



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

245339

(11)

(B1)

[51] Int. Cl.⁴
C 12 N 1/16

(22) Prihlášené 27 02 85

(21) {PV 1384-85}

(40) Zverejnené 16 12 85

(45) Vydané 15 12 88

{75}

Autor vynálezu

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc.;
HRMOVÁ MÁRIA RNDr. CSc.; KOŠÍK MARTIN doc. ing. CSc.;
ŠTURDÍK ERNEST ing. CSc.; BIELY PETER RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy kvasničnej biomasy z 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy

1

2

Riešenie sa týka spôsobu prípravy kvasničnej biomasy z 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy. Podstata spôsobu prípravy kvasničnej biomasy z 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy spočíva v tom, že sterilné tekuté kultivačné médium obsahujúce 2,0 až 6,0 % hmot. 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy sa zaočkuje 46 až 50 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-14 alebo CCY 27-1-22 alebo CCY 27-1-32 alebo CCY 76-1-1 alebo CCY 103 a kultivácia sa robí pri teplote 25 až 28 stupňov Celzia za premiešavania po dobu 2 až 7 dní. Vynález má použitie v poľnohospodárstve, potravinárskom, chemickom a farmaceutickom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu prípravy kvasničnej biomasy z 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy.

1,6-Anhydro- β -D-glukopyranóza (levoglukozán) sa doteraz nevyužívala na produkciu mikrobiálnej biomasy preto, lebo bežne používané kvasinky ako napr. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini* a *Candida utilis* pravdepodobne nesyntetizujú konštitutívne alebo inducibilné enzýmy potrebné pre metabolizmus levoglukozánu [A. Kocková-Kratochvílová: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy, Bratislava, Alfa, 348 (rok 1982)]. Preto sa pre výrobu kvasničnej biomasy používajú melasy obsahujúce ako hlavnú cukornú zložku sacharózu [D. Halama: Technická mikrobiológia, Bratislava, SNTL, 201 (1967)]. Avšak levoglukozán pridávaný do kultivačného prostredia vo forme kryštalickej látky je využívaný pre rast *Aureobasidium pullulans* a iných kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov ako sú napr. *Wingea robertsii*, *Arthroascus javanensis*, *Cephaloascus albidus*, *Candida ingens*, *Wickerhamia fluorescens*, *Debaryomyces cantarellii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pachysolen tannophilus*, *Leucosporidium scottii*, *Trichosporon beigellii*, ako aj ďalších mikroorganizmov produkujúcich enzým β -glukozidázu.

Kmeň *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-14 bol izolovaný z kvetov rastliny *Crathaegus oxyacantha* z Devínskej Kobyly. Kmene *Aureobasidium pullulans* rastú vo forme hýf s blastokonídiami, ktoré majú dĺžku 6 až 16 μm (priemer 12,16 μm) a šírku 3 až 8 μm (priemer 4,45 μm). Tvorí hýfy dvoch druhov: vzdušné tenké o priemere 4 až 6 μm a submerzné hrubé o priemere 6,6 μm . Dĺžkový pomer blastokonídií je 2,73 a kvocient povrchu voči objemu buniek je 1,12. Blastokonídie sú vretenovitého tvaru, ktoré pučia bilaterálne a monompolárne tvoriac tak sekundárne blastodonídie, ktoré sú menšie ako primárne blastokonídie [A. Kocková-Kratochvílová, M. Černáková, E. Sláviková: Folia Microbiol. 25, 56 (1980)]. Kmeň CCY 27-1-14 patrí do skupiny kmeňov, ktoré využívajú D-xylózu, L-arabinózu, maltózu, sacharózu, laktózu, celobiózu, trehalózu, rafinózu, melazitózu, rozpustný škrob, kyselinu D-glukurónovú a D-galakturónovú, kyselinu dusičnú a L-lyzín. Kmeň CCY 27-14 využíva atmosférický dusík. Rastie dobre na sulfitovom výluhu. Kmeň CCY 27-1-14 produkuje enzýmy ako napr. ureázu (EC 3.5.3.1), extracelulárnu ribonukleázu, deoxyribonukleázu, arylesterázu (EC 3.1.1.2), endo-1,4- β -D-glukanázu (EC 3.2.1.4) a endo-1,4- β -D-xylanázu (EC 3.2.1.8). Enzým monofenol-monooxygenázu (EC 1.14.18.1) produkuje len v stopových množstvách, takže za daných kultivačných podmienok fermentačné médium nečernie od produkcie melanínu, ako je to u niektorých iných kmeňov tohoto druhu. Kmeň CCY 27-1-14 produkuje polysacharid pululán a rastie prevážne vo forme kvasinkovitých bu-

