



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 17.10.1972 (P. 158313)

Pierwszeństwo: 27.10.1971 dla zastrz. 1—8
24.05.1972 dla zastrz. 9
Szwajcaria

Zgłoszenie ogłoszono: 01.06.1973

Opis patentowy opublikowano: 22.11.1975

Kl. 12o,25
22a,61/00

MKP C07c 175/00
C09b 61/00

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Jaroslav Dasek, David Shepherd, Knut Rude
Traelnes

Uprawniony z patentu: Société des Produits Nestlé S.A., Vevey
(Szwajcaria)

Sposób wytwarzania zeaksantyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania żółtego pigmentu, zeaksantyny, czyli 3,3'-dihydroksy-8-karotenu, na drodze biosyntezy.

Zeaksantynę można wykorzystać np. jako dodatk do pokarmu kurcząt w celu wzmocnienia żółtawego zabarwienia ich skóry lub też w celu podkreślenia barwy żółtek jaj. Pigment ten można również wykorzystać jako środek barwiący w przemyśle kosmetycznym.

Synteza pigmentów przez niektóre mikroorganizmy (drobnoustroje), szczególnie pigmentów karotenoidowych przez bakterie rodzaju *Flavobacter* jest procesem znanym. Niemniej jednak przemysłowe wytwarzanie tych pigmentów na drodze biosyntezy zwykle okazywało się trudne do przeprowadzenia, a uzyskane wydajności zwykle bardzo niskie, wymagające stosowania wielkich ilości pożywki hodowlanej, jeśli pożądanego było wytworzenie większych ilości pigmentu.

Stwierdzono, że można uzyskać zwiększoną wydajność zeaksantyny na drodze hodowli drobnoustrojów rodzaju *Flavobacter* wytwarzających ten pigment w warunkach, w których w pożywce hodowlanej zachowuje się zasadniczo stały stosunek pomiędzy ilościami substancji będących źródłem węgla i azotu.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania zeaksantyny na drodze hodowli drobnoustrojów rodzaju *Flavobacter*, w którym drobnoustroje hoduje się początkowo w środowisku odżywczym aż do

2

chwili, w której komórki zaczynają rosnąć i wytwarzać zeaksantynę, po czym hodowlę komórek po osiągnięciu przez nie odpowiedniej fazy wzrostu prowadzi się w temperaturze 22—25°C z odpowiednim natlenieniem w wodnym środowisku odżywczym, zawierającym co najmniej jeden węglowodan w ilości 15—35 mg/ml, stanowiący źródło przyswajalnego węgla, oraz substancję będącą źródłem azotu aminowego, zawierającą wolne aminokwasy. Podczas hodowli odpowiednie ilości substancji będących źródłem węgla i aminowego azotu w środowisku utrzymuje się w stałym zasadniczo stosunku przez stopniowe dodawanie tych substancji do pożywki hodowlanej. Hodowlę prowadzi się aż do zakumulowania w środowisku odpowiedniej ilości zeaksantyny.

Termin „drobnoustroje wytwarzające zeaksantynę rodzaju *Flavobacter*” obejmuje bakterie tego typu oraz ich mutanty. Szczególnie korzystnymi są *Flavobacter* ATCC Nr 21081, *Flavobacter* ATCC Nr 21588 i *Flavobacterium aquatile* ATCC Nr 11947. Termin „z odpowiednim natlenieniem” oznacza, że zawartość tlenu w pożywce hodowlanej nie jest niższa od wartości, przy której zawartość tlenu staje się czynnikiem limitującym szybkość wzrostu drobnoustroju w pożywce hodowlanej. Natlenienie to można uzyskać np. przez energiczne napowietrzanie i mieszanie pożywki hodowlanej. Wreszcie termin „środowisko odżywcze” oznacza pożywkę hodowlaną, zawierającą odpowiednie sub-

stancje przyswajalne, niezbędne dla wzrostu drobnoustroju. Substancje te obejmują w szczególności źródła węgla i azotu oraz sole mineralne. Środowisko odżywcze może także zawierać ewentualne dodatki, takie jak witaminy, środki przyspieszające wzrost i pierwiastki śladowe, niezbędne dla wzrostu bakterii.

