



(11) FREMLÆGGELSESSKRIFT 141760

DANMARK

(51) Int. Cl.³ C 12 H 1/32



(21) Ansøgning nr. 3116/76 (22) Indleveret den 9. jul. 1976

(23) Løbedag 9. jul. 1976

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggeskriftet offentliggjort den 9. jun. 1980

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(30) Prioritet begæret fra den
10. jul. 1975, 25253/75, IT

(71) SNAMPROGETTI S.P.A., Corso Venezia 16, Milano, IT.

(72) Opfinder: Ludwig Degen, Via U. Peruzzi 62, Rom, IT: Pasquale Zaffaroni,
Via Reatina 113, Mentana (Rom), IT: Lamberto Formiconi, Via Ciceronaccio,
7, Monterotondo (Rom), IT: Antonio Senni, Via Veio 80, Rom, IT.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Internationalt Patent-Bureau.

(54) Fremgangsmåde til dyrkning af monocellulære mikroorganismer af slæg-
ten Prototheca.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til dyrkning af monocellulære mikroorganismer af slægten Prototheca i et dyrkningsmedium, der indeholder ethanol som carbonkilde, hvilken fremgangsmåde er velegnet til fremstilling af bioproteiner, der kan anvendes som additiver til animalsk konsumtion.

Den tekniske litteratur, inklusive patentlitteraturen omtaler et antal fermenteringsmetoder til produktionen af mikroorganismer, der er i stand til at frembringe proteinholdige forbindelser. Fremgangsmåder er f.eks. omtalt til dyrkningen af gær på kulhydrater, således som de findes i melasse, sulfitvæsker fra papirmøller og på n-alkanfraktioner af gasolie. Lignende fremgangsmåder er omtalt til fremstillingen af biomasser med bakterier.

Under fermenteringens fremskriden, der skal lede til produktionen af gær eller bakterier, finder man en betydelig varmeophobning på grund af oxideringen af substratet, der er desto kraftigere jo lavere selve substratets oxidationsgrad er.

Anvendelsen af delvis oxiderede substrater begrænser iltoptagelsen og varmfrembringelsen.

Yderligere begrænser anvendelsen af mikroorganismer, der vokser ved høje temperaturer, afkølingsomkostningerne betydeligt.

Ved mange fremstillingsmetoder til fremstilling af biomasser, er en ekstraktion med organiske opløsningsmidler blevet nødvendig for at fjerne uønskede substratrester eller uønskede forbindelser som f.eks. kulhydrater med høj molekylvægt eller polycycliske carbonhydrider og lignende.

Alkoholer er substrater, der er særdeles velegnede til fremstillingen af bioproteiner. De er vandopløselige, er allerede delvis oxiderede og fremstilles i kommerciel målestok med høj renhedsgrad. Blandt de alifatiske alkoholer anvendes først og fremmest methanol og ethanol som substrater.

Af økonomiske grunde er det imidlertid nødvendigt, at substraterne til fremstilling af bioproteiner er billige, og sammenlignet med affaldsprodukter er udgifterne ved anvendelse af ethanol forholdsvis stor. Det er således nødvendigt at substratet forbruges fuldstændigt.

Det er tidligere foreslået, i beskrivelsen til tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.415.461, at fremstille bioproteiner ved dyrkning af stammer af slægten Prototheca, og man har også herved i et tilfælde benyttet et dyrkningsmedium med ethanol som carbonkilde. Udbyttet af opnået celleprodukt herved kan dog ikke anses som tilfredsstillende.

Anvendelsen af ethanol som carbonkilde frembyder imidlertid som allerede antydte forskellige fordele fremfor andre substrater. Først og fremmest kan man let skaffe sig ethanol, og det anvendes til konsumtion. Der er ingen toxicitetsproblemer, da det fremstilles med en høj renhedsgrad. Yderligere er ethanol flygtigt, og mulige rester kan let fjernes under tørring af cellerne. Endelig er der ikke nogen problemer med fordelingen af substratet i næringsmediet, sådan som det er tilfældet med polysaccharider og carbonhydrider.

Det er derfor ønskeligt at have en fremgangsmåde til rådighed, ved hvilken bioprotein-leverende celler kan dyrkes med ethanol som carbonkilde og samtidig under opnåelse af et stort udbytte af celler. Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved, at der som mikroorganisme anvendes Prototheca zopfii CB5 26S.75.

Mikroorganismen, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, besidder

yderligere den store fordel, at den vokser ved temperaturer indtil 40°C, fortrinsvis ved 33-37°C, og inden for et bredt pH-område (pH 1,0 til 8,0), fortrinsvis ved pH 3,0 til 5,0, en kendsgerning, der reducerer risikoen for bakteriel infektion under fermenteringen. Mange mikroorganismer vokser ikke i alkoholholdige substrater, andre vokser kun, dersom koncentrationerne er lave. Den omhandlede mikroorganisme derimod vokser også godt ved høje koncentrationer og kun koncentrationer over 4% virker hæmmende.