niek [M. Černáková, A. Kocková-Kratochvílová, L. Šuty, J. Zemek, E. Kuniak: Folia Microbiol. 25, 68 (1980); A. Kocková-Kratochvílová, L. Hronská: Folia Microbiol. 26, 117 (1981); A. Kocková-Kratochvílová: Folia Microbiol. 27, 404 (1981)].

Kmeň CCY 27-1-22 rastie prevážne vo forme myceliárnej. Tvorí polysacharid pululán. Kmeň CCY 27-1-32 vytvára čierny pigment melanín uložený hlavne v chlamydospórach. Súčasne produkuje aj pululán. Kmeň CCY 76-1-1 tvorí hýfy s vysokým obsahom tukov a ďalej syntetizuje heteropolysacharid so značným obsahom D-xylózy. Nesyntetizuje melanín. Kmeň CCY 103 rastie vo forme reťazkovitých buniek a hromadí glykogén a trehalózu. Netvorí melanín a nerastie v hýfálnej forme.

Podstata spôsobu prípravy kvasničnej biomasy z 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy v sterilnom tekutom kultivačnom médiu spočíva v tom, že sterilné tekuté kultivačné médium obsahujúce 2,0 až 6,0 % hmot. 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy sa zaočkuje 46 až 50 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-14 alebo CCY 27-1-22 alebo CCY 27-1-32 alebo CCY 76-1-1 alebo CCY 103 a kultivácia sa robí pri teplote 25 až 28 °C za premiešavania po dobu 2 až 7 dní.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy kvasničnej biomasy z levoglukozánu ako jediného zdroja uhlíka a energie s použitím kmeňov kvasinkovitého mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans* je, že sa takto využíva substrát vznikajúci z celulóзовého odpadu. Ďalšou výhodou je, že *Aureobasidium pullulans* má také morfogenetické a biochemické vlastnosti, ktoré spolu s jeho jednoduchou kultiváciou a produkciou dostatočného množstva biomasy sú rozhodujúcimi faktormi pre priemyselné uplatnenie spôsobu prípravy biomasy.

Príklad 1

48 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-14 (kmeň je uložený v Československej zbierke kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov, Chemický ústav, Centrum chemického výskumu SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava) sa zaočkuje sterilné tekuté kultivačné médium obsahujúce 2,0 % hmot. kryštalického levoglukozánu, 1,0 až 2,0 % hmot. síranu amónneho, 0,02 až 0,05 % hmot. síranu horečnatého, 0,1 až 0,25 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 0,025 ml suspenzie mikroelementov (suspenzia mikroelementov obsahuje 0,1 % hmot. heptahydrátu síranu železnatého, 0,016 % hmot. tetrahydrátu síranu mangánatého, 0,0072 % hmot. tetrahydrátu molybdenanu amónneho, 0,0352 % hmot. dekahydrátu tetrahydrátu dvojsodného, 0,006 % hmot. pentahydrátu síranu meďnatého, 0,124 % hmot. heptahydrátu síranu amónneho) a 0,1 ml roztoku vitamínov (roztok vitamínov obsahuje

