

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 143286 B

- (21) Ansøgning nr. 3326/77 (51) Int.Cl.³ C 12 N 1/32
(22) Indleveringsdag 22. jul. 1977
(24) Løbedag 22. jul. 1977
(41) Alm. tilgængelig 25. jan. 1978
(44) Fremlagt 3. aug. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 24. jul. 1976, 2633451, DE

(71) Ansøger HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT, 6230 Frankfurt/Main 80, DE.

(72) Opfinder Paul Praeve, DE: Dieter Sukatsch, DE: Uwe Faust, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.
-
- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af bakteriecellemasse.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af bakteriecellemasse, der indeholder en stor mængde protein og desuden fedtstoffer, carbonhydrater og vitaminer. Cellemassen tjener som grundsubstans for fodermidler.

Kendte metoder til fremstilling af bakteriecellemasse ved hjælp af bakteriestammer, der vokser på methanol som eneste carbonkilde, fører ofte til produkter, der indeholder farvestoffer, slim eller uønskede reservestoffer såsom polyhydroxysmørsyre, hvorved deres egnethed som fodermidler indskrænkes stærkt. Lugt, smag eller toksiske egenskaber hos sådanne ledsagende stoffer kan forhindre en sådan anvendelse.

143286 B

Man har nu fundet en ny stamme af slægten *Methylomonas*, der som carbonkilde kan bruge methanol, methan eller dimethylamin. Denne stamme er nybestemt som *Methylomonas clara* FH-B-5460 og deponeret i American Type Culture Collection under betegnelsen ATCC 31226.

Fremgangsmåden til fremstilling af bakteriecellemasse ifølge opfindelsen ved dyrkning af bakterier af slægten *Methylomonas* under aerobe betingelser i et næringsmedium indeholdende methanol som carbonkilde, nitrogenkilder og mineralsalte er ejendommelig ved, at der anvendes en stamme af arten *Methylomonas clara* ATCC 31.226, og at koncentrationen af methanol ligger mellem 5 og 150 dpm beregnet på vægten af næringsmediet. Methanol er den eneste carbonkilde.

Foretrukket er en methanolkoncentration, der ligger mellem 5 og 100 dpm. Særlig foretrukket, især til kontinuerlig drift, er en methanolkoncentration mellem 5 og 30 dpm.

Fremgangsmåden foregår i godt udluftede fermentationsbeholdere, der indeholder et næringsmedium, der foruden methanol som eneste carbonkilde indeholder salte såsom kaliumnitrat, ammoniumsulfat, ammoniumphosphat eller ammoniak som nitrogenkilde. Desuden indeholder det phosphater såsom kaliumdihydrogenphosphat eller dinatriumhydrogenphosphat samt magnesium- og kaliumsalte; desuden spor af grundstoffer, således som de indeholdes i ledningsvand, altså især jern-, kobber- og molybdænsalte.

Fremgangsmåden gennemføres fortrinsvis ved temperaturer mellem 30 og 42°C, fortrinsvis mellem 35 og 39°C.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan foregå i kendte fermentationsbeholdere, f.eks. i luftgennemstrømmede rørkedler eller også i moderne gæringsbeholdere såsom "slynge"reaktorer med afbrudt eller kontinuerlig drift.

Det flydende næringsmedium i fermentationsbeholderen udluftes med 0,1-1,5 liter luft pr. liter næringsmedium og minut (vvm).

Den methanolkoncentration, der skal opretholdes, kan styres kontinuerligt ved forskellige forholdsregler, f.eks. ved måling af nitrogenforbruget, af mængden af bakteriecellemasse i suspensionen eller fortrinsvis ved måling af carbondioxidproduktionen. Denne regulering kan med særlig fordel også ske ved hjælp af målingen af gasformig methanol med en flammeioniseringsdetektor.

pH-værdien af den kultursuspensionen, der består af næringsmedium og den voksende bakteriecellemasse, ligger fortrinsvis mellem 4,0 og 9,0, særlig foretrukket mellem 6,0 og 7,2. Når kultursuspensionens pH-værdi falder under den foreskrevne værdi, tilsættes der en tilsvarende mængde alkali, f.eks. natriumhydroxid- eller kaliumhydroxidop-

løsning. En for høj pH-værdi reguleres ved tilsætning af syre, f.eks. saltsyre eller svovlsyre.

Fraskillelsen af bakteriecellemassen sker på gængs måde, f.eks. ved centrifugering under flere gange vask med vand. Hertil kan der anvendes dekanteringsmidler og separatorer. Man får således en pastaagtig bakteriecellemasse, der stadig indeholde 75-90 vægtprocent vand.

