



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

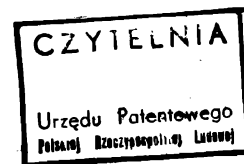
Zgłoszono: 29.07.76 (P. 191507)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.01.78

Opis patentowy opublikowano: 15.05.1979

Int. Cl.² C12D 13/06



Twórcy wynalazku: Konstancja Raczyńska-Bojanowska, Zofia
Łukaszkiewicz, Joanna Michalik, Stanisław
Łabendziński, Jerzy Beer

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Fermentacyjnego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania wysokobiałkowej masy bakteryjnej przez izolowanie i hodowanie w warunkach laboratoryjnych metylotrofów względnych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania wysoko-
białkowej masy bakteryjnej przez izolowanie i hodowanie
w warunkach laboratoryjnych metylotrofów względnych.

Badania wykazały, że masa komórkowa bakterii, ze wzglę-
du na zawartość białka i skład aminokwasów, może stano-
wić cenną paszę. Masa komórkowa bakterii zawiera do 85%
białka surowego, tj. około 30% więcej niż biomasa drożdży,
przy czym zawartość metioniny, wynosząca 1,5 do 2% su-
chej masy, odbiega w znacznie mniejszym stopniu niż
w białku drożdży od norm FAO (2,2%).

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie wykorzystani-
em do celów paszowych bakteryjnych metylotrofów,
wyizolowanych z populacji drobnoustrojów występują-
cych w błotach, wodach, glebie oraz stanowiących zanie-
czyszczenia powietrza, zdolnych do wzrostu na związkach
jednowęglowych.

Wśród bakteryjnych metylotrofów przemysłowych znaj-
dują się zarówno metylotrofy bezwzględne, zdolne do wzros-
tu wyłącznie na metanie i metanolu, oraz metylotrofy
względne np. *Protaminobacter rubrum*, znane z opisu
patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 764 476,
które wprowadzicie wykorzystują metanol jako jedyne źródło
węgla, mogą jednak rosnąć na innych związkach organicz-
nych, takich jak glukoza i kwasy organiczne.

Przemysłowe szczepy, rosnące na metanolu jako jedynym
źródle węgla i energii izolowano dotychczas z losowych
próbek gleby, wody i powietrza, stosując selekcję na podło-
żach, wzbogacanych w metanol. Przy czym selekcja ta
dotyczy zarówno szybkości wzrostu na metanolu, jak
i wykorzystania go w produkcji biomasy.

2

Zawartość białka w biomase bakteryjnej ulega wahaniom
i zmniejsza się znacznie w skutek zwiększonej zawartości
głównie węglowodanów, a także lipidów. U wielu metylo-
trofów przemysłowych, zawartość białka w masie komór-
kowej obniża śluz. W warunkach niedostatecznego dopływu
tleny i głodu azotowego ilość śluzu, otaczającego komórki,
może być tak znaczna, że zawartość białka surowego
spada do 45%.

Istnieje szereg patentów, w których przedmiotem
wynalazku było polepszenie składu biomasy przez ekstrakcję
samego białka lub usunięcie składników niebiałkowych,
a w tym kwasów nukleinowych (francuski opis patentowy
nr 2 159 722, , opis patentowy Stanów Zjednoczonych
Ameryki Nr 3702283
francuski opis patentowy nr 2 117 329). Nie zwrócono jed-
nak uwagi na fakt, że straty, związane z przekształcaniem
węgla w składniki niebiałkowe, są wynikiem zaburzeń
metabolizmu.

Celem wynalazku jest opracowanie szybkiej, rutynowej
metody izolacji metylotrofów bezwzględnych oraz dobór
warunków hodowli laboratoryjnej, zapewniający najkor-
zystniejszy skład biomasy wyizolowanego szczepu.

Istota wynalazku polega na tym, że ze ścieków dro-
żdżowni izoluje się, stosując selektywnie działające antybio-
tyki i/lub sulfonamidy, szczep ZB18 J26 bakterii, należący do
rodzaju *Pseudomonas* lub otrzymane na drodze selekcji
jego mutanty, takie jak ZB18 J26 Mut-15, po czym bakterie
te namnaża się w warunkach tlenowych na pożywcę, za-
wierającej metanol jako jedyne źródło węgla.

