



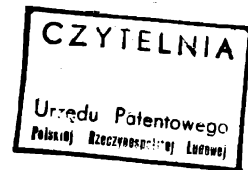
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 09.04.76 (P. 188622)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 21.11.77

Opis patentowy opublikowano: 29.09.1979



Int. Cl.² C12D 13/06

Twórcy wynalazku: Olga Ilnicka-Olejniczak, Janina Malanowska

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

Sposób wytwarzania biomasy, zwłaszcza białkowej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania biomasy, zwłaszcza białkowej, na drodze biosyntezy grzybów nitkowatych z klasy Fungi imperfecti, mającej zastosowanie szczególnie w przemyśle paszowym jako dodatek do pasz.

Znane są sposoby wytwarzania biomasy białkowej metodą hodowli wgłębnej przy użyciu różnych mikroorganizmów, jak na przykład drożdży, pleśni z klasy Fungi imperfecti, takich jak: *Byssoschlamys*, *Cliocladium*, *Paecilomyces*, *Spicaria*, *Trichoderma* itp.

Pożywki ciekłe, stosowane do biosyntezy biomasy białkowej, zawierają zwykle jako źródło węgla: ługi posiarzynowe, ługi posulfitowe, hydrolizaty odpadów roślinnych, melasę, wywar melasowy; jako źródło azotu: siarczan amonu lub inne sole amonowe, a jako źródło fosforu — fosforany dwuamonne, superfosfat itp.

Według znanych sposobów biosyntezy substancji białkowych metodą hodowli wgłębnej pożywkę, zawierającą źródło węgla, azotu oraz sole amonowe, sterylizuje się pod ciśnieniem, na przykład za pomocą wymienników ciepła lub w fermentorach, schładza do temperatury optymalnej dla rozwoju danego mikroorganizmu, po czym szczepi przygotowanym uprzednio inoculum i prowadzi proces biosyntezy metodą periodyczną, ciągłą lub półciągłą przy stałym napowietrzaniu i mieszaniu środowiska hodowlanego.

Szczegółowe jednak sposoby biosyntezy bioma-

2

sy białkowej opracowywane są w zależności od charakteru użytej pożywki oraz mikroorganizmu.

W opisie patentowym RFN nr 2 055 306 podano sposób biosyntezy biomasy w ługach posiarzynowych przy zastosowaniu pleśni, należących do klasy Fungi imperfecti, takich jak: *Byssoschlamys*, *Cliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*. Otrzymana tym sposobem biomasa zawiera 45—60% białka surowego.

W opisie patentowym niemieckim nr 744 677 opisany jest sposób biosyntezy biomasy białkowej z hydrolizatów celulozy lub ługów posulfitowych przy zastosowaniu pleśni z rodzaju: *Sterimatomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Citromyces*.

W opisie patentowym Stanach Zjednoczonych Ameryki nr 3 151 038 omówiona została produkcja biomasy białkowej z pleśni, należących także do Fungi imperfecti metodą wgłębną, lecz w pożywce syntetycznej, zawierającej źródło węgla, azotu oraz sole cynku w ilości 300 ppm. Otrzymana tym sposobem biomasa zawiera około 40% białka.

Celem wynalazku jest opracowanie prostego, nadającego się szczególnie do stosowania w skali przemysłowej, sposobu wytwarzania biomasy białkowej na drodze hodowli wgłębnej grzybów nitkowatych z klasy Fungi imperfecti oraz ustalenia warunków prowadzenia procesu hodowli.

Cel ten spełnia sposób według wynalazku, którego istotą polega na tym, że proces biosyntezy biomasy białkowej prowadzi się za pomocą nowe-

go szczepu grzyba nitkowatego z podklasy Fungi imperfecti w pożywce melasowej, systemem wielostadiowym, przy czym hodowlę produkcyjną szczepi się inoculum, otrzymanym z wcześniejszych hodowli inokularnych w ilości 10–30% w stosunku do użytej melasy.

