

Využití methanolu v biotechnologii

RNDr. OLGA VOLFOVÁ, Ing. MIROSLAVA HAVRÍKOVÁ, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: methanol, cena, fermentační průmysl, bakterie, kvasinky, mikrobiální bílkoviny, ostatní produkty, výzkum v ČSSR, Candida boidinii.

Od poloviny 60. let vzrůstá zájem o methanol jako o surovinu pro fermentační přípravu řady mikrobiálních produktů, především pro průmyslovou výrobu mikrobiálních bílkovin. Největší rozvoj v oblasti biotechnologie methanolu nastává v 70. letech na podkladě zjištění, že methanol dovedou využít jako zdroj uhlíku a energie kromě bakterií i kvasinky [1].

Zájem o methanol vyplývá v první řadě z jeho ceny. Plyn, se pohybuje v současné době mezi 100—250 \$/t podle toho, zda země methanol vyrábí či jej dováží. V ČSSR cena methanolu, který se převážně vyrábí ze zemního plynu, je odvozena od nízkých cen sovětského zemního plynu. Výroba methanolu se v řadě států postupně rozšiřuje, především v těch, které těží dostatek zemního plynu. Mezi tyto země patří i SSSR, který v současné době realizuje výrobu methanolu ve dvou nových závodech, v každém o kapacitě 825 000 t/r. Na základě této realizace a připravované dohody pravděpodobně bude

SSSR do ČSSR importovat v nejbližších letech methanol v množství dostatečném i pro fermentační průmysl. Tím se methanol stává zajímavou surovinou pro biotechnologii i v ČSSR.

Další výhodou methanolu jako suroviny pro fermentační průmysl je, kromě snadného transportu a skladovatelnosti, jeho čistota. Ta je 99,8 %. Pro fermentace se nemusí methanol rafinovat, a proto je z tohoto hlediska methanol výhodnější než jiné petrochemické suroviny (n-alkany, syntetický ethanol).

Methanol využívají jak bakterie tak i kvasinky. Pro oba typy mikroorganismů byly vypracovány a ověřeny v poloprovozu technologické postupy výroby mikrobiálních bílkovin, které jsou založeny na kontinuálním způsobu kultivace buněk.

Jediný postup uplatňovaný zatím v průmyslovém měřítku je postup firmy Imperial Chemical Industries, který je založen na růstu bakterie *Methylophilus methylophilus* na minerálním médiu s methanolem [2]. Roční produkce závodu je 60 000 t biomasy. Zvláštností postupu

je kultivace bakterií za přísně sterilních podmínek při pH 6,8 v unikátním věžovém fermentoru o objemu 1 300 m³. Z tohoto hlediska je proces energeticky náročný a riskantní právě tak jako izolace buněk, která je prováděna flokulací a separací. Produkt Proteen obsahuje 78 % N látek (57,6 % bílkovin) a byl povolen v některých zemích EHS ke zkrmování v živočišné výrobě [3].

Technologický postup firmy Hoechst-Uhde používá bakterie *Methylomonas clara* a byl odzkoušen v poloprovoze s kapacitou 1 000 t/r [4]. Izolace biomasy spočívá v kombinaci mechanické separace a elektrochemické flokulace. Pro zlepšení ekonomie procesu byla odzkoušena izolace bílkoviny pro potravinářské účely, která je spojena s extrakcí lipidů a nukleových kyselin.

Třetí postup používající bakterii *Methylomonas methanolica* je postup Norprotein norské skupiny Norsk Hydro a švédské potravinářské firmy AM Marabou. Postup byl odzkoušen na fermentoru o objemu 4,5 m³ [5].

Postupy používající kvasinek jsou: japonský postup firmy Mitsubishi Gas Chemical Co., používající kvasinek *Hansenula polymorpha* nebo *Pichia aganobii*, francouzský postup l'Institut Français du Pétrole používající *Torulopsis candida* a americký postup společnosti Philips Petroleum Co., resp. firmy Provesta používající několik kvasničných druhů.

Výhodou francouzského postupu je skutečnost, že proces je veden nesterilně, neboť kultivace se provádějí za nízkého pH 3,0—3,5 [6]. Postupy japonský a americký použitím vzduchu obohačeného kyslíkem dosahují vysokých produktivit systému 10—15 g · h⁻¹ · l⁻¹ [7, 8]. Tyto produktivity ve srovnání s bakteriálními postupy včetně procesu I. C. I. jsou více než dvojnásobné. Navíc americký způsob dosahuje v míchaném fermentoru koncentrací biomasy 150 g · l⁻¹, což umožňuje biomasu získávat přímo sušením zfermentovaného média bez separace [8]. Ze zveřejněných ukazatelů zatím vyplývá, že postup firmy Provesta (Philips Petroleum) je nejlepší. Produkt Provesteen obsahuje 62 % N látek (57 % bílkovin). Podle posledních zpráv se podařilo pracovníkům firmy genetickým šlechtěním podstatně zvýšit obsah methioninu v bílkovinách kvasinek.

