



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

203987
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/20
C 12 P 21/00 //
C 12 R 1/26

[22] Přihlášeno 26 03 76
[21] (PV 1983-76)

[40] Zveřejněno 30 06 80

[45] Vydáno 15 10 83

[72]
Autor vynálezu

WAGNER FRITZ prof. dr., STÖCKHEIM a
SAHM HERRMANN dr., WOLFENBÜTTEL (NSR)

[73]
Majitel patentu

GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE FORSCHUNG mbH,
STÖCKHEIM (NSR)

(54) Způsob získávání proteinu z jednobuněčných organismů na bázi methanolu

1

Zvyšující se potřebou proteinů pro výživu zvířat a lidí vyvstává požadavek vyvinout nové způsoby získávání vysoce hodnotných proteinů. Tak byla v posledních letech zkoumána produkce proteinu z mikroorganismů, které zužitkovávají jako zdroj uhlíku plyné uhlovodíky, jako methan, nebo kapalné uhlovodíky z ropných frakcí. Plyné uhlovodíky mají ty nevýhody, že se vykazují malou rozpustností ve vodě a že při aerobních kultivačních podmínkách tvoří výbušné plyné směsi. Kapalné uhlovodíky mají ty nevýhody, že mají rovněž minimální rozpustnost ve vodě, což podmiňuje zvýšenou spotřebu energie pro rozdělení do dvou fází. Mimo to se musí extrahovat na kapalných uhlovodících vypěstovaná buněčná hmota nejméně jedenkrát organickými rozpouštědly.

O jako zvláště výhodném zdroji uhlíku a energie se pro kultivaci mikroorganismů ve velkém měřítku již několik let hovoří o methanolu. Tento substrát má ty přednosti, že je přístupný v chemicky čisté formě levně ze syntézního plynu, který lze vyrábět z různých surovin, jako zemního plynu, frakcí ropy, černého a hnědého uhlí.

Ze západoněmecké zveřejněné patentové přihlášky DT-OS 2 040 358 je znám postup výroby proteinu z jednobuněčných organismů, při kterém se použijí alkoholy vzniklé z

2

oxidace kapalných alkanů, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty jako zdroj uhlíku.

Ze západoněmeckého vykládacího spisu DT-AS 2 152 039 je známo získávání bakteriální buněčné hmoty v methanol obsahujícím živném médiu použitím bakteriálních kmenů: Protaminobacter ruber var. machidatus ATCC 21 611, ATCC 21 612, ATCC 21 613 nebo ATCC 21 614.

Ze západoněmecké zveřejněné patentové přihlášky DT-OS 2 311 006 je znám způsob výroby proteinů, při kterém se aerobní mikroorganismus Methylomonas methanolica NRRL — B — 5458 kultivuje na methanolu jako jediném zdroji uhlíku.

Ze západoněmecké zveřejněné patentové přihlášky DT-OS 2 059 277 je znám mikrobiologický způsob výroby proteinu, který používá ve vhodném živném prostředí methanol jako jediný zdroj uhlíku za aerobních podmínek následující kmeny bakterií: Pseudomonas methanica, Pseudomonas sp. ATCC 21 438, Pseudomonas sp. ATCC 21 439, Pseudomonas sp. PRL — W 4, Corynebacterium sp. ATCC 21 232, Corynebacterium sp. ATCC 21 235 a Corynebacterium sp. ATCC 21 236.

Ze západoněmecké zveřejněné patentové přihlášky DT-OS 2 407 740 je znám postup kultivace mikroorganismů, při kterém se po-

užívá směsné kultury sestávající z fakultativně methanolu využívající bakterie a více bakterií nevyužívajících methanol. Bakterie využívající methanol je nepohyblivá a může vedle methanolu využívat také jiné uhlíkaté substráty, jako například glukosu nebo glycerin, jako zdroje uhlíku.

Ze západoněmecké zveřejněné patentové přihlášky DT-OS 2 418 385 je znám způsob výroby produktu obsahujícího protein, při kterém se použije nerůžově pigmentující kmen odvozený od *Pseudomonas extorquens* (HCIB č. 9399).