Proces biosyntezy prowadzi się w czasie 10–24 godzin, przy pH środowiska hodowlanego, ustalonym w granicach 4,0–5,0, dozując melasę i sole azotowe w takiej ilości, aby stosunek węgla do melasy przez cały czas hodowli wynosił 7:1, a rozcieńczenie końcowe melasy — 1:25. Hodowlę prowadzi się w warunkach aerobowych, napowietrzając środowisko hodowlane do uzyskania współczynnika wnikania tlenu w granicach 600–900 h⁻¹.

W powyższych warunkach prowadzi się także poszczególne hodowle inokularne w odpowiednio zwiększonych fermentorach dla otrzymania niezbędnej ilości inoculum do zaszczepienia hodowli produkcyjnej, przy czym ilość hodowli inokularnych uzależniona jest od pojemności fermentora, w którym prowadzić się ma hodowlę produkcyjną. Pierwszą hodowlę inokularną prowadzi się w kolbach na wytrząsarce, a następne w fermentorach.

Nowy szczep grzyba nitkowatego z podklasy Fungi imperfecti zdeponowany jest w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego pod symbolem OX. Szczep ten posiada następujące cechy morfologiczne:

Pożywka. Czapek-Doxa oraz brzeczka słodowa 8°Błg z dodatkiem 2% agaru. Obie pożywki sterylizowane w autoklawie w przeciągu 30 minut przy ciśnieniu 0,5 atn.

Warunki wzrostu. 37°C, około 2 tygodni.

Tempo wzrostu. 6–7 cm w ciągu 3 dni na brzeczce i 5–6 cm w ciągu 3 dni na pożywce Czapek-Doxa.

Typ wzrostu na brzeczce. Okrągłe, białe, pilśniowate kolonie o lekko wzniesionym centrum i postrzępionych brzegach, niekiedy promieniście pofałdowane. Średnica kolonii po 7 dniach około 9 cm. Po 3 dobach obserwuje się obfite oliwkowo-brązowe zarodniki, pokrywające całą kolonię, z wyjątkiem jej brzegu. Spodnia strona kolonii, nie-

znacznie pofałdowana i nie wrastająca w podłoże, jest początkowo biała, w miarę starzenia się zaczyna wytwarzać brązowy pigment.

Na pożywce Czapek-Doxa. Białe kolonie okrągłe, pilśniowate, o guzikowo wzniesionym centrum i postrzępionych brzegach; płaskie. Średnica po 7 dniach około 6 cm. Bardzo skąpe jasno kremowe zarodniki pojawiają się po 6–7 dniach w centrum kolonii. Spodnia, gładka strona kolonii, nie wrastająca w podłoże, jest biała, w miarę starzenia się wytwarza jasno brązowy pigment, układający się koncentrycznie.

Konidia. Owalne konidia wytworzone są na drzewkowatych konidioforach, charakteryzujących się bardzo wyraźnie wykształconą komórką podstawową. Wytworzone są na końcach sterigm i mogą tworzyć krótkie łańcuszki. Konidia są jednokomórkowe, mają lekko zgrubiałą ściankę komórkową. Wyrosłe na pożywce Czapek-Doxa są jasno lub ciemno kremowe, na brzeczce zaś oliwkowo-brązowe. Ich wymiary wahają się od 2,6×3,5 do 5,6×6,9 μ.

Grzybnia. Na obu pożywkach występują dwa rodzaje strzępków. Młodsze strzępki są jednokomórkowe (bez przegród), o jednorodnej jasno zielonej plazmie i dobrze widocznych jądrach i wodniczках. Strzępki te są grube, o dobrze wykształconych ściankach komórkowych.

Wymiary. Drugi rodzaj strzępków jest znacznie cieńszy, o dobrze wykształconych soczewkowatych przegradach komórkowych i ciemno zielonej plazmie, zawierającej liczne ziarnistości. Komórki są jednojądrowe, a ściana komórkowa — bardzo cienka. Szerokość strzępków grubszych: 2,25–3,6 μ, cieńszych — 0,9–1,35 μ.