Węglowodany, które stanowią zwykle główne źródło przyswajalnego węgla obejmują najkorzystniej glukozę, laktozę i sacharozę. Źródłem węgla może być także mieszanina dwóch lub większej liczby węglowodanów.

Spośród substancji, które mogą stanowić główne źródło azotu aminowego najkorzystniejszymi są ekstrakty kukurydziane, ekstrakty drożdżowe, hydrolizaty białkowe; w szczególności produkty otrzymywane przez kwasową lub enzymatyczną hydrolizę białek roślinnych, takich jak proteiny soi lub orzeszków ziemnych, i/lub hydrolizaty kazeiny, określane mianem „tryptonu”. Źródło azotu aminowego może także zawierać substancję wytworzoną przez kwasową lub enzymatyczną hydrolizę biomasy odzyskanej jako produkt uboczny w procesie biosyntezy pigmentu karotenoidowego, w wyniku karotenoidowego, w wyniku hodowli bakterii rodzaju *Flavobacter* — zwłaszcza przez hydrolizę biomasy z hodowli drobnoustrojów *Flavobacter*, prowadzonej celem wytwarzania zeaksantyny, po wydzieleniu z niej uzyskanego pigmentu.

Prowadząc proces sposobem według wynalazku, do tanku fermentacyjnego zawierającego środowisko odżywcze wprowadza się kulturę drobnoustroju rodzaju *Flavobacter*. Wzrost mikroorganizmu podtrzymuje się następnie przez zapewnienie odpowiedniej ilości tlenu w środowisku oraz utrzymując odpowiednią temperaturę i pH, np. temperaturę 28—30°C i pH od 6,5 do 8,0, najkorzystniej od 7,0 do 7,5. Szczególnie korzystne jest prowadzenie tego pierwszego etapu hodowli w środowisku zawierającym więcej niż 35 mg/ml substancji będącej źródłem węgla.

Gdy komórki osiągną odpowiedni stopień wzrostu, korzystnie fazę wzrostu wykładniczego, jak również odpowiedni etap wytwarzania zeaksantyny, wówczas hodowlę kontynuuje się w temperaturze 22—25°C przy ciągłym natlenieniu środowiska, utrzymując jednocześnie zawartość substancji stanowiącej źródło węgla na poziomie 15—35 mg/ml przy jednoczesnym zachowaniu zasadniczo stałego stosunku między ilościami substancji stanowiących źródła węgla i azotu. Najdogodniej jest to przeprowadzić przez ciągłe dodawanie środowiska odżywczego o stałym składzie, zawierającego substancje stanowiące źródło węgla i azotu w odpowiednich ilościach i stałym stosunku wagowym węgla do azotu, korzystnie w granicach od 1,6:1 do 3,4:1. Przy zastosowaniu korzystnego sposobu postępowania, obejmującego prowadzenie pierwszego etapu hodowli w środowisku zawierającym więcej niż 35 mg/ml substancji będącej źródłem węgla, zawartość tej substancji spada stopniowo w środowisku na skutek zużywania jej przez drobnoustroje.

Zaobserwowano, że szczególnie korzystne stężenie początkowe substancji będącej źródłem węgla wynosi od 6 do 8% wagowych ponieważ początek stadium wzrostu i wytwarzania zeaksantyny zbiega się mniej więcej z czasem, w jakim zawartość substancji będącej źródłem węgla spada do wartości 15—35 mg/ml, wymaganej w drugim stadium hodowli. Inaczej mówiąc, przez rozpoczęcie pierwszego etapu hodowli w środowisku zawierającym 6—8% wagowych substancji będących źródłem węgla, uzyskuje się stężenie tej substancji odpowiednie dla drugiego etapu w tym samym czasie, jak osiągnięcie odpowiedniej fazy wzrostu komórek i wytwarzania zeaksantyny. Tak więc drugi etap hodowli można rozpoczynać bezpośrednio po pierwszym.