Pro kultivaci proteinu z methanolu se podle známého stavu techniky nepoužívá žádná obligatorně methanol využívající bakterie, nýbrž používají se fakultativně methylootrofní mikroorganismy.

Známý stav techniky je zdokonalován postupem podle vynálezu, který používá obligatorně methylootrofní bakterii pro získávání proteinu z jednobuněčných organismů.

Z jednoho půdního vzorku z břehu Rýna u Ludwigshafenu byla izolována methanol obligatorně využívající bakterie. 1 g půdního vzorku byl suspendován do 100 ml anorganického živného prostředí:

primární fosforečnan draselný (KH_2PO_4) 3,75 g,
sekundární fosforečnan sodný (Na_2HPO_4) 2,50 g,
síran amonný [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 4,00 g,
heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), 0,5 g,
tetrahydrát dusičnanu vápenatého [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$] 0,025 g,
heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0,005 g,
monohydrát síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,005 g v 1000 ml destilované vody,

pH 7,0 s 1 % (obj/obj) methanolu jako jediného zdroje uhlíku a energie, a při teplotě 30 °C se inkubovalo v 500 ml Erlenmayerově baňce na třepačce při 100 ot/min. Po pětidenní inkubaci byla z toho vždy 0,1 ml natřena na Petriho misky, které obsahovaly totéž prostředí se 2 % agaru jako ztužovaďa. Z těchto ploten se po dalších třech dnech inkubace při 30 °C přeočkovaly jednotlivé kolonie zředovacími nátěry na plotny s tímtož prostředím, po pěti tekutých pasážích se získala čistá kultura bakteriálního kmene. Bakteriální kmen byl označen jako *Methylomonas* sp. a obdržel č. DSM 580.

Byl nalezen způsob k získávání proteinu z jednobuněčných organismů na bázi methanolu vyznačující se tím, že se v reaktoru proháněním plynem s mechanickým nebo bez něho produkuje rostoucí submersní kultura obligatorně methanol zužitkovávajících bakterií *Methylomonas* sp. DSM 580 za aerobních podmínek, ve které jsou obsaženy methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie, anorganické živné látky a popřípadě růstové látky, že se kromě toho do této soustavy při-

vádí za reakční teploty 20–45 °C vzduch nebo vzduch obohacený kyslíkem a že se poté ze vzniklé tříhrdlé soustavy oddělí buněčná hmota a suší se, přičemž se produkuje buněčná hmota s obsahem surového proteinu nejméně 60 až 70 hmot. %, nukleových kyselin 2 až 17 hmot. %, popela 3 až 6 hmot. procent, tuku 2 až 8 hmot. % a že kapalná fáze zbavená buněčné hmoty se popřípadě částečně nebo zcela při postupu recykluje.

Růstové látky jsou přirozené nebo syntetické sloučeniny, které mikroorganismus potřebuje, ale které si nemůže sám v dostatečné míře syntetizovat, na rozdíl od těchto látek jsou živné látky chemické sloučeniny, které vedle zdroje uhlíku a energie obsahuje anionty a kationy, které jsou mikroorganismy přijímány a jsou pro jejich růst nutné.

Způsob podle vynálezu k získávání proteinu z jednobuněčných organismů produkujících obligatorně methanol využívající bakterii *Methylomonas* sp. DSM 580 s následujícími charakteristickými vlastnostmi:

1. Morfologie buněk:

tyčinky v rozměrech 0,3–0,6 × 1,0–1,8 μ, pohyblivé v polárním prostředí.

2. Morfologie kolonií:

transparentní, bílé, kulaté a hladké, asi 1 až 2 mm průměru po dvou až třech dnech.

3. Vlastnosti kmene:

gramnegativní, suchá buněčná hmota slabě růžová.