Sposób postępowania według wynalazku jest następujący:

Przykład. Stadium I. Czystą kulturę nowego szczepu Fungi imperfecti hodzi się na stosach brzeczkowo-agarowych w temperaturze 38°C przez okres 70 godzin, tj. do wytworzenia konidiów, których zawiesinę o stężeniu 10¹⁰ konidiów/ml szczepi się hodowlę inokularną.

Stadium II. Hodowlę inokularną prowadzi się na wytrząsarce w kolbach o pojemności 500 ml, zawierających 100 ml brzeczki melasowej o roz-

T a b l i c a

Godzina hodowli	stadia inokulacyjne			stadium produkcyjne		
	woda ml	melasa 1:1 ml	20% NH ₄ OH ml	woda ml	melasa 1:1 ml	20% NH ₄ OH ml
0	9 200	100	7,5	9 200	100	7,5
2		200	9,0		100	9,0
4		200	18,0		100	18,0
6		200	8,0		200	5,0
8		100	4,0		200	5,0
10		—	—		100	1,9
12		—	—		—	—
14		—	—		—	—
16		—	—		—	—
18		—	—		—	—

5

cieńczeniu końcowym 1:25, w ciągu 20 godzin. Następne stadia inokularne prowadzi się w fermentorach, zwiększając odpowiednio pojemność tych urządzeń.

Poniżej podany jest przykład hodowli inokularnej i produkcyjnej w fermentorze o pojemności około 10 litrów:

400 g melasy rozcieńcza się wodą w stosunku 1:1, klaruje się metodą kwaśną na gorąco i uzupełnia wodą do objętości 800 ml. Następnie do 9 200 ml wody wodociągowej dodaje się 100 ml melasy rozcieńczonej 1:1, 8,3 g fosforanu dwuamonowego i ustala pH środowiska na poziomie 4,2 przez dodanie kwasu siarkowego.

Przygotowaną pożywkę sterylizuje się w fermentorze o pojemności 25 litrów pod ciśnieniem 0,6 atn w ciągu 45 minut i po ochłodzeniu szczepi się zawieszoną grzybną nowego szczepu w ilości 15%, wyhodowaną w kolbach. Hodowlę wgłębną prowadzi się w temperaturze 37°C przy 900 obrotach mieszadła na minutę i napowietrzaniu 1 litr powietrza na 1 litr pożywki na minutę, dozując melasę oraz sole amonowe według danych podanych w tablicy.

Po zakończeniu hodowli produkcyjnej grzybnę oddziela się za pomocą wirówki, inaktywuje w rozparzaczu kolanowym i suszy w suszarce rozpyłowej lub walcowej. Otrzymana w postaci prosz-

6

ku inaktywowana biomasa białkowa stanowi produkt końcowy, który charakteryzuje się zawartością 40—50% białka i 3—5% P_2O_5 w suchej masie.

Zastrzeżenia patentowe

Sposób otrzymywania biomasy, zwłaszcza białkowej, na drodze hodowli grzyba z klasy Fungi imperfecti, **znamienny tym**, że proces biosyntezy prowadzi się w pożywce melasowej przy pomocy nowego szczepu grzyba z podklasy Fungi imperfecti, zdeponowanego w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego pod symbolem OX, przy czym hodowlę produkcyjną szczepi się inoculum, otrzymanym z wcześniejszych hodowli inokularnych w ilości 10—30% w stosunku do użytej melasy, po czym prowadzi się hodowlę, zarówno hodowlę produkcyjną, jak i poszczególne hodowle inokularne, w czasie 10—24 godzin, przy pH środowiska hodowlanego ustalonym w granicach 4,0—5,0, dozując melasę i sole azotowe w takiej ilości, aby stosunek węgla do azotu przez cały czas hodowli wynosił 7:1 i rozcieńczenie końcowe melasy 1:25, napowietrzając środowisko hodowlane do uzyskania współczynnika wnikanía tlenu w granicach 600—900 h⁻¹ i po zakończeniu hodowli produkcyjnej biomasę oddziela się od cieczy pohodowlanej, inaktywuje i suszy.