Ved fremgangemåden ifølge opfindelsen er det muligt at fremstille biomasser, der har et højt proteinindhold ved dyrkning af den nævnte mikroorganisme-stamme i et simpelt dyrkningsmedium, der indeholder ethanol som eneste carbonkilde.

Den omhandlede mikroorganisme-stamme er blevet isoleret og udvalgt fra jordprøver taget ved Harcourt, Nigeria, og har fået tildelt nummer 855 A. Dens dyrknings- og fysiologiske karakteristika er opsummeret i tabel 1.

Tabel 1

Dyrknings- og fysiologiske karakteristika.

A. Dyrkningskarakteristika.

fast substrat (24 timer):
(pepton-glucose)

flydende substrat (24 timer)
(pepton-glucose)

diameter af kolonierne: 2-3 mm, sprøde,
grove, uigennemsigtige uden pigmenter
bundfald, tynd film

B. Karakteristika af den vegetative cyclus.

Dannelsen af 2-8 aplanosporer (endosporer)

Efter itubrydning af modercellen, gentager aplanosporerne cyclus, og nogle få danner hypnosporer ("hvilende celle").

C. Karakteristika af vegetative celler.

Spheroide eller ellipsoide former med en størrelse på 15-25 til 20-30 mikron.
Dannelse af aggregater. Kerne- og lagringsgranuler vel synlige.

D. Sexuel karakter.

Man har ikke observeret nogen sexuel cyclus.

E. Fysiologiske karakteristika.

1. Anvendelse af forskellige carbonkilder.

a) Fermentativ anvendelse.

glucose

galactose

sucrose

maltose

lactose

raffinose

melibiose

syre, uden gas, langsom

negativ

negativ

negativ

negativ

negativ

negativ

inulin	negativ
stivelse	negativ
α -methyl-D-glucosid	negativ
b) Assimilativ anvendelse af carbonkilder.	
D-glucose	positiv
D-galactose	negativ
sucrose	negativ
fructose	positiv
maltose	negativ
lactose	negativ
raffinose	negativ
melibiose	negativ
inulin	negativ
opløselig stivelse	negativ
α -methyl-D-glucosid	negativ
L-sorbose	negativ
salicin	negativ
arbutin	negativ
cellobiose	negativ
trehalose	negativ
melizitose	negativ
D-xylose	negativ
D-arabinose	negativ
L-arabinose	negativ
D-ribose	negativ
L-rhamnose	negativ
methanol	negativ
ethanol	positiv
nor. propanol	positiv
iso-propanol	negativ
nor. butanol	positiv
tert. butanol	negativ
cyclohexanol	negativ
glycerol	positiv
erythritol	negativ
ribitol	negativ
dulcitol	negativ
D-mannitol	negativ
sorbitol	negativ

inositol	negativ
DL-mælkesyre	negativ
ravsyre	negativ
citronsyre	negativ
nor-paraffiner	positiv

2. Anvendelsen af forskellige nitrogenkilder.

ammonium, nitrat og urinstof

3. Vækstfaktorer

kræver thiamin

4. Vækst ved forskellige temperaturer.

4 °C	negativ
15-42 °C	positiv
54 °C	negativ

Arnold og Ahearn (Mycologia, 64, 265, 1972) har for nylig foreslået en nøgle til klassificering af Prototheca arter, ifølge hvilken den omhandlede stamme er medlem af arten *P. zopfii*.

Stammen med symbolet 855A kan imidlertid skelnes fra standardbeskrivelsen for *P. zopfii* og fra en samlingsstamme (opnået af professor Liferri, Pavia) (se tabel 2).

Tabel 2

	855 A	<i>P. zopfii</i>	<i>P. zopfii</i> (data fra litte- ratur)
D-galactose	negativ	positiv	positiv
iso-pentanol	negativ	negativ	positiv
vækst ved 42 °C	positiv	negativ	--

Stamme 855 A (vild type) kan således betragtes som en stabil og defineret variant af *P. Zopfii*-arten. Man foreslår navnet *Prototheca zopfii*, var. Harcourt, med standardbeskrivelse som anført i tabel 1. Stammen er blevet deponeret i Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn under deponeringsnummer CB5 26S.75.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen dyrkes *Prototheca zopfii*, var. Harcourt 855 A celler til fremstillingen af bioproteiner i kultursubstrater, der foruden ethanol som carbonkilden indeholder nitrogenkilder, mineralsalte og vækstfaktorer. Ifølge opfindelsen kan ethanol med fordel tilsættes dyrkningsmediet i en mængde på indtil 4 vægt%. Thiamin kan anvendes som sådan eller i majsstøbeveske eller melasse eller gærsekstrakt. Ethanol, der udgør carbonkilden, kan sættes til vækstmediet på et hvilket som helst tidspunkt før fermenteringen eller ved små tilsætninger under fermenteringen. Det foretrakkes imidlertid at tilsætte

ethanol kontinuert under fermenteringen, således at en fuldstændig anvendelse muliggøres.