4. Fyziologie:

přísně aerobní, kataláza, pozitivní, methanoldehydrogenáza pozitivní, hexosafosfátsyntetáza pozitivní, hydroxypyrohroznová reduktáza negativní.

5. Růstové vlastnosti:

	min.	opt.	max.
teplota °C	20	33–36	45
pH	4,5	6,5–7,5	9,5
koncentrace	{Obj/		
methanolu %	/obj}	0,5–1,5	5,0

Bakterie *Methylomonas* sp. byla uložena v západoněmecké sbírce mikroorganismů v Göttingen pod č. DSM 580.

Methylomonas sp. DSM 580 může růst jenom na methanolu jako zdroji uhlíku a energie, nikoliv na methanu, methylaminu, ethanolu nebo glukose, jak je znázorněno v následující tabulce:

Růst *Methylomonas* sp. DSM 580 na různých zdrojích uhlíku ve vodném anorganic-

kém živném prostředí za aerobních podmínek

substrát	růst
methanol	—
methanol	+
methylamin	—
formaldehyd	—
mravenčan	—
ethanol	—
1-propanol	—
2-propanol	—
octan	—
mléčnan	—
pyrohroznán	—
jantaran	—
citran	—
glukosa	—
fruktosa	—
serin	—

Vysvětlivky ke značkám:

+ značí růst

— značí žádný růst

Dále bylo nalezeno, že se *Methylomonas* sp. DSM 580 získá při šaržovitém vedení postupu při počáteční koncentraci 0,5–5 % methanolu, zvláště při 2–3 % objemových %, a že se *Methylomonas* sp. DSM 580 kultivuje při řízeném udržování konstantní koncentrace methanolu od 0,01–2,0 obj.%, s celkovým obratem 25 obj. % methanolu.

Potom bylo nalezeno, že se získá *Methylomonas* sp. DSM 580 při nepřetržitém vedení postupu při průtokové dávce od 0,1 – 0,5 obj/obj/h za chemostatických nebo turbidostatických podmínek.

Mimo to bylo nalezeno, že se během růstu nastaví pH hodnota od 4,5–9,0, s výhodou 6,5–7,5 přidavkem alkálií, popřípadě kyselein.

Dále bylo nalezeno, že produkce *Methylomonas* sp. DSM 580 se provádí při teplotě mezi 20–45 °C, a výhodou 33–36 °C.

Ještě bylo nalezeno, že během kultivace se přivádí do reaktoru vzduch nebo kyslíkem obohacený vzduch ve vzduchovací dávce 0,5–1,5 obj/obj/min a přiváděná plynná směs má obsah kyslíku od 20 do 60 obj. %.

Mimoto bylo nalezeno, že během kultivace se přivádí do reaktoru vzduch nebo kyslíkem obohacený vzduch ve vzduchovací dávce 0,1–0,2 obj/obj/min a přiváděná plynná směs má obsah kyslíku od 20 do 60 obj. %.

Dále bylo nalezeno, že vodný živný roztok jako zdroj dusíku obsahuje amonné nebo/a dusičné soli, nebo/a močovinu, jakož i pro růst nutné kationty sodné, draselné, hořečnaté, vápenaté, železa, zinečnaté, manganu a anionty fosforečné, síranové, dusičnanové, chloridové a růstové látky.

Postup podle vynálezu se blíže vysvětluje následujícími příklady.

Příklad 1

80 l reaktor se naplní 50 l živného roztoku (složení:

200 g síranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
150 g primárního fosforečnanu draselného KH_2PO_4 ,
25 g heptahydrátu síranu hořečnatého $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,
1,25 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$,
0,25 g heptahydrátu síranu železnatého $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,
0,25 g monohydrátu síranu zinečnatého $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
0,25 g chloridu draselného KCl

v 50 l vody), při 212 °C se 10 minut sterilizuje, ochladí na 35 °C a přidá se asepticky 1000 mililitrů methanolu, naočkuje se 500 ml i-nokula *Methylomonas* sp. DSM 580, suspenduje se 28 hodin při 35 °C turbinovým míchadlem (300 ot/min) a při vzduchovacím dávkování 0,7 obj/obj/min se kultivuje. Během produkce se udržuje v submerzní kultuře automatickým přidáváním 6 obj. % roztokem amoniaku konstantní hodnota pH 7,0. Po 22 hodinách se reaktor ochladí na 15 °C, hodnota pH se nastaví přidavkem kyseliny sírové na pH 3 a vyloučená buněčná hmota se odfiltruje, promyje vodou a suší (324 g sušiny buněčné hmoty).