Jak vyplývá ze zveřejněných výsledků, jsou postupy používající kvasinky pro přípravu mikrobiálních bílkovin ve srovnání s bakteriálními postupy z řady hledisek výhodnější. Jelikož ČSSR má navíc dlouhodobé zkušenosti s vedením velkokapacitních kvasničných výrobních procesů pro přípravu mikrobiálních bílkovin (na syntetickém ethanolu a sulfidových výluzích), tak i s výrobou odpovídajících fermentačních zařízení, je výzkum v oblasti fermentačního využití methanolu v ČSSR orientován na přípravu kvasničných bílkovin.

Na počátku 70. let byl v Mikrobiologickém ústavu ČSAV v Praze vyzolován z přírody kmen *Candida boidinii*, který vykazuje růstové parametry srovnatelné s parametry kvasinek používaných v zahraničních technologiích [9]. Kvasinka roste v kontinuálním systému s maximální výtěžností 40 %. Buňky adaptovaného kmene obsahují 62 % N látek. Bílkoviny jsou bohaté na esenciální aminokyseliny lysin, leucin, threonin a valin. Výhodou je, že kmen roste s maximální výtěžností a s obsahem bílkovin v širokém rozmezí pH 2,8—4,2, což umožňuje vést proces při pH 3,0 za nesterilních podmínek. V současné době je výzkum zaměřen na šlechtění kmene a optimalizaci růstových podmínek s cílem vypracovat technologický postup přípravy kvasničné biomasy na methanolu.

Kromě mikrobiální biomasy bohaté na bílkoviny jsou schopny některé methylotrofní kmeny produkovat řadu metabolitů významných pro fermentační průmysl. O tvorbě těchto produktů, ve srovnání s tvorbou biomasy jsou však literární údaje velmi omezené a jen malé procento výzkumných pracovišť se soustředilo na jejich výzkum. Pouze Japonsko provádělo v 70. letech rozsáhlý screening program s následným genetickým šlechtěním methylotrofních kmenů s cílem využít methanol jako surovinu pro fermentační výrobu některých aminokyselin, vitamínů a polysacharidů.

Z hlediska producentů zjišťujeme, že pro tvorbu produktů jiných, než jsou mikrobiální bílkoviny, jsou významnější bakterie než kvasinky. Z hlediska dosahovaných

kvantit pak významné jsou ty, které vznikají buď jako meziprodukt metabolismu methanolu nebo ty, které lze získat jako vedlejší produkty při výrobě mikrobiálních bílkovin.

V oblasti produkce extracelulárních aminokyselin je nejvýznamnější produkce L-serinu, který vzniká transformací glycinu v tzv. serinové metabolické dráze methanolu charakteristické pro některé bakteriální methylotrofy. S výhodou se používá dvoufázová fed-batch technologie, která sestává z fáze aktivního růstu mutantních kmenů *Pseudomonas* nebo *Arthrobacter*, rezistentních na serin, a z fáze konverze glycinu na serin za současného a postupného dávkování glycinu a methanolu do reaktoru při alkalickém pH. Při aplikaci „resting cell“ technicky se podařilo japonským pracovníkům zvýšit produkci L-serinu až na 24 g · l⁻¹, což je nejvyšší produkce aminokyselin zveřejněná u methylotrofů a tato technologie může sloužit za podklad technologie průmyslové výroby [10]. Jiným perspektivním přístupem japonských pracovníků k této problematice je využití teplotně senzitivních mutant [11]. Získaný serin lze dále konvertovat pomocí *Escherichia coli* na L-tryptofan až s 90% výtěžkem za postupného dávkování indolu do reaktoru [12].

Z ostatních aminokyselin produkovaných mutantními kmeny methylotrofních bakterií je ještě významná produkce extracelulární kyseliny L-glutamové a L-fenylalaninu. Ostatní aminokyseliny včetně L-methioninu jsou zatím produkovány v množstvích maximálně do 1 g · l⁻¹.

Z vitamínů je významná produkce B₁₂ a B₂. Vitamín B₁₂ hraje důležitou roli při transmethylačních reakcích, proto všechny methylotrofové jsou potenciálními produkty tohoto vitamínu. Nejvyšší produkce bylo dosaženo u *Pseudomonas AM-1*, tj. až 89,6 μg · g⁻¹ biomasy [13]. Tvorba B₂ je na rozdíl od předchozího vitamínu významnější u kvasinek. Po přidání prekurzoru FMN spolu s AMP je možné dosáhnout u kvasničného kmene 13 na methanolu až 45,4 μg B₂ v 1 l [14].

Příprava energeticky bohatých sloučenin jako jsou NADH, NADPH a ATP spočívá v transformaci nízkoenetických prekurzorů pomocí buněk nebo protoplastů methylotrofů. Technologie přípravy byla v posledních letech rozpracována japonskými pracovníky na vysokou úroveň [15].

Produkce biopolymerů polybetahydroxymáslé kyseliny a polysacharidů je pomocí methylotrofů možná a z hlediska kvality polysacharidů zajímavá; ovšem z hlediska kvantity dosud zanedbatelná. Jediné nukleové kyseliny získávané jako vedlejší produkt při výrobě mikrobiálních bílkovin jsou významné, neboť mohou zlepšit ekonomiku výrobního procesu mikrobiálních bílkovin.