0,1 % hmot. {1,2,3,5} 4,6 (cyklohexándexolu) (**myo**-inozitolu), 0,04 % hmot. kyseliny pyridín-3-karboxylovej (kyseliny nikotínovej), 0,04 % hmot. kyseliny 4-aminobenzoovej, 0,0002 % hmot. 5-(2-oxoimidazolidín-[4,5-c]tiol-2-yl)pentánovej kyseliny, 0,04 % hmot. D-(+)-N,N(2,4-dihydroxy-3,3-dimetylbutyryl)- β -2-aminopropionátu vápenatého (pantotenátu vápenatého), 0,04 % hmot. 3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymetyl)-2-metylpyridínu (pyridoxínu), 0,02 % hmot. 3-(4-amino-2-metylpyrimidyl-5-metyl)-5-(2-hydroxyetyl)-4-metyltiazolu (tiamínu). pH kultivačného média sa upraví hydroxidom sodným na 5,0 až 6,5. Kultivácia mikroorganizmu prebieha po dobu 2 až 7 dní pri teplote 25 až 28 °C na rotačnej trepačke (2,5 Hz). Výťažok kvasničnej biomasy dosiahol 0,9 % hmot. sušiny, čo predstavuje 45 % hmot. 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy. Kvasničná biomasa s obsahom 37 % hmot. bielkovín, 3 % hmot. ribonukleovej kyseliny, 0,4 % hmot. deoxyribonukleovej kyseliny a 59,6 % hmot. ostatných bunkových zložiek vztiahnuté na sušinu sa separuje od kultivačného média centrifugáciou alebo filtráciou.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije 3,0 % hmot. kryštalický levoglukozán a ako zdroj dusíka 0,1 % hmot. dusičnan draselný a takéto kultivačné médium sa zaočkuje 48 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-22 uloženého v tej istej zbierke ako kmeň CCY 27-1-14. Pri použití dusičnanu draselného ako zdroja dusíka sa zvýši produkcia blastokonidií a potlačí tvorba hýf, takže kultúra má kvasinkovitý charakter. Výťažok kvasničnej biomasy dosahuje 1,5 % hmot. sušiny, čo odpovedá 50 % hmo. 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že kultivačné médium obsahujúce 4,0 % hmot. kryštalický levoglukozán sa zaočkuje 46 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-32 uloženého v tej istej zbierke ako kmeň CCY 27-1-14. Výťažok kvasničnej biomasy dosahuje 2,1 % hmot. sušiny.

Príklad 4

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije 5,0 % hmot. levoglukozán a ako zdroj vitamínov 1,0 % hmot. kukuričný výluh a takéto kultivačné médium sa zaočkuje 50 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 76-1-1 uloženého v tej istej zbierke ako kmeň CCY 27-1-14. Výťažok kvasničnej biomasy predstavuje 3,0 % hmot. sušiny.

Príklad 5

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije 6,0 % hmot. kryštalický levoglukozán a ako zdroj vitamínov 0,3 percenta hmot. kvasničný extrakt a takéto kultivačné médium sa zaočkuje 50 h kultúrou kmeňa *Aureobasidium pullulans* CCY 103 uloženého v tej istej zbierke ako kmeň CCY 27-1-14. Výťažok kvasničnej biomasy dosahuje 2,9 % hmot. sušiny.

Príklad 5

Vynález môže nájsť uplatnenie pre krmošinárske účely ako zdroj surového proteínu pre výživu zvierat alebo pri získavaní rôznych biofaktorov z kvasničnej biomasy, ako sú napr. enzýmy a polysacharidy využiteľné v potravinárskom, chemickom a farmaceutickom priemysle.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy kvasničnej biomasy z 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy v sterilnom tekutom kultivačnom médiu vyznačujúci sa tým, že sterilné tekuté kultivačné médium obsahujúce 2,0 až 6,0 % hmot. 1,6-anhydro- β -D-glukopyranózy sa zaočkuje 46 až 50 h

kultúrou kmeňov *Aureobasidium pullulans* CCY 27-1-14 alebo CCY 27-1-22 alebo CCY 27-1-32 alebo CCY 76-1-1 alebo CCY 103 a kultivácia sa robí pri teplote 25 až 28 °C za premiešavania po dobu 2 až 7 dní.