Složení buněčné hmoty je následující:

71 % surového proteinu,
9 % nukleových kyselin,
4 % popela a
7 % tuku,

vztaženo na sušinu buněčné hmoty.

Příklad 2

340l bioreaktor, opatřený „Intensorem“ (výrobce firma Giovanola Frères, S. A., Monthey, Švýcarsko), se naplní 200 litrů živného roztoku složení:

500 g síranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
500 g dusičnanu amonného NH_4NO_3 ,
600 g primárního fosforečnanu draselného KH_2PO_4 ,
500 g sekundárního fosforečnanu sodného Na_2HPO_4 ,
140 g heptahydrátu síranu hořečnatého $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,
15 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$,
6 g heptahydrátu síranu železnatého $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,
2 g chloridu draselného KCl

ve 200 l vodovodní vody, hodnota pH se nastaví na 6,8, 15 minut se sterilizuje při teplotě 121 °C, ochladí se na 33 °C, přidá se a-

septicky 2000 ml methanolu, očkuje se 4000 mililitrů 18 hod. předkulturou *Methylomonas* sp. DSM 580, při 33 °C se kultivuje při vzduchovacím dávkování 0,5 obj./obj./min a při počtu 1800 otáček za minutu. Během růstu se v submersní kultuře udržuje automaticky koncentrace methanolu na 0,5 obj. %, zatímco se stanovuje koncentrace par methanolu v odpadním plynu, odpovídající koncentraci v kapalině, nepřetržitě pomocí plamenného ionizačního detektoru a pomocí dávkovače se řídí nutné dávkování methanolu, mimo to se udržuje 12 % obj. roztoku amoniaku automaticky pH regulačním zařízením hodnota pH 6,8. Potom co právě po 25 hodinách dosáhne koncentrace buněk 14 g buněčné hmoty sušiny na 1 litr, vzduchuje se za konstantní vzduchovací dávky vzduchem obohaceným kyslíkem o 40 obj. %. Postup se po 60 hodinách zastaví ochlazením na 15 °C, v průtokové odstředivce se při 10 000 g oddělí buněčná hmota a suší se. Za těchto podmínek postupu obnáší výtěžek buněčné hmoty 0,44 g buněčné hmoty/g methanolu s obsahem 76 % surového proteinu, 6,5 % nukleových kyselin, 5 % popele a 4,5 % tuku, vztaženo na sušinu buněčné hmoty.

Příklad 3

80l bioreaktor, opatřený „Intensorem“ jako v příkladu 2, se naplní 50 l živného roztoku o složení, jaké je popsáno v příkladu 1, naočkuje se 1000 ml kultury *Methylomonas* sp. DSM 580, která byla před tím kultivována 15 hodin při teplotě 35 °C, při teplotě 35 stupňů Celsia se kultivuje při vzduchovací

dávce 0,5 obj./obj./min a při počtu otáček 1200 otáček/min a při konstantní hodnotě pH 7,0 za statických podmínek. Kontinuální kultura se po 18 hodinách spustí při průtokové dávce 0,05, po dalších 48 hodinách se zvýší průtoková dávka na 0,1 a potom během 120 hodin se stoupá stupňovitě na 0,35. Za těchto podmínek se udržuje rovnovážný stav při koeficientu výtěžnosti buněčné 0,46 (g sušiny buněčné hmoty/g methanolu) a produktivity 10,8 g/l/h. Vznikající filtrát kultury se v 50 obj. % množství vrací zpět do reaktoru za odpovídajícího snížení množství přiváděného živného roztoku.