W tym etapie pH pożywki hodowlanej utrzymuje się w granicach od 6,5 do 8,0, najkorzystniej od 7,0 do 7,5. Wartość pH można regulować przez dodawanie substancji alkalicznych, takich jak np. wodne roztwory wodorotlenku sodowego, wodorotlenku potasowego lub wodorotlenku amonowego, bądź też gazowego amoniaku. Dwie ostatnie substancje są szczególnie korzystne, ponieważ stanowią one jednocześnie źródło azotu aminowego przyswajalnego przez drobnoustroje.

Hodowlę kontynuuje się następnie przez okres odpowiedni do otrzymania w pożywce znacznie większych ilości zeaksantyny. Hodowlę można również kontynuować po zaprzestaniu dodawania substancji odżywczych. Środowisko wówczas będzie ulegało zmianom na skutek zużywania substancji odżywczych przez drobnoustroje.

Wyniki badań eksperymentalnych wykazały, że przy prowadzeniu hodowli drobnoustroju w sposób według wynalazku, wytwarzanie zeaksantyny jest znacznie większe niż w przypadku hodowli tych samych mikroorganizmów, prowadzonej w sposób konwencjonalny.

Po zakończeniu hodowli bulion fermentacyjny można zateżżyć, a zeaksantynę wyekstrahować z komórek, np. za pomocą polarnych rozpuszczalników organicznych, takich jak aceton lub etanol, bądź też chlorowanych rozpuszczalników, jak chloroform.

Alternatywnie, biomasę można wydzielić z pożywki hodowlanej, np. na drodze wirowania, dekantacji lub filtracji. Biomasa tę można następnie użyć np. jako dodatek do pożywienia dla kurcząt lub też można poddać ekstrakcji za pomocą polarnych rozpuszczalników organicznych. Szczególnie cenne rezultaty uzyskuje się przez hodowanie w opisany wyżej sposób mutantów wytworzonych przez działanie 1-metylo-3-nitro-1-nitrozo-quanidyny, oznaczanej dalej jako NTG na bakterie rodzaju *Flavobacter*, przy zastosowaniu nowej metody wywoływania mutacji polegającej na działaniu NTG na bakterie w zestalonej pożywce.

Mutant wytwarzający zeaksantynę drobnoustroju rodzaju *Flavobacter* można uzyskać np. przez rozcieńczenie kultury mikroorganizmu w sterylnym roztworze fizjologicznym i zmieszanie roztworu w odpowiednich ilościach na szalce Petri'ego z wodnym roztworem NTG. Można np.

zastosować taką samą objętość wodnego roztworu NTG, zawierającego od 1 do 10 mg tej substancji w 1 ml. Stopiony agar wlewa się następnie do roztworu i starannie miesza. Po zestaleniu się agaru uzyskane stałe środowisko utrzymuje się w inkubatorze, np. w temperaturze 25–28°C, aż do czasu pojawienia się kolonii bakterii w zestalonej pożywce. Kolonię tę następnie zbiera się i wielokrotnie nanosi na stałą odżywkę.

Otrzymany mutant można następnie poddać jednorazowej lub wielokrotnej obróbce w zestalonej odżywce, celem wywołania mutacji.

Wyniki doświadczeń wykazują, że opisany sposób wywoływania mutacji, prowadzony w zestalonej odżywce za pomocą mutagenów jak NTG, powoduje powstanie z bakterii typu *Flavobacter* mutantów, które wytwarzają w identycznych warunkach hodowli znacznie większe ilości zeaksantyny niż można uzyskać od mutantów wytworzonych konwencjonalnymi metodami z tych samych bakterii i przy użyciu tej samej substancji wywołującej mutację.

Sposób według wynalazku zilustrowano poniższymi przykładami, w których podane procenty są procentami wagowymi.