Metylotrofów względnych poszukiwano w oczyszczalni

biologicznej ścieków w przemyśle spożywczym. Oparto się przy tym na przypuszczeniu, że metylotrofy wchodziły w skład mikroflory, rozwijającej się w nasyconych metanem i napowietrzanych pojemnikach, do których doprowadzane są ścieki po beztlenowej fermentacji metanowej w oczyszczalni w drożdżowni.

W selekcji metylotrofów z populacji wyjściowych posługiwano się związkami przeciwwgrzybicowymi i związkami o działaniu przeciwbakteryjnym, takimi jak antybiotyki lub sulfonamidy, które eliminując grzyby i drobnoustroje Gram dodatnie i Gram ujemne, nie wykazujące cech metylotrofów, przyspieszają uzyskanie jednorodnych szczepów.

Dzięki zastosowaniu antybiotyków, takich jak penicylina, oksacylina, streptomycyna czy chloramfenikol, na które metylotrofy są stosunkowo mało wrażliwe (maksymalne stężenie hamujące M I C wynosi odpowiednio 1000 jedn./ml oraz 250, 100, 30 $\mu\text{g/ml}$), względnie dodatkowo polifunginy — antybiotyku polienowego typu nystatyny — o przeciwwgrzybicowym działaniu, uzyskuje się wielokrotne zagęszczenie metylotrofów: po 4–5 pasażach na podłożach, zawierających metanol w wysokim stężeniu, otrzymuje się morfologicznie nie różniące się kolonie, które następnie oczyszczą się przez klonowanie.

W pracach nad izolowaniem metylotrofów przemysłowych nie bez znaczenia jest również fakt znacznej odporności na karbencilinę M I C 60–100 $\mu\text{g/ml}$. Bardzo znaczną wrażliwość na ten antybiotyk wykazują bowiem patogenne gatunki rodzaju *Pseudomonas*.

W wyniku dalszych etapów selekcji na podłożach stałych i płynnych wyodrębniono szczepy o czasie generacji, skróconym z 420 minut do około 180 minut, przy jednoczesnym około 17-krotnym zwiększeniu szybkości utleniania metanolu (10 nmoli $\text{O}_2/\text{min/mg s.m.}$ do 171 nmoli $\text{O}_2/\text{min/mg s.m.}$). Szczepy te rosną na metanolu w stężeniu do 2%, a oddychają przy stężeniu do 10%.

Poniżej podano ogólną mikrobiologiczną charakterystykę szczepu ZB18 J26 Mut-15, uzyskanego drogą selekcji ze szczepów, wyizolowanych z biologicznej oczyszczalni ścieków. Szczep ten jest przechowywany w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego.

Wzrost: źródło węgla	metanol, etanol, octan, pirogrońian, bursztynian, cytrynian, alanina, arginina, bulion odżywczy
źródło azotu	sole amonowe, mocznik, aminokwasy, brak wzrostu na azotanach
witamina	brak zapotrzebowania na witaminę
Kształt komórek	pojedyncze, ruchliwe pałeczki ($0,5 \times 1,3 \mu\text{m}$) o jednej biegunowej rzęście ($3,5 \mu\text{m}$)
Spory	brak
Zabarwienie	różowe na podłożu z metanolem, białe-żółtawe
Barwienie Grama	ujemne
Kolonie	okrągłe, gładkie, o równych brzegach, płaskie, przezroczyste we wczesnym stadium, później białawe o średnicy 2–3 mm po 4–5 dniach
Temperatura wzrostu	10–42°C

Zakres pH	4,5–8,5
Upłynnianie żelatyny	upłynnienie
Reakcja katalazowa	dodatnia
Reakcja oksydazowa	dodatnia
5 (test Kovacs)	
B-hydroksymaślan	nie gromadzi się
(test spektrofotometryczny Law'a i Slepcey'ego)	
Redukcja azotanów	ujemna
10 Dwuhydrolaza argininy	ujemna
Tworzenie otoczki śluzowej	dodatnie

