



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210 225

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 13 03 80
(21) PV 1724-80

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/16

(40) Zveřejněno 30 04 81
(45) Vydáno 30 08 82

(75)

Autor vynálezu ŠTROS FRANTIŠEK ing. CSc., RUT MILOSLAV ing., KRUMPHANZL VLADIMÍR prof.ing.DrSc.,
KADLEC KAREL ing. CSc., PRAHA a EDERER KAREL ing. ÚSTÍ NAD LABEM

(54)

Způsob aerobní kultivace kvasinek na etanolu

Vynález se týká způsobu aerobní kultivace kvasinek na etanolu vedené za upravnutí pH kultivačního média na zvolenou hodnotu a při udržování koncentrace etanolu v médiu v předepsaném rozmezí s použitím močoviny jako zdroje dusíku a roztoku hydroxydu draselného jako zdroje draslíku přičemž zdroj dusíku, fosforu, hořčíku a mikrobiogenních prvků se přidává do média ve formě směsného roztoku.

Vynález se týká způsobu aerobní kultivace kvasinek na etanolu a upravuje především složení roztoku zdrojů prvků, metodu jeho dávkování do média a postup při úpravě pH.

Postup používaný při kultivaci kvasinek na syntetickém etanolu má některé charakteristické rysy, kterými se odlišuje od kultivačních postupů na jiných surovinách. Kultivace je vedena na principu nutristatu, což znamená, že koncentrace zdroje uhlíku i zdrojů jiných makro- a mikrobiogenních prvků v médiu se udržují v rozmezí hodnot, při kterých ještě není růst kvasinek významněji brzděn. Kultivace, při níž není růst kvasinek limitován zdroji biogenních prvků, se rychle dostává do limitu kyslíku, který je jednou z podmínek pro dosažení vysoké výtěžnosti. Množství odpadních vod z kultivačního procesu se omezuje téměř úplnou recirkulací odstředěného média a tento postup si vynucuje takovou skladbu živin, při které zůstává v prokvašeném médiu jen minimální množství nevyužitelných iontů. Tyto požadavky se splňují tím, že se jako zdroj draslíku a fosforu používá kyselý fosforečnan draselný nebo ekvivalentní množství hydroxidu draselného a kyseliny fosforečné. Možnost úpravy pH a dávkování zdroje dusíku se zajišťuje tak, že se ve fermentujícím médiu udržuje určitá minimální koncentrace síranu amonného. Rostoucí kvasinky spotřebovávají amonný iont, do média se uvolňuje kyselina sírová a pokles pH se vyrovnává přidávkou amoniaku, který je současně rozhodujícím zdrojem dusíku při kultivaci. Udržování potřebné koncentrace zdroje uhlíku a případně i jiných biogenních prvků je předmětem celé řady československých autorských osvědčení (AO č. 158 954, 158 991, 164 315, 182 649, 179 554, 192 622).

Realizovatelnost popsaného postupu je do značné míry závislá na možnosti použít jako zdroj dusíku amoniak nebo čpavkovou vodu. Při nutnosti náhrady amoniaku jiným zdrojem dusíku se komplikuje regulace pH při kultivaci a omezuje se možnost vracení odstředěného média do fermentoru. Další nevýhodou postupu je to, že ze solí potřebných makro- a mikrobiogenních prvků nelze připravit jediný čirý roztok.

Tyto nevýhody odstraňuje aerobní kultivace kvasinek na etanolu podle vynálezu, vedená za upravování pH kultivačního média na zvolenou hodnotu a při udržování koncentrace etanolu v médiu v předepsaném rozmezí měřeným přidávkou etanolu, při níž se zdroj dusíku, fosforu, hořčíku a mikrobiogenních prvků dává do média ve formě směsného vodního roztoku, obsahujícího močovinu, kyselinu fosforečnou, hořečnatou sůl a soli mikrobiogenních prvků, přičemž množství tohoto roztoku se řídí podle přidávky etanolu, a že se pH média udržuje v určeném rozmezí přidáváním roztoku hydroxidu draselného sloužícího zároveň jako zdroj draslíku.

Litr roztoku postačujícího pro přírůstek 1 kg kvasničné sušiny obsahuje například 210 g močoviny, 40 g kyseliny fosforečné 85 % hmotnostních, 32 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g NaCl , 1,0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a dává se do média při přidávku 1,3 až 1,4 kg absolutního etanolu.

