ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU

40

Přihlášeno 29 01 81 (PO 19-81)
Právo přednosti od 29 01 81
Zveřejněno: Kvasný průmysl 29, 4, 93 (1983)

Uděleno: 19 03 87
Vydáno: 14 08 87

MDT
663.11

Autoři objevu: RYBÁŘOVÁ JOHANNA ing. CSc., PRAHA,
ŠTROS FRANTIŠEK ing. CSc., PRAHA,
KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA RNDr. DrSc., BRATISLAVA

Název objevu: **Vlastnost nového druhu mikroorganismu nazvaného Torulopsis ethanolitolerans**

Předmět objevu:

Vlastnost nového druhu mikroorganismu nazvaného autory Torulopsis ethanolitolerans, spočívající v tom, že netvoří spóry, nevytváří pseudomycelium, nezkvašuje žádné cukry, neprodukuje ureázu, neasimiluje dusičnan draselný, ze sacharidů asimiluje jen glukózu a maltózu, roste v médiu obsahujícím až 8 % etanolu při teplotě až 42 °C a při aerobní kultivaci na etanolu neprodukuje nežádoucí metabolity např. kyselinu octovou a dává vysokou výtěžnost biomasy s výhodným složením bílkovin.

Pro popis a identifikaci kvasinek se obecně uznává metodika shrnutá v monografiích J. Lodderové a spol. (Yeasts a taxonomic study, North Holland Publ. Comp., Amsterdam 1970), J.A. Barnetta a R.J. Pankhursta (A new key to the yeasts, North Holland Publ. Comp., Amsterdam 1974) a u nás v knize A. Kockové-Kratochvílové (Katalóg kultúr kvasiniek, Veda, Bratislava 1977).

Základním a společným znakem rodů Candida Berkhout a Torulopsis Berlese je neschopnost vytvářet endospóry ani jiné prvky sexuálního rozmnožování. Vzájemně se oba rody liší tvorbou pseudomycelia až pravého mycelia, která je charakteristickým znakem rodu Candida, ale u rodu Torulopsis chybí. Někteří autoři (Yarrow D., Meyer S.A.: Proposal for amendment of the diagnosis of the genus Candida Berkhout nom. const. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 611-615, 1978) považují nevytváření pseudomycelia za vlastnost nestabilní a navrhují proto zahrnout rod Torulopsis do rodu Candida.

Z kvasinek patřících k rodům Candida a Torulopsis je dosud známo 29 druhů, které nezkvašují žádné cukry a neasimilují dusičnan draselný. Kvasinkové druhy této klasifikační skupiny

lze podle asimilace sacharózy, maltózy a laktózy rozdělit do těchto osmi podskupin:

1. Mal+Sac+Lac+ : C. aaseri, C. blankii, C. glaebosa, T. pilati, C. mucilaginosa
2. Mal-Sac+Lac+ : C. acutus
3. Mal-Sac-Lac+ : prázdná podskupina
4. Mal-Sac-Lac- : C. lipolytica, C. rugosa, C. silvae, C. vini, C. hylophila, C. fermenticarens, C. pararugosa, T. inconspicus, T. philyla, T. silvatica, T. insectalens, T. nemodendra, T. sustromarina, T. sorbophila, T. maris, T. pinus
5. Mal+Sac+Lac- : C. mesenterica, C. ethanolica, C. azyma, C. amylolenta, C. tepae
6. Mal+Sac-Lac- : C. brumptii
7. Mal+Sac-Lac+ : prázdná podskupina
8. Mal-Sac+Lac- : T. apis

Podstatou objevu je vlastnost nového druhu mikroorganismu rodu Torulopsis, nazvaného Torulopsis ethanolitolerans, který netvoří spóry, nevytváří pseudomycelium, nezkvašuje žádné cukry, neprodukuje ureázu, neasimiluje dusičnan draselný, ze sacharidů asimiluje jen glukózu a maltózu, a roste v médiu obsahujícím až 8 % etanolu.

Nová kvasinka byla izolována Kochovou zřeďovací metodou (Kocková-Kratochvílová A.: Praktikum technické mikrobiologie, str. 145, SNTL Praha, 1954) ze směsné provozní kultury používané při výrobě krmných kvasnic ze sulfitových výluhů, pasážované několik měsíců nesterilními aerobními fed-batch kultivacemi v médiu s etanolem jako jediným zdrojem uhlíku. Při kultivacích byla aktuální koncentrace etanolu v médiu udržována v rozmezí 1-2 $g.l^{-1}$. Základem původní směsné kultury byly kvasinky Candida (syn. Torulopsis) utilis (80-90 %) a Candida tropicalis (10-20 %), od kterých se nová vyizolovaná kvasinka liší v základních taxonomických znacích jako je např. zkvašování nebo asimilace cukrů, případně utilizace dusičnanu. Nová kvasinka mohla být přítomna již v původní směsné kultuře, odebrané z provozu výrobny krmných kvasnic, ale mohla se také dostat do média jako kontaminace při dlouhodobém pasážování nesterilními kultivacemi v laboratoři.