Przykład I. Ze szczepu bakterii rodzaju *Flavobacter* (ATCC Nr 21588) wytworzono kulturę, którą zaszczepiono w ilości 5% w wodnym środowisku odżywczym w tanku fermentacyjnym. Środowisko odżywcze uprzednio wysterylizowano w temperaturze 120°C przez okres 40 minut i ochłodzono do temperatury 28°C, oraz doprowadzono jego pH za pomocą amoniaku do wartości pomiędzy 6,9 i 7,1. Środowisko to miało następujący skład:

glukoza (oddzielnie wysterylizowana w roztworze stężonym)	7,0%
ekstrakt kukurydziany	1,6%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	0,8%
ekstrakt drożdżowy	1,8%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

Drobnoustroje hodowano w tanku fermentacyjnym w temperaturze 28°C przy energicznym napowietrzaniu i mieszaniu, utrzymując stałe pH środowiska w granicach 7,2–7,3 przez automatyczne dodawanie rozcieńczonego wodnego roztworu amoniaku.

W opisanych warunkach hodowla obejmowała fazę inicjacji od 6 do 7 godzin, zaś wytwarzanie zeaksantyny rozpoczęło się po upływie 14 godzin od rozpoczęcia hodowli.

Gdy stężenie glukozy w środowisku fermentacyjnym spadło stopniowo do wartości 25 mg/ml, to jest po 24 godzinach od rozpoczęcia hodowli, temperaturę środowiska obniżono do 24°C. Jednocześnie w tanku fermentacyjnym rozpoczęto stopniowe dodawanie substancji odżywczej, uprzednio wysterylizowanej w oddzielnym zbiorniku, której pH ustalono na 7,2. Substancję tę wprowadzano z taką szybkością, aby stężenie glukozy w środowisku pozostawało zasadniczo stałe. Kompozycja odżywca miała skład następujący:

glukoza	32%
ekstrakt kukurydziany	4,7%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	4,3%
ekstrakt drożdżowy	5,5%

5 woda wodociągowa do 100%

Stopniowe dodawanie tej substancji kontynuowano przez okres 20 godzin, utrzymując temperaturę środowiska 24°C. Po całkowitym okresie hodowli (50 godzin), określono zawartość zeaksantyny w środowisku fermentacyjnym. W tym celu wydzielono z substancji odżywczej biomasa na drodze wirowania, a zeaksantynę ekstrahowano z komórek za pomocą acetonu. Zawartość zeaksantyny w roztworze acetonowym określono kolorymetrycznie, porównując zabarwienie roztworu ze standardowymi roztworami syntetycznej zeaksantyny w tym samym rozpuszczalniku. Stwierdzono, że zawartość zeaksantyny w środowisku fermentacyjnym wynosiła 20 µg/ml.

20 W celach porównawczych ten sam szczep bakterii hodowano metodą konwencjonalną. Zaszczepiono go w ilości 5% objętościowych w takiej samej ilości środowiska odżywczego. Środowisko to, uprzednio wysterylizowane i ochłodzone do temperatury 28°C o pH ustalonym między 6,9–7,1 miało następujący skład:

glukoza	10,0%
ekstrakt kukurydziany	1,85%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	1,25%
ekstrakt drożdżowy	2,1%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

35 Hodowlę prowadzono przy energicznym napowietrzaniu i mieszaniu, utrzymując stałe pH pomiędzy 7,2–7,3. Faza inicjacji hodowli wynosiła 8 godzin, zaś wytwarzanie zeaksantyny rozpoczęło się po 15 godzinach hodowli. Temperaturę środowiska doprowadzono do 24°C po 24 godzinnej hodowli. Po 55 godzinnej hodowli określono, w uprzednio opisany sposób, zawartość zeaksantyny w środowisku fermentacyjnym. Wynosiła ona 12 µg/ml.

