysličník fosforečný a draslík v poměru odpovídajícím jejich spotřebě při syntéze biomasy. Při kultivaci mikroorganismů je sůl úplně spotřebována a neovlivňuje zbytkovými ionty pH média. Bez vlivu na pH je i aniont síranu hořečnatého, který se z větší části spotřebovává jako zdroj síry.

Aby koncentrace acetátu v médiu nestoupala při dosažení vyššího výtěžnostního koeficientu, než se předpokládá při výpočtu složení směsného roztoku, přidává se do směsného roztoku menší množství amoniaku, než odpovídá jeho obvyklé spotřebě na tvorbu biomasy, a to o 10 až 20 %. Amoniak obsažený ve směsném roztoku pak nestačí plně krýt spotřebu dusíku při biosyntéze, při kultivaci se spotřebovává i část amoniaku z předloženého octanu amonného a koncentrace acetátu v médiu pozvolna klesá. Po určité době se koncentrace acetátu sníží na hodnotu, při níž je již limitován růst a růstová rychlost mikroorganismů se sníží. Snížení růstové rychlosti se projeví prodloužením časového intervalu mezi po sobě následujícími dávkami směsného roztoku, rychlým vzestupem koncentrace kyslíku rozpuštěného v médiu a také vzestupem obsahu kyslíku a poklesem obsahu kysličníku uhličitého ve směsi plynů odcházejících z fermentoru. Některou z jmenovaných změn je možno využít k impulzu pro přídavek amoniaku do kultivačního média. Amoniak zvýší pH, je ihned zneutralizo-

ván, směsným roztokem a koncentrace octanu amonného v médiu je obnovena. Velikost dávky amoniaku musí odpovídat žádané koncentraci octanu amonného v médiu. Má-li být například nejvyšší koncentrace octanu amonného v médiu 1 g/l, nesmí být přídavek 20 %ní čpavkové vody větší než 1 ml na litr kultivačního média.

Způsob dávkování substrátu a minerálních živin podle vynálezu umožňuje při kultivaci mikroorganismů udržet koncentraci kyseliny octové v optimálním rozmezí a spolu se substrátem dávkovat úměrně růstu biomasy i minerální živiny. Při použití regulačního pH-metru lze postup dávkování zautomatizovat. Systém dávkování podle vynálezu může být použit nejen při kontinuálním pěstování mikroorganismů, ale i při jednorázových přítokových kultivacích, při kterých zajišťuje přídavky živin odpovídající stoupajícím přírůstkům biomasy a plně nahrazuje složité programové dávkování. Postup je vysvětlen, nikoli však omezen, následujícím příkladem.

Příklad

V laboratorním skleněném fermentoru s užitečným obsahem 15 l, opatřeném samonasávacím míchadlem a usměrňovacím difuzorem, byla provedena jednorázová přítoková kultivace kvasinky *Candida utilis* CCY 29-38-64 na kyselině octové. Aerační podmínky ve fermentoru jsou charakterizovány hodnotou VVM 0,73 a siřičitanovým číslem 210 mmol O_2 /l.h. Fermentor je opatřen automatickou regulací teploty a pH. Kultivace byla vedena při teplotě 33 °C a pH se upravovalo na 4,0.

Před zahájením kultivace se do fermentoru napustila voda, přidalo se inokulum odpovídající 30 g kvasničné sušiny, 15 g octanu amonného a pH se upravilo na 4,0. Počáteční objem kultivačního média byl 15 l.

Substrát a minerální živiny se v průběhu kultivace dávkovaly do média ve formě směsného roztoku regulačním pH-metrem při vzestupu pH nad určenou hodnotu 4,0. Směsný roztok pro předpokládaný přírůstek 150 g kvasničné sušiny obsahoval 383 g kyseliny octové (98 % CH_3COOH), 10,1 g kyselého fosforečnanu draselného (52,1 % P_2O_5 ; 34,6 % K_2O), 3,6 g síranu hořečnatého heptahydrátu (16,3 % MgO) a 63 ml čpavkové vody (20 % NH_3). Skladba směsného roztoku byla vypočítána za předpokladu, že se dosáhne výtěžnostního koeficientu 0,4 g/g a že sušina biomasy bude obsahovat 9,5 % N, 3,5 % P_2O_5 , 2,3 % K_2O a 0,4 % MgO . Minerální živiny se před smícháním s kyselinou rozpustily ve 100 ml vody. Amoniak se do směsného roztoku přidalo jen 80 % z vypočtené spotřeby.

Při zpomalení růstu kvasinek způsobeném nízkou koncentrací substrátu se do kultivačního média dávkovala čpavková voda. Dávkování amoniaku zajišťoval časový prvek připojený na vývod z pH-metru k dávkovači kyselého směsného roztoku, a to při prodloužení časového intervalu mezi dávkami směsného roztoku z obvyklých 1 - 2 minut na 3 minuty. Jedna dávka čpavkové vody byla asi 10 ml. V průběhu sedmihodinové kultivace byl amoniak přidán do média dvakrát, a to mezi 2. a 3. a mezi 5. a 6. hodinou.

Při kultivaci bylo dosaženo přírůstku 153 g kvasničné sušiny, což odpovídá výtěžnostnímu koeficientu 0,408 g/g.

202 379

V tabulce 1 je zachycen průběh obsahu kyseliny octové a amonného dusíku v médiu, který svědčí o tom, že se při kultivaci koncentrace octanu amonného v médiu udržovala v rozmezí 200 až 1200 mg/l.

Tabulka

hodina kultivace	Kyselina octová v médiu mg/l	Amonný N v médiu mg/l
0	790	180
1	440	105
2	205	50
3	905	210
4	510	120
5	220	55
6	850	200
7	415	100

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob dávkování substrátu a minerálních živin při aerobních kultivacích mikroorganismů na kyselině octové za udržování pH kultivačního média v určeném rozmezí, vyznačený tím, že se do kultivačního média, obsahujícího 0,1 až 2 g/l, s výhodou 0,3 až 1 g/l, octanu amonného, dává při vzestupu pH nad horní mez určeného rozmezí směsný roztok kyseliny octové, kyselého fosforečnanu draselného, síranu hořečnatého, amoniaku a případně i dalších živin a že se při zpomalení růstu mikroorganismů do kultivačního média přidává amoniak.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že směsný roztok obsahuje jen 80 až 90 % amoniaku z vypočteného množství, zajišťujícího živění mikroorganismů dusíkem.