Při identifikačních testech byly získány tyto výsledky:

a) Indukce sporulace na acetátovém agaru byla negativní.
b) Tvorba pseudomycelia na cibulovém agaru nebyla prokázána. Na okrajích kolonií byly viditelné jen pravidelné řetězce válcovitých buněk téměř stejně velkých.
c) Test na ureázu byl negativní.

d) Zkvašování cukrů:

glukóza	-	sacharóza	-
manóza	-	laktóza	-
fruktóza	-	rafinóza	-
maltóza	-		

e) Morfologické vlastnosti buněk při růstu v pivovarské sladině po dobu 3 dnů při teplotě 28 °C: buňky vejčité, protáhlé, o rozměrech (4-5) x (8-9) µm, jednotlivé nebo ve dvojicích.

Střední rozměry buněk:

délka v µm	8,36
střední chyba průměru	0,341
šířka v µm	4,46
střední chyba průměru	0,178
korelační koeficient délky a šířky	0,652
poměr délka : šířka	1,87
kvocient povrch/objem buněk	1,17

f) Kolonie a nátěry na sladinovém agaru jsou hladké, rychlost růstu kolonií je 3,94 mm za 100 h.
g) Při růstu v tekutém prostředí se tvoří zákal, sediment a prstenec při povrchu.
h) Asimilace sacharidů: glukóza + melibióza -

galaktóza	-	sorbóza	-
maltóza	+	D-xylóza	-
laktóza	-	L-arabinóza	-
melezitóza	-	trehalóza	-
celobióza	-	sacharóza	-
fukóza	-	L-ramnóza	-
D-ribóza	-		

i) Asimilace dusíkatých látek: KNO_3 -
lysin +
tryptofan -

j) Asimilace polyolů: ribitol - galaktitol -
erytritol - inozitol -
glucitol - manitol -

k) Asimilace alkoholů: etanol +
glycerol -
etandiol -

l) Asimilace škrobu a inulinu: rozpustný škrob +
inulin -

m) Tolerance k etanolu: Při růstovém testu ve sladině s odstupňovaným obsahem etanolu roste kvasinka předem neadaptovaná na vysoké koncentrace alkoholu ještě v prostředí s 8 % etanolu. Sledování morfologické stability kvasinky při pasážování v 5% kvasničné vodě s odstupňovaným obsahem etanolu a následující rekultivaci v 7% sladině prokázalo, že i za těchto podmínek jsou rozměry buněk relativně stálé.

n) Ztekucování želatiny nebylo prokázáno.

o) Štěpí eskulin.

p) Neštěpí tuk.

r) Rezistence k aktidionu:

mm jasné zóny okolo disku při dávkách aktidionu			
50 µm	10 µg	1 µg	0,1 µg
35	27	19	0

s) Růst v prostředí s kyselinou mléčnou resp. vinnou (2 % hm) v porovnání s kontrolou na glukóze vyjádřený v % intenzity zákalu:

Kontrola	Kyselina mléčná	Kyselina vinná
100	64,19	123,46

t) Osmofilnost vyjádřená v % intenzity zákalu kontroly na glukóze (2 % hm.)

Kontrola - 2 % hm. glukózy	10 % hm. glukózy + 5 % hm. NaCl	60 % hm. sacharózy
100	27,8	11,2

u) Maximální teplota růstu je 37-42 °C.

v) K růstu potřebuje kvasinka biotin, pyridoxin a niacin, stimuluje thiamin.

U izolátu nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování a patří tedy mezi imperfektní kvasinky. Množí se pučením, netvoří pseudomycel ani pravé mycelium a může být proto zařazen do řodu Torulopsis Berlese. V případě, že v budoucnosti bude přijat návrh Yarrowa a Mayera na včlenění rodu Torulopsis do rodu Candida, může být izolát označován jako Candida. Protože nezkvašuje žádné cukry a neasimiluje dusičnan draselný, může být izolát připojen ke klasifi-

kační skupině známých 29 druhů kvasinek rodů Torulopsis a Candida s těmito vlastnostmi. Podle asimilace maltózy, sacharózy a laktózy patří do šesté podskupiny spolu s Candidou brumptií, od níž se liší mimo jiné maximální teplotou růstu, tím, že neasimiluje D-xylózu a tím, že snáší vysoké koncentrace etanolu.