40 Przykład II. Wytworzono kulturę szczepu bakterii rodzaju *Flavobacter* (ATCC Nr 21081) w wodnym środowisku odżywczym o pH = 6,5, które miało następujący skład:

glukoza	3,0%
ekstrakt drożdżowy	1,0%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	1,0%
siarczan magnezu	0,5%
woda wodociągowa	do 100%

55 Kulturę tę, zawierającą 5 g komórek mikroorganizmu na 1 litr środowiska odżywczego rozcieńczono następnie w stosunku 1:10⁸ (objętościowo) za pomocą sterylnego roztworu fizjologicznego, zawierającego 0,9% wagowego chlorku sodu.

1 ml tego roztworu starannie zmieszano na szalce Petri'ego z 1 ml wodnego roztworu, zawierającego 5 mg NTG/ml. 10 ml stopionego agaru dodano do roztworu i oba składniki starannie wymieszano. Po zestaleniu się agaru szalkę Petri'ego utrzymywano w temperaturze 25–28°C, aż do pojawienia się kolonii bakterii w zestalonej pożywce to jest przez 2–4 dni. Kolonie te następnie usunięto

z szalki Petri'ego i naniesiono w wielu kolejnych etapach na stałą pożywkę agarową, nie zawierającą NTG.

Uzyskany szczep mutantu zaszczerpiono następnie w ilości 5% objętościowych do 100 ml sterylnego środowiska odżywczego o pH = 6,5, które miało następujący skład:

glukoza	3,0%
ekstrakt drożdżowy	1,0%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	1,0%
siarczan magnezu	0,5%
woda wodociągowa	do 100%

Drobnoustroje te hodowano przy dostępie powietrza w środowisku w temperaturze 28°C przez okres 24 godzin, a następnie kulturę tę zaszczerpiono powtórnie w 2 l środowiska odżywczego o tym samym składzie. Po 24 godzinnej fermentacji w tych samych warunkach, kulturę tę zaszczerpiono w ilości 5% objętościowych w wodnym roztworze środowiska odżywczego w tanku fermentacyjnym. Środowisko odżywcze, które uprzednio wysterylizowano w temperaturze 120°C przez okres 40 minut, a następnie ochłodzone do temperatury 28°C, miało pH doprowadzone przez dodanie amoniaku do wartości 6,9—7,1. Środowisko to miało następujący skład:

glukoza	7,0%
ekstrakt kukurydziany	1,6%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	0,8%
ekstrakt drożdżowy	1,8%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

Hodowlę prowadzono w tanku fermentacyjnym w temperaturze 28°C przy energicznym napowietrzaniu i mieszaniu, automatycznie utrzymując pH środowiska pomiędzy 7,2—7,3. Obserwowano wstępną, powolną fazę wzrostu przez okres 5 do 6 godzin, zaś wytwarzanie zeaksantyny rozpoczęło się po upływie 12 godzin od rozpoczęcia hodowli.

Kiedy stężenie glukozy w środowisku spadło stopniowo do wartości 25 mg/ml, to jest po 22 godzinach od rozpoczęcia hodowli, temperaturę środowiska obniżono do 24°C i do tanku zaczęto doprowadzać w sposób ciągły substancję odżywczą, którą uprzednio wysterylizowano i której pH doprowadzono do wartości 7,2. Szybkość dodawania tej substancji była tak dobrana, aby zawartość glukozy w pożywce hodowlanej pozostawała zasadniczo stała. Substancja ta miała następujący skład:

glukoza	32,0%
ekstrakt kukurydziany	4,7%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	4,3%
ekstrakt drożdżowy	5,5%
woda wodociągowa	do 100%

Ciągle dodawanie substancji odżywczej kontynuowano przez okres 20 godzin, utrzymując środowisko w temperaturze 24°C.

Po całkowitym okresie hodowli (48 godzin), stężenie glukozy w środowisku zmniejszono do 5 mg/ml i sposobem opisanym w przykładzie I, określono zawartość zeaksantyny w roztworze. Wynosiła ona 335 µg/ml.