Z ostatních produktů, jejichž příprava na methanolu byla popsána a je kryta především japonskými patenty, jsou: glutathion, koenzymy Q₇, Q₈ a Q₁₀, dále O-methyl-L-homoserin, kyselina citronová a antibiotikum cryomycin.

Literatura

- [1] OGATA, K., NISHIKAWA, H., OHSUGI, M.: Agric. Biol. Chem. 1969, **33**, 1519.
- [2] ANON.: Process Biochem. 1977, **12**, 30.
- [3] LITCHFIELD, J. H.: Science 1983, **219**, 740.
- [4] FAUST, V., PŘÁVE, P., SUKATSCH, D. A.: J. Ferment. Technol. 1977, **55**, 609.
- [5] MOGREN, H.: Process Biochem. 1979, **14**, 2.
- [6] BALLERINI, D.: Rev. Inst. Franc. Pétrole, 1978, **33**, 111.
- [7] KURASHI, M., TERAO, I., OHKOUCHI, H., MATSUDA, N., NAGAI, I.: In: Microbiol. Appl. Biotechnol., Dechema Monographs 83, Weinheim, New York, p. 111, 1979.
- [8] WEGNER, G. H.: Chem. Engineer, 1983, Sept., 56.
- [9] VOLFOVÁ O., PILÁT, P.: Folia Microbiol. 1974, **19**, 249.
- [10] IZUMI, Y., TAKIZAWA, M., TANI, Y., YAMADA, H.: J. Ferment. Technol. 1982, **60**, 269.
- [11] MORINAGA, Y., YAMANAKA, S., TAKINAMI, K.: Agric. Biol. Chem. 1983, **47**, 2113.
- [12] BEHRENT, U., BANG, W. G., WAGNER, F.: Biotechnol. Bioeng. 1984, **26**, 308.
- [13] NISHIO, N., TSUCHIYA, Y., HAYASHI, M., NAGAI, S.: J. Ferment. Technol. 1977, **55**, 151.
- [14] SHIMIZU, S., ISHIDA, M., TANI, Y., OGATA, K.: J. Ferment. Technol. 1977, **55**, 630.

[15] YAMADA, H.: In: Research on Energy from Biomass, YAMAMOTO, T., 1984, Spey 7, 201.

Volfová, O. - Havrlíková, M.: Využití methanolu v biotechnologii. Kvas. prům. 31, 1985, č. 7—8, s. 172—174.

V poslední době se stal methanol zajímavou surovinou pro biotechnologii v ČSSR. Srovnání technologických procesů výroby SCP ukázalo, že kvasničné procesy jsou výhodnější než bakteriální. Protože ČSSR má zkušenosti s vedením kvasničných procesů i s výrobou odpovídajícího zařízení, orientuje se výzkum v ČSSR v oblasti biotechnologie methanolu na výrobu kvasničných bílkovin. Článek zahrnuje přehled o přípravě mikrobiálních produktů z methanolu.

Волфова, О., Гаврликова, М.: Использование метанола в биотехнологии. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 172—174.

За последнее время метанол стал интересным сырьем для биотехнологии в ЧССР. Сравнение технологических процессов производства SCP открыло, что дрожжевые процессы имеют целый ряд преимуществ чем бактериальные. В виду того, что у работников в ЧССР опыт в деле технологии дрожжевых процессов и производства соответствующего оборудования, исследование в ЧССР в области биотехнологии метанола ориенти-

руется на производство дрожжевых белков. Статья включает обзор микробных продуктов из метанола.

Volfová, O. - Havrlíková, M.: Utilization of methanol in bioechnology. Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 172—174.

Methanol has recently become an interesting raw material for biotechnology in Czechoslovakia. The comparison of the technological processes of the SCP production indicated that the yeast processes are more advantageous than bacterial ones. As in Czechoslovakia there is a long time experience in technology of yeast processes and in the production of the corresponding industrial equipment the research in the area of methanol biotechnology has been oriented to the production of yeast proteins. The article is concluded by a review concerned with other microbial products from methanol.

Volfová, O. - Havrlíková, M.: Ausnützung von Methanol in der Biotechnologie. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 7—8, S. 172—174.

In der letzten Zeit ist Methanol zu einem interessanten Rohstoff für Biotechnologien in der Tschechoslowakei geworden. Der Vergleich technologischer Prozesse der SCP-Produktion hat ergeben, daß die Hefeprozesse vorteilhafter als die bakteriellen sind. Da die Tschechoslowakei über Erfahrungen mit der Führung von Hefeprozessen sowie mit der Produktion der dazu gehörigen Einrichtungen verfügt, wird die Forschung in der Tschechoslowakei auf dem Gebiete der Methanol-Biotechnologie auf die Produktion von Hefeweiß ausgerichtet. Der Artikel enthält auch eine Übersicht der Herstellung mikrobieller Produkte aus dem Methanol.