Dla szczepu znamienne jest również wytwarzanie witaminy B₂, przechodzącej do podłoża w ilości do 0,2 $\mu\text{g/ml}$ oraz drugiego barwnika fluoryzującego o maksimum fluorescencji przy 420 nm. Syntezę witaminy B₂ potwierdzono metodą mikrobiologiczną, stosując *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Taksonomia metylotrofów napotyka na wiele kontrowersji. W ostatnim VIII wydaniu Bergey's manual of determinative bacteriology (1974) drobnoustroje, rosnące wyłącznie na związkach jednowęglowych — metanie i metanolu — zostały wyodrębnione jako osobna rodzina Metylomonadaceae.

Natomiast taksonomia względnych metylotrofów opiera się na ogólnych morfologicznych i fizjologicznych kryteriach klasyfikacji. Na tej podstawie wyizolowany przez nas szczep względnego metylotrofa zaliczono do rodzaju *Pseudomonas*.

Pseudomonas ZB18 J26 namnaża się w temperaturze 10–42°C, najkorzystniej 30–35°C, przy pH środowiska 4,5–8,5, najkorzystniej 6,5–7,5, na pożywce mineralnej, zawierającej jony NH_4 , K, Na, Mg, mikroelementy oraz metanol. Pożywkę tą szczepi się inokulum w ilości 5–10%.

Jeden litr pożywki zawiera 0,5–2,0 g fosforu; 1,0–2,5 g sodu; 0,2–0,5 g potasu; 0,01–0,05 g magnezu; 3–20 mg żelaza; 0,1–1,0 mg wapnia; 0,04–0,08 mg cynku; 0,04–0,08 mg miedzi; 0,04–0,08 mg kobaltu; 0,1–0,3 mg manganu; 0,1–0,3 mg molibdenu. Przy czym zawartość w pożywce węgla i azotu, wyrażająca się stosunkiem C/N, wynosi 15–20. Do pożywki tej dodaje się sukcesywnie metanol, utrzymując jego stężenie w granicach 0,2–1%.

Stwierdzono, że zwiększenie ilości dodanego żelaza w stosunku do innych mikroelementów obniża ilość wytworzonego pozakomórkowego śluzu, podnosząc tym samym procentową zawartość białka. Wysokie stężenie jonów wapniowych w wodzie wodociągowej, dochodzące do 190 mg/litr, powoduje wytrącanie jonów fosforanowych, uniemożliwiając pobieranie ich przez komórki. W tym stanie okazało się niezbędne usuwanie jonów wapnia przez dejonizację lub wiązanie przez związki chelatujące.

Uzyskana biomasa zawiera 4% węglowodanów, oznaczonych metodą antronową i 80% białka surowego, o następującym składzie aminokwasowym w przeliczeniu na 16 g N.

Alanina	5,4
55 Walina	5,0
Glicyna	4,0
Izoleucyna	3,4
Leucyna	5,7
Prolina	2,7
60 Treonina	3,3
Seryna	2,3
Hydroksyprolina	0,06
Fenylalanina	2,3
Kwas asparaginowy	4,8
65 Kwas glutaminowy	6,6

Lizyna	4,6
Metionina	1,7
Tyrozyna	—
Tryptofan	—

Podane poniżej przykłady omawiają szczegółowo sposób izolacji i syntezy masy bakteryjnej w warunkach laboratoryjnych.