Pro vysokou toleranci ke koncentraci etanolu v médiu byl nový druh kvasinek pojmenován Torulopsis ethanolitolerans.

Typová kultura je uložena v Československé sbírce kvasinek při Chemickém ústavu SAV Czechoslovak Collection of Yeasts, Institut of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, 809 33 Bratislava, Dúbravská cesta) pod číslem CCY 26-58-1 a ve sbírce kvasinek Komplexního výzkumného ústavu vinohradnického a vinařského (Research Institute for Viniculture and Enology, 886 15 Bratislava, Matúškova 25) pod číslem RIVE 20-18-1. Uchovává se na sladinovém agaru pod parafinovým olejem.

Nová kvasinka Torulopsis ethanolitolerans velmi dobře roste v médiu s etanolem jako jediným zdrojem uhlíku. Pro svou morfologickou stabilitu, vysokou měrnou růstovou rychlost, termotoleranci a příznivé složení biomasy byla navržena a již se používá jako produkční kultura při průmyslové výrobě krmných kvasnic ze syntetického etanolu. Při kontinuálních kultivacích na principu nutristatu v limitu kyslíku dává za přídavku biostimulátorů a mikrobiogenních prvků výtěžnost až 0,8 kg sušiny biomasy z 1 kg etanolu.

Sušené kvasnice připravené kontinuální kultivací T. ethanolitolerans na etanolu při zřeďovací rychlosti 0,31 h^{-1} měly při vyjádření v % na sušinu toto složení:

popel	7,4	z toho lysin	4,05
tuk	7,4	histidin	1,05
celkový dusík	9,33	arginin	2,97
celkové dusíkaté látky	58,3	kyselina asparágová	5,33
nukleové kyseliny	9,8	threonin	2,52
bílkoviny podle Barnsteina	48,8	serin	2,55
stravitelné dusíkaté látky	54,4	kyselina glutamová	6,87
aminokyseliny celkem	45,51	prolin	1,89
		glycin	2,10
		alanin	2,82
		valin	2,34
		methionin	0,73
		iso-leucin	2,53
		leucin	3,63
		tyrosin	1,90
		fenylalanin	2,24

Index nezastupitelných aminokyselin EAAI byl 70 a z něho vypočtená biologická hodnota BV 65 (Oser B.L. in Albanese A.A.: Protein and Aminoacid Nutrition, New York, Acad. Press. 1959). Bílkovinný produkční index PER stanovený biologickými testy na krysách byl 1,90, což odpovídalo 75,1 % hodnoty PER kaseinu.

Z hlediska investičních a provozních nákladů výroben krmných kvasnic je významná termotolerance kvasinky Torulopsis ethanolitolerans. V tabulce 1 jsou shrnuty výsledky série vsádkových přiživovaných kultivací na etanolu při pH 4 a teplotách 33-39 °C. Při těchto kultivacích v laboratorním míchaném fermentoru s přenosem kyslíku 180 mmol $O_2 . l^{-1} . h^{-1}$ se voda a živiny přidávaly na počátku najednou, etanol se dávkoval průběžně pro udržení jeho koncentrace v médiu v rozmezí 1-1,5 g . l^{-1} a čpavková voda rovněž průběžně k upravování pH na hodnotu 4.

Z hlediska výtěžnosti kvasničné sušiny ($Y_{x/S}$) i dusíkatých látek ($Y_{NL/S}$) z etanolu byla optimální kultivační teplota 36 °C, při které se také ještě zřetelně nesnížila ani měrná

růstová rychlost (μ). Významné je, že ani při vyšších teplotách (37 a 38 °C) není pokles kultivačních parametrů tak prudký jako u jiných druhů kvasinek.

Tabulka 1

Kultivační parametry	Kultivační teplota °C					
	33	35	36	37	38	39
$Y_{x/S}$	0,73	0,77	0,80	0,72	0,71	0,67
$Y_{NL/S}$	0,43	0,46	0,49	0,42	0,41	0,35
$\mu\ h^{-1}$	0,51	0,50	0,49	0,49	0,48	0,45

Poznatky objevu zakládají podstatu přihlášek vynálezů, na něž byla udělena čs. autorská osvědčení AO č. 224 356, AO č. 235 427 a AO č. 235 614.