Fermenteringen sker ved temperaturer i området fra 15°C til 40°C, fortrinsvis ved 30-38°C og inden for et pH-område fra 1-8, fortrinsvis fra 3,0-5,0.

Ved den omhandlede fremgangsmåde opnås et udbytte på 60-70% (g tør biomasse/g EtOH) med en cellekoncentration i kulturen på 20-60 g/l. På grund af af cellernes størrelse er de lette af fjerne.

Dersom man anvender batchvis fermentering, fjernes cellerne ved sedimentering eller filtrering, når fermenteringen er løbet til ende. Den samme fremgangsmåde anvendes til at fjerne biomassen under den kontinuerlige proces.

Den således udvundne biomasse, der er tørret, indeholder 50-60% råprotein ud over polysaccharider, lipider og nucleinsyrer.

Nærværende patent omfatter ikke fremgangsmådens anvendelse ved tilvirkning af næringsmidler.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen forklares nærmere i de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

Man fremstillede et dyrkningsmedium med følgende sammensætning:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 g/l
KH_2PO_4	10 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg/l
CaCl_2	2 mg/l
gærekstrakt	500 mg/l
opløsning af sporstoffer	1 ml

Sammensætningen af sporstofopløsningen var:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5 mg/l
H_3BO_3	500 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	500 mg/l
KJ	10 mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
MoO_3	10 mg/l

Efter indstilling til pH 5,0 fordeltes substratet i 100 ml portioner i 500 ml kolber og efter sterilisering (30 minutter ved 116°C) tilsatte man 1 vol.% ethanol. Herefter podedes kolberne med en 3 dage gammel kultur (30°C) af 855 A stammen (*Prototheca zopfii* CB5-26S.75) på skråagar, indeholdende det samme medium plus 2% agar-agar. Dernæst dyrkedes (orbital omrøring ved 220 omdrejninger/minut) ved 30°C. Efter 24 timers dyrkning tilsatte man yderligere 2% ethanol.

Udbyttet af tørre celler efter 33 timers dyrkning var 18,7 g/l.

Eksempel 2

Man udførte en fermentering ved 40°C under de samme betingelser som i eksempel 1.

Udbyttet af tørceller efter 48 timers dyrkning var 13,5 g/l.

Eksempel 3

Et dyrkningsmedium fremstillet som i eksempel 1, men indeholdende i stedet for gærekstrakten 1,5 g/l majsstøbevæske (C.S.L.).

Udbytte i tørvægt efter 34 timers dyrkning under de samme betingelser som i eksempel 1 ved 35°C var 17,5 g/l.

Eksempel 4

I en lille 16 liters laboratoriefementeringsbeholder, der var udstyret med en turbine og 4 antiskvulpevinger, fremstilledes 10 l af substratet fra eksempel 1, idet den eneste forskel var, at koncentrationen af phosphatsalte var 2 g/l i stedet for 10 g/l. Efter sterilisering i 30 minutter ved 116°C podedes fermenteringsbeholderen med 10% af en 21 timer gammel 35°C kultur af 855 A stammen fra en kolbe med det samme substrat som i eksempel 1. Dyrkningen udførtes ved 35°C, 1000 omdrejninger/minut og en gennemluftning af 0,5 volumen/volumen/minut. pH-værdien holdtes på 4,0 med soda under hele fermenteringsforløbet. Man tilsatte ethanol ved begyndelsen (1 volumen%/volumen) og efter 24 timers forløb af fermenteringen (2 volumen%/volumen).

Efter 43 timers fermentering fraskilles cellerne ved filtrering på papir, hvorefter man vasker med vand og tørrer cellerne ved 90°C i vakuum.

Udbyttet af tørre celler var 50,5 g/l, der indeholdt 52,56% rå proteiner (N ved 6,25) og 4,73% lipoider.

Eksempel 5

En laboratoriefementeringsbeholder, der havde et volumen på 20 liter, indeholdt 12 liter af dyrkningsmediet ifølge eksempel 4. Dette medium podedes som angivet i eksempel 4 og dyrkedes i 24 timer ved 35°C under omrøring (800 omdrejninger/minut), idet man tilførte 0,5 volumen/volumen/minut luft.