Przykład I. Pobrane próbki z osadów komorowych biologicznej oczyszczalni ścieków drożdżowni zawieszano w podłożu o następującym składzie w 1 l wody destylowanej: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1 g; Na_2HPO_4 — 2,1 g; NaH_2PO_4 — 0,9 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1 g; KCl — 0,04 g; CaCl_2 — 0,015 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 5 μg ; H_3BO_3 — 10 μg ; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 10 μg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 70 μg ; MoO_3 — 10 μg ; pH podłoża 7,2. Metanol wprowadzono w stężeniu końcowym 1,5%. Hodowlę prowadzono przez 5 dni, dodając metanol w ilości 0,5% po trzecim dniu hodowli. W dalszych czterech pasażach na podłożach płynnych z metanolem dodawano antybiotyki: penicylinę — 1000 jedn./ml, streptomycynę — 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i polifunginę — 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hodowlę prowadzono na wyrzäsarce obrotowej w temperaturze 30°C w 500 ml kolbach. W pasażu trzecim i czwartym zastosowano podłoże, jak w przykładzie II, utrzymując stężenie metanolu w granicach 1,0—1,5%. Czas hodowli w drugim pasażu skrócono do 3 dni, a dalsze do dwóch dni. Do inokulacji 100 ml stosowano 0,1—0,5 ml hodowli z poprzedniego pasażu. W wyniku zastosowanej procedury na płytkach agarowych otrzymywano jednorodnie wyglądające kolonie, które poddawano dalszym etapom oczyszczania i selekcji.

Przykład II. Inokulum szczepu *Pseudomonas* ZB18 J26 Mut-15 w ilości 1% obj. (około 10 mg s.m.) wprowadzano do podłoża, zawierającego w 1 l wody destylowanej: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3 g; KH_2PO_4 — 3,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1 g; oraz FeCl_3 — 20 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,6 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,16 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,18 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,3 mg; oraz fosforan sodu, który podawano w stężeniu, gwarantującym buforową pojemność 0,04 M dla utrzymania pH hodowli na poziomie nie niższym niż 6,5. Hodowlę prowadzono 48 godzin w 500 ml kolbach Ehrlenmayera w temperaturze 30°C na wyrzäsarce obrotowej o 280 obr./min. Metanol dodawano w dwóch porcjach 1% przed inokulacją i 0,5% po 36 godzinach. Otrzymano 4,5 g suchej masy bakterii o podanym składzie z 1 l podłoża przy wykorzystaniu metanolu 0,30.

1. Sposób wytwarzania wysokobiałkowej masy bakteryjnej przez izolowanie i hodowanie w warunkach laboratoryjnych metylotrofów względnych, **znamienny tym**, że ze ścieków drożdżowni izoluje się, stosując selektywnie działające antybiotyki i/lub sulfonamidy, szczep ZB18 J26 bakterii, należących do rodzaju *Pseudomonas* lub otrzymane na drodze selekcji jego mutanty, takie jak ZB18 J26 Mut-15, po czym bakterie te namnaża się w warunkach tlenowych na pożywkę, zawierającą metanol jako jedyne źródło węgla.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że próbki do izolacji metylotrofu pobiera się z osadów komorowych biologicznej oczyszczalni ścieków, po czym proces izolacji prowadzi się na pożywkach płynnych, wzbogacanych w metanol, do których dodaje się antybiotyki i/lub sulfonamidy.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do izolacji metylotrofów stosuje się takie antybiotyki, jak penicylina, oksycylina, streptomycyna, chloramfenikol, polifungina oraz karbenicilina.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że bakterie namnaża się w temperaturze 10—42°C, najkorzystniej 30—35°C, przy pH środowiska 4,5—8,5, najkorzystniej 6,5—7,5, z czasem generacji około 180 minut, na pożywkę mineralnej, zawierającej jony NH_4 , PO_4 , K, Na, Mg, mikroelementy oraz metanol.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że pożywkę szczepi się inokulum w ilości 5—10%.

6. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę, której 1 litr zawiera 0,5—2,0 g fosforu, 1,0—2,5 g sodu, 0,2—0,5 g potasu, 0,01—0,05 g magnezu.

7. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę w której w 1 litrze mikroelementy stanowią 3—20 mg żelaza, 0,1—1,0 mg wapnia, 0,04—0,08 mg cynku, 0,04—0,08 mg miedzi, 0,04—0,08 mg kobaltu, 0,1—0,3 mg manganu, 0,1—0,3 mg molibdenu.

8. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę, w której zawartość węgla i azotu, wyrażająca się stosunkiem C/N, wynosi 15—20.

9. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że metanol dodaje się do pożywki sukcesywnie, utrzymując jego stężenie w granicach 0,2—1%.