Przykład III. Mutant szczepu *Flavobacter* (ATCC Nr 21081) wytworzono sposobem opisanym w przykładzie II.

Szczep mutantu zaszczerpiono następnie w ilości 4% objętościowych w tanku fermentacyjnym, zawierającym wodne środowisko odżywcze, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 120°C przez okres 40 minut i ochłodzone do temperatury 28°C. Środowisko odżywcze, którego pH doprowadzono za pomocą amoniaku do wartości pomiędzy 6,9—7,1, miało następujący skład:

glukoza	7,0%
ekstrakt kukurydziany	1,6%
hydrolizat z orzeszków ziemnych	0,7%
ekstrakt drożdżowy	2,0%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

Mikroorganizmy hodowano w tanku fermentacyjnym w temperaturze 28°C w sposób opisany w przykładzie II.

Gdy stężenie glukozy w pożywce hodowlanej osiągnęło wartość 25 mg/ml, temperaturę pożywki obniżono do 24°C i rozpoczęto ciągłe dodawanie substancji odżywczej, uprzednio wysterylizowanej, której pH doprowadzono do wartości 7,2. Szybkość dodawania tej substancji utrzymywano taką, aby stężenie glukozy pozostawało zasadniczo stałe.

Substancja odżywcza miała następujący skład:

glukoza	32,0%
ekstrakt kukurydziany	4,7%
hydrolizat z orzeszków ziemnych	3,5%
ekstrakt drożdżowy	6,0%
woda wodociągowa	do 100%

Dodawanie substancji odżywczej kontynuowano przez okres 20 godzin w temperaturze 24°C.

Po całkowitym okresie hodowli, wynoszącym 51 godzin, stężenie glukozy w środowisku zmniejszono do 7,5 mg/ml. Stężenie zeaksantyny, określane w sposób opisany w przykładzie I, wynosiło 312 µg/ml.

Przykład IV. Kulturę *Flavobacterium aquatile* ATCC Nr 11947 zaszczerpiono w ilości 5% do wodnego środowiska odżywczego, umieszczonego w tanku fermentacyjnym. Środowisko to, uprzednio wysterylizowane w temperaturze 120°C przez okres 40 min i ochłodzone do temperatury 28°C posiadało pH ustalone za pomocą amoniaku w granicach 6,9—7,1. Środowisko odżywcze miało następujący skład:

glukoza	7,0%
ekstrakt kukurydziany	1,6%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	0,8%
ekstrakt drożdżowy	1,8%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

Drobnoustroje hodowano w tanku fermentacyjnym w temperaturze 28°C przy energicznym napowietrzaniu i mieszaniu, utrzymując stale pH środowiska pomiędzy 7,2 i 7,3 przez automatyczne dodawanie rozcieńczonego wodnego roztworu amoniaku.

Hodowla prowadzona w opisanych warunkach obejmowała okres wstępny 6—7 godz. zaś wytwarzanie zeaksantyny rozpoczęło się po upływie 14 godzin od rozpoczęcia hodowli.

Gdy stężenie glukozy w środowisku fermentacyjnym zmniejszyło się stopniowo do wartości 25 mg/ml, to jest po 2 godzinach od rozpoczęcia hodowli, temperaturę środowiska, obniżono do 24°C i rozpoczęto ciągle dodawanie substancji odżywczej uprzednio wysterylizowanej w oddzielnym zbiorniku, której pH doprowadzono do wartości 7,2. Szybkość dodawania substancji odżywczej utrzymywano taką, aby zawartość glukozy w środowisku pozostawała zasadniczo stała. Substancja odżywcza miała następujący skład:

glukoza	32,0%
ekstrakt kukurydziany	4,7%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	4,3%
ekstrakt drożdżowy	5,5%
woda wodociągowa	do 100%

Ciągle dodawanie substancji odżywczej kontynuowano przez okres 20 godzin, utrzymując temperaturę środowiska 24°C.

Po całkowitym czasie hodowli (50 godzin), określono zawartość zeaksantyny w środowisku fermentacyjnym metodą chromatografii cienkowarstwowej i spektroskopii w nadfiolecie.