To laboratoriefementeringsbeholdere af typen beskrevet i eksempel 4 podedes hver med 1,5 liter af denne forkultur. Fermenteringsbeholderne indeholdt 10 l af det samme dyrkningsmedium med 1% ethanol. Fermenteringsbeholderne omrørtes med 1000 omdrejninger/minut med gennemluftning på 0,5 volumen/volumen/minut. Dyrkningstemperaturen af den ene fermenteringsbeholder holdtes på 30°C, mens den anden fermenteringsbeholder holdtes på 35°C. For at holde pH-værdien på den ønskede

værdi (ca. pH 4) anvendtes en blanding, der bestod af 32% vandig ammoniak og 95% ethanol i et forhold på 20:80. Ved at gøre dette holdtes ikke alene pH-værdien på optimumværdien for vækst, men carbonkilden tilførtes også automatisk. Efter 20 timers dyrkning var koncentrationen af biomasserne 20,6 g/l (30°C) og 21,3 g/l (35°C).

Herefter forøgedes omrøringshastigheden til 1500 omdrejninger/minut og gennemluftningen til 0,75 volumen/volumen/minut. Efter yderligere 25 timers dyrkning var koncentrationerne af biomasserne 53,2 g/l (30°C) og 58,1 g/l (35°C).

Man podede en tredje fermenteringsbeholder af samme type med 2 liter af kulturen fra 35°C. Denne fermenteringsbeholder indeholdt 10 liter af det samme dyrkningsmedium, som anvendtes ved 35°C, 1500 omdrejninger/minut og 0,75 volumen/volumen/minut luft. Efter 8 timers dyrkning gik koncentrationen af biomassen fra 10,3 g/l til 33,1 g/l.

Eksempel 6

I en 16 liter fermenteringsbeholder med en turbine og 4 antiskvulpevinger indeholdende 7 liter substrat fremstilledes en kultur af 855 A stammen således som beskrevet i eksempel 4.

Til den kontinuerede fermentering fremstilledes et næringsmedium (fødemedium), der havde følgende sammensætning:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0 g/l
KH_2PO_4	2,0 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 mg/l
CaCl_2	20 mg/l
opløsning af sporstoffer	2 ml/l
gærekstrakt	0,5 g/l
ethanol (S_0)	37,6 g/l

Mediet (uden ethanol) indstilledes til en pH-værdi på 4,0 og steriliseredes ved 116°C i 30 minutter.

Med en fortyndingshastighed ($D = \mu$) på $0,190 \text{ h}^{-1}$, 2000 omdrejninger/minut og en gennemluftning på 1,5 volumen/volumen/minut opnåedes følgende resultater:

S = koncentration af ethanol i kulturen	0,067 g/l
X = koncentration af biomasse i kulturen	25,12 g/l
Y = udbytte (g biomasse/g substrat)	0,66
P = produktivitet	4,8 g/l/time

Biomassen opsamledes ved centrifugering og efter vaskning med vand, tørredes den i vakuum. Sammensætningen af biomassen er angivet nedenfor i tabel 3.

Tabel 3

Analytiske data af biomassen fra *Prototheca zopfii* var. Harcourt 855 A:

Fugtighed	0,60%
Aske	7,04%
N (Kjeldahl)	8,45%
Rå proteiner (N ved 6,25)	52,62%
Protein (biuret)	45,70%
Rå lipoider	4,82%
Fede syrer	3,08%
Opløselige kulhydrater	11,96%
Rå fibre	2,50%
RNA	15,17%
DNA	0,42%

Elementær analyse:

C = 46,10%

H = 6,71%

N = 8,32%

Procentisk sammensætning af de fede syrer:

nor-C ₁₄	1,38%
nor-C ₁₆	29,12%
nor-C ₁₆ : 1	0,90%
nor-C ₁₈	4,44%
nor-C ₁₈ : 1	28,46%
nor-C ₁₈ : 2	35,70%

Procentisk sammensætning af aminosyrerne (g/100 g tør biomasse):

Lysin	1,88
Histidin	0,779
Arginin	5,11
Asparaginsyre	3,03
Threonin	1,73
Serin	1,56
Glutaminsyre	4,85
Prolin	3,13
Glycin	1,98
Alanin	2,26

Valin	2,11
Methionin	0,83
Isoleucin	1,12
Leucin	2,95
Tyrosin	1,32
Phenylalanin	1,55
Tryptophan	0,23

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til dyrkning af monocellulære mikroorganismer af slægten *Prototheca* i et dyrkningsmedium, der indeholder ethanol som carbonkilde, k e n d e t e g n e t ved, at der som mikroorganisme anvendes *Prototheca zopfii* CB5 26S.75.

2. Fremgangsmåde ifølge det foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at ethanol tilsættes dyrkningsmediet i en mængde på indtil 4 vægt%.

Fremdragne publikationer:

Tysk offentliggørelsesskrift nr. 2415461.