Roztok živin může mít i jinou koncentraci a podle místních podmínek může obsahovat větší nebo menší počet mikrobiogenních prvků a to ve formě různých rozpustných solí. Důležité je, aby poměr složek roztoku živin odpovídal poměru, v jakém jsou živiny potřebné pro tvorbu biomasy. Objem živného roztoku v litrech V, odpovídající přidávku 1 kg absolutního etanolu,

se vypočte ze vzorce

$$V = \frac{Y_{x/s}}{B}$$

kde $Y_{x/s}$ je předpokládaný výtěžnostní koeficient (g kvasničné sušiny vytvořené z 1 g etanolu) a B je množství biomasy v kg, které může vzniknout z 1 litru roztoku živin.

Při způsobu kultivace kvasinek na etanolu podle vynálezu se místo amoniaku jako zdroj dusíku používá močovina při zachování možnosti jednoduché, převážně jednostranné, regulace pH a bez omezení míry recirkulace odstředěného média. Další výhodou nového postupu je to, že lze živiny včetně mikroprvků přidávat do média ve formě jediného čirého roztoku.

Způsob kultivace podle vynálezu je znázorněn následujícím příkladem.

Příklad 1

V laboratorním skleněném fermentoru o obsahu 30 l a užitečném plnění 15 l byla provedena jednorázová přítoková kultivace kvasinky *Candida utilis* CCY 29 38 64. Fermentor je opatřen samonasávacím míchadlem a při vzdušnosti 0,73 VVM je dosahovaný přenos kyslíku charakterizován siřičitanovým číslem 200 mmol $O_2 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$.

Počáteční koncentrace inokula odpovídala 2 g $\cdot l^{-1}$ kvasničné sušiny. V průběhu kultivace se teplota automaticky udržovala na 35 °C a pH se regulačním pH-metrem upravovalo na hodnotu 4,0. Při poklesu pH pod zvolenou hodnotu dávkoval pH-metr do média roztok hydroxidu draselného o koncentraci 300 g $\cdot l^{-1}$ KOH, ve vyjimečných případech, kdy vystoupilo pH nad určenou hodnotu přidával přístroj do fermentující tekutiny roztok kyseliny sírové 20 % hmotnostních. Přístrojem Metrex DEL se koncentrace etanolu v médiu udržovala v rozmezí 0,8 až 1,2 g $\cdot l^{-1}$. Přístroj ovládal dvojcestné peristaltické čerpadlo, kterým se pro udržení předepsaného rozmezí koncentrace etanolu do média přidával syntetický líh obsahující 90,4 % objemových etanolu, tj. 714 g etanolu v litru. Týmž čerpadlem se současně druhou hadičkou dávkoval do fermentujícího média roztok živin obsahující v litru: 105 g močoviny, 20 g kyseliny fosforečné 85 % hmotnostních, 16 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1,55 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0,6 g NaCl, 0,25 g $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,5 g $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, 0,01 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,05 g $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$.

Při této koncentraci živin stačí roztok pro produkci 0,5 kg kvasničné sušiny. Poměr přídatku syntetického lihu a dávky roztoku živin 1 : 1 odpovídá předpokladu, že se dosáhne výtěžnostního koeficientu 0,7.

Kultivace trvala 5 hodin a v jejím průběhu se spotřebovalo 520 ml syntetického lihu, což odpovídá 371 g absolutního etanolu a 525 ml roztoku živin. Čistý přírůstek kvasničné sušiny byl 269 g a odpovídá výtěžnostnímu koeficientu 0,725. Na úpravu pH se spotřebovalo 30 ml roztoku KOH, což odpovídá spotřebě 33,5 g KOH na 1 kg kvasničné sušiny. Roztoku kyseliny sírové se spotřebovaly jen 3 ml pro úpravu pH média na počátku a na konci kultivace.

Vypěstované kvasinky obsahovaly v sušině 8,45 % celkového dusíku tj. 52,8 % dusíkatých látek, 6,8 % nukleových kyselin, 46 % čistých bílkovin a 7,2 % popela.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob aerobní kultivace kvasinek na etanolu vedené za upravování pH kultivačního média na zvolenou hodnotu a při udržování koncentrace etanolu v médiu v předepsaném rozmezí měřeným přídatkem etanolu, vyznačený tím, že se zdroj dusíku, fosforu, hořčíku a mikrobiogenních prvků dává do média ve formě směsného vodního roztoku, obsahujícího močovinu, kyselinu fosforečnou, hořečnatou sůl a soli mikrobiogenních prvků, přičemž množství tohoto roztoku se řídí podle přídatku etanolu, a že se pH média udržuje v určeném rozmezí přidáváním roztoku hydroxidu draselného sloužícího zároveň jako zdroj draslíku.