Zawartość zeaksantyny w środowisku fermentacyjnym wynosiła 16 µg/ml.

W celach porównawczych ten sam szczep bakterii hodowano metodą konwencjonalną. Został on zaszczerpiony w ilości 5% objętościowych do tej samej ilości środowiska odżywczego. Środowisko uprzednio wysterylizowano i ochłodzono do temperatury 28°C, zaś pH środowiska doprowadzono do wartości 6,9—7,1. Środowisko to miało następujący skład:

glukoza	10,0%
ekstrakt kukurydziany	1,85%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	1,25%
ekstrakt drożdżowy	2,1%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

Hodowlę prowadzono przy energicznym napowietrzaniu i mieszaniu z ciągłą regulacją pH w granicach 7,2—7,3. Zaobserwowano okres wstępny wynoszący 8 godzin, zaś wytwarzanie zeaksantyny rozpoczęło się po upływie 15 godzin od rozpoczęcia hodowli. Temperaturę środowiska obniżono do 24°C po 24 godzinach od rozpoczęcia hodowli. Po upływie 55 godzin od rozpoczęcia hodowli określono, w opisany wcześniej sposób, zawartość zeaksantyny w środowisku fermentacyjnym; wynosiła ona 12 µg/ml.

Przykład V. Prowadzono hodowlę *Flavobacterium aquatile* ATCC Nr 1194 w wodnym środowisku odżywczym, którego pH wynosiło 6,5. Środowisko to miało następujący skład:

glukoza	3,0%
ekstrakt drożdżowy	1,0%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	1,0%
siarczan magnezu	0,5%
woda wodociągowa	do 100%

Kulturę tę, zawierającą 5 g komórek drobnoustroju na 1 litr środowiska odżywczego rozcieńczono następnie w stosunku 1:10⁶ (objętościowo) za pomocą sterylnego roztworu fizjologicznego, zawierającego 0,9% wagowych chlorku sodowego.

Na szalce Petri'ego starannie zmieszano 1 ml tego roztworu z 1 ml roztworu wodnego, zawierającego 5 mg NTG/ml. Następnie dodano 10 ml stopionego agaru i agar wymieszano starannie z roztworem. Po zestaleniu się agaru, szalkę Petri'ego utrzymywano w temperaturze 25—28°C, aż do czasu pojawienia się kolonii bakterii w zestalonej pożywce, to jest przez 2—4 dni. Kolonie te następnie usunięto z szalki Petri'ego i naniesiono w szeregu kolejnych operacji na stałą pożywkę agarową, pozbawioną NTG. Wytworzony szczep mutantu zaszczerpiono następnie w ilości 5% objętościowych do 100 ml sterylnego środowiska odżywczego o pH = 6,5, które miało następujący skład:

glukoza	3,0%
ekstrakt drożdżowy	1,0%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	1,0%
siarczan magnezu	0,5%
woda wodociągowa	do 100%

Drobnoustroje hodowano przy dostępie tlenu w tym samym środowisku w temperaturze 28°C przez okres 24 godzin, a następnie kulturę zaszczerpiono do 2 l środowiska odżywczego o tym samym składzie.

Po 24 godzinnej fermentacji w tych samych warunkach, tę ostatnią kulturę zaszczerpiono powtórnie w ilości 5% objętościowych w wodnym środowisku odżywczym, umieszczonym w tanku fermentacyjnym. Środowisko to uprzednio wysterylizowano w temperaturze 120°C przez okres 40 minut i ochłodzono do temperatury 28°C, a jego pH doprowadzono przez dodanie amoniaku do wartości 6,9—7,1. Środowisko odżywcze miało następujący skład:

glukoza (oddzielnie sterylizowana w roztworze stężonym)	7,0%
ekstrakt kukurydziany	1,6%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	0,8%
ekstrakt drożdżowy	1,8%
siarczan magnezu	0,5%
olej kukurydziany	0,08%
woda wodociągowa	do 100%