Buněčné složení obnáší 72 % surového proteinu, 4,5 % nukleových kyselin, 3,5 % popele a 5,5 % tuku, vztaženo na sušinu buněčné hmoty.

Postup podle vynálezu má tu přednost, že se poprvé používá obligatorně methylotrófní bakterie, která má proti známým fakultativně methylotrófním mikroorganismům vyšší produktivitu. Při postupu podle vynálezu se nemohou vyvinout žádné mutanty, které by ztratily schopnost růst na methanolu. Bakterie je při postupu podle vynálezu proto velmi stabilní, její látková výměna je snížena na minimum, další genetické změny vedou k odumírání buněk. Další výhodou postupu podle vynálezu spočívá v tom, že methanol disimilační a asimilační enzymy jsou konstitutivní. Provádí-li se postup podle vynálezu kontinuálně za limitujících podmínek pro methanol, je obsah nukleových kyselin buněčné hmoty velmi nízký a zráty methanolu odpařením se prakticky rovnají nule.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob získávání proteinu z jednobuněčných organismů na bázi methanolu, vyznačující se tím, že v reaktoru proháněném plynem, opatřeném popřípadě mechanickým mícháním, se produkuje rostoucí submerzní kultura bakterií zužitkovávajících obligatorně methanol *Methylomonas* sp. DSM 580 za aerobních podmínek, ve které jsou obsaženy methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie, jakož i pro růst nezbytné kationty sodíku, draslíku, hořčíku, vápníku, železa, zinku a manganu a anionty fosforečnanové, síranové, dusičnanové a chloridové, že kromě toho se do této soustavy přivádí za reakční teploty 20 až 45 °C vzduch nebo kyslíkem obohacený vzduch, přičemž se produkuje buněčná hmota s obsahem surového proteinu alespoň 60 až 76 hmot. %, nukleových kyselin 2 až 17 hmot. %, popela 3 až 6 hmot. procent, vztaženo vždy na hmotnost buněčné sušiny, a že se poté ze vzniklé třífázové soustavy oddělí buněčná hmota a suší.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kapalná fáze, zbařená buněčná hmota, při postupu částečně nebo zcela recykluje.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se *Methylomonas* sp. DSM 580 kultivuje šaržovitým postupem při počáteční koncentraci 0,5 až 5,0, zejména 2 až 3 obj. % methanolu.

4. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se *Methylomonas* sp. DSM 580 kultivuje šaržovitým způsobem při řízeném zachovávání stálé koncentrace methanolu o 0,01 až 2,0 obj. %, až do dosažení přeměny celkem 25 obj. % methanolu na buněčnou hmotu.

5. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se *Methylomonas* sp. DSM 580 kultivuje nepřetržitým způsobem při průtokové dávce 0,1 až 0,5 obj./obj./h za chemostatických neb turbidostatických podmínek.

6. Způsob podle bodů 1 až 5, vyznačující se tím, že se udržuje během růstu přídatkem alkálií, popřípadě kyselin prakticky konstantní hodnota pH 4,5 až 9,0.

7. Způsob podle bodů 1 až 6, vyznačující se tím, že se přivádí během kultivace do reaktoru vzduch nebo kyslíkem obohacený vzduch v provzdušňovacích dávkách 0,5 až 1,5 obj./obj./min a že přiváděná plynná směs

má obsah kyslíku 20 až 60 obj. %.

8. Způsob podle bodů 1 až 7, vyznačující se tím, že se přivádí během kultivace do reaktoru vzduch nebo kyslíkem obohacený vzduch v provzdušňovacích dávkách 0,1 až 0,2 obj./obj./min a že přiváděná plynná směs má obsah kyslíku 20 až 60 obj. %.

9. Způsob podle bodů 1 až 8, vyznačující se tím, že vodný živný roztok obsahuje jako zdroj dusíku amonné soli nebo/a dusičnany nebo/a močovinu a růstové látky.