Gdy stężenie glukozy w środowisku spadło stopniowo do wartości 25 mg/ml, to jest po 22 godzinach od rozpoczęcia hodowli, temperaturę środowiska obniżono do 24°C i rozpoczęto ciągle dodawanie substancji odżywczej, którą uprzednio wysterylizowano i której pH doprowadzono do wartości 7,2. Substancję odżywczą dodawano z taką szybkością, aby stężenie glukozy w środowisku pozostawało zasadniczo stałe. Substancja odżywcza miała następujący skład:

glukoza	32,0%
ekstrakt kukurydziany	4,7%
hydrolizat kazeinowy (trypton)	4,3%
ekstrakt drożdżowy	5,5%
woda wodociągowa	do 100%

Ciągle dodawanie substancji odżywczej kontynuowano przez okres 20 godzin, utrzymując tem-

peraturę środowiska 24°C. Po sumarycznym czasie hodowli trwającym 48 godzin, stężenie glukozy w środowisku zmniejszono do 5 mg/ml i oznaczono zawartość zeaksantyny sposobem opisanym w przykładzie IV. Wynosiła ona 40 g/ml.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania zeaksantyny przez hodowanie drobnoustrojów wytwarzających zeaksantynę rodzaju *Flavobacter* lub jej mutantą, **znamienny tym**, że drobnoustrój hoduje się w środowisku odżywczym przy pH = 6,5—8,0 do momentu uzyskania komórek w stadium wzrostu i do rozpoczęcia wytwarzania zeaksantyny, a następnie komórki te hoduje się dalej, w temperaturze 22—25°C z odpowiednim natlenieniem, w wodnym środowisku odżywczym zawierającym co najmniej jeden węglowodan w stężeniu 15—35 mg/ml jako źródło przyswajalnego węgla, oraz co najmniej jedno źródło przyswajalnego azotu aminowego, zawierające wolne aminokwasy, przy czym w czasie hodowli ilość substancji stanowiących źródła węgla i azotu utrzymuje się w stałym stosunku przez ciągłe ich dodawanie, a hodowlę prowadzi się do momentu wytworzenia zeaksantyny w odpowiedniej ilości.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako węglowodan stosuje się glukozę, laktozę lub sacharozę.

3. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że jako źródło azotu aminowego stosuje się co naj-

mniej jedną substancję taką jak amoniak, ekstrakt kukurydziany, ekstrakt drożdżowy, hydrolizat białkowy i hydrolizat biomasy z hodowli mikroorganizmów rodzaju *Flavobacter*.

4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że drobnoustroje hoduje się najpierw w środowisku odżywczym zawierającym więcej niż 35 mg/ml substancji będącej źródłem przyswajalnego węgla zawierającej co najmniej jeden węglowodan, następnie pozwala się na zmniejszenie zawartości węglowodanu do wartości pomiędzy 15 i 35 mg/ml i kontynuuje się dalej hodowlę w temperaturze 22—25°C.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę hodowlaną zawierającą na początku hodowli 6—8% substancji będącej źródłem przyswajalnego węgla.

6. Sposób według zastrz. 1—5, **znamienny tym**, że podczas hodowli dodaje się sukcesywnie substancje będącą źródłem węgla i azotu we wzajemnym stosunku wagowym 1,6:1—3,4:1.

7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się mutant uzyskany w wyniku działania 1-metylo-3-nitro-1-nitrozoguanidyny na bakterie rodzaju *Flavobacter* w zestalonej pożywce.

8. Sposób według zastrz. 1—7, **znamienny tym**, że jako drobnoustrój stosuje się szczep *Flavobacter* ATCC Nr 21081 lub *Flavobacter* ATCC Nr 21588.

9. Sposób według zastrz. 1—8, **znamienny tym**, że jako drobnoustrój stosuje się szczep *Flavobacterium aquatile* ATCC Nr 11947.

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej
Lp. 8000