Tørringen kan ske på forskellige måder, f.eks. ved valsetørring, tørring i hvirvellag eller sprøjtetørring. Det således tørrede produkt indeholder kun 1-4 vægtprocent vand og 80-90 vægtprocent råprotein. I dette råprotein er mængden af aminosyre 75-78 vægtprocent, idet mængden af essentielle aminosyre er ca. 50 vægtprocent af det samlede indhold af aminosyre. Produktets indhold af nucleinsyre, fedt og carbonhydrater er lavt. Nucleinsyreindholdet ligger mellem 10 og 14 vægtprocent, indholdet af fedt ligger mellem 5 og 10 vægtprocent, og indholdet af carbonhydrater ligger mellem 5 og 10 vægtprocent.

Særlig fordelagtigt er det, at den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede tørrede bakteriecellemasse ikke indeholder pigmenter, toksiske stoffer, reservestoffer såsom slim eller polyhydroxysmørsyre, ødelæggende lugtstoffer eller sekundære metabolitter.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnåede tørrede bakteriecellemasse er derfor i særlig udstrækning egnet som kilde for æggehvide-stoffer til dyrefoder.

Den ny art *Methylomonas clara* FH-B-5460 ATCC 31226 kan karakteriseres som følger.

I. Vækstbetingelser

- | | |
|-------------------|---|
| a) Ingen vækst på | Glukoseagar eller glukosemedium, kødbouillonagar eller kødbouillonæringsmedium, gelatine, peptonagar eller -medium, lakmusmælk, kartoffelnæringsmedium og aminosyrenæringsmedium. |
| b) Vækst på | Methanolholdigt syntetisk næringsmedium |

II. Morfologi

- a) Korte små stave på 0,5-1,5 μ , bevægelige ved polære fimrehår, ingen sporedannelse, cystedannelse.
- b) Koloniformen rund, gennemskinnelig, let glinsende.
- c) Ingen pigmentdannelse.

III. Fysiologi

- a) Vækst ved: 20°C $\pm$,
 25°C +
 30°C ++
 35°C +++
 37°C ++++
 39°C +++
 41°C +

Optimal væksttemperatur: 37°C

Optimal pH-værdi: 6,8-7,0

Gram-negativ

- b) Vækstfaktorer ikke påkrævet

- c) Vækstbetingelser

Polyhydroxysmørsyredannelse	-
Indoldannelse	-
Acetonedannelse	-
Reduktion af NO ₃	+

Cytochromoxidase	+
Katalase	+
Isocitratdehydrogenase	+
Malatdehydrogenase	+
Oxidase	+

Dannelse af H ₂ S	-
Smeltning af gelatine	-
Stivelseshydrolyse	-
Citronsyredannelse	-
Mælkekoagulering	-

Vækst på	
Ammoniumsalte	+
Urinstoffer	-
Acetat	-
Dimethylamin	+
Trimethylamin	-
Monomethylamin	-

Formiat	-
Formaldehyd	-
Sukker, Polysaccharid	-
Alkoholer (excl. methanol)	-
N ₂ -fiksering	+
CO ₂ -fiksering	+

De kendte *Methylomonas*-arter og andre methanolforbrugende mikroorganismer er beskrevet i Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. udg., Williams & Wilkens Company, Baltimore 1974; desuden er beslægtede stammer blevet karakteriseret i forskellige publikationer. Nedenstående tabel I viser teknikken stadi i sammenligning med de karakteristiske egenskaber hos den nye art *Methylomonas clara*. Som tabellen viser, er *Pseudomonas*-arterne forskellige ved dannelsen af polyhydroxysmørsyre og manglende vækst på methan eller dimethylamin som hos den nye art. De kendte *Methylomonas*-arter adskiller sig fra den nye art ved temperaturoptimum, pigmentdannelse, polyhydroxysmørsyredannelse og kokke-form. Et yderligere vigtigere adskillelsestegn mellem den nye art og kendte arter er hexylosephosphatvejen. Denne er hos den nye art energetisk begunstiget i forhold til methanoludnyttelsens serinvej.

I nedenstående tabel betyder G+C (%) i slutningen af første kolonne guanin- og cytosinmængden i det samlede indhold af pyrimidinbaser.

I kolonne 2 karakteriseres den nye art *Methylomonas clara* ATCC 31266.

I kolonne 3-7 samt 11 er anført beslægtede stammer, der er beskrevet i Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. udg., 1974, The Williams & Wilkens Company, Baltimore.

I kolonnerne 8-10 er angivet beslægtede arter fra nogle enkelte publikationer. Det drejer sig om *Pseudomonas methanolica*, der er beskrevet i USA patentskrift nr. 3.755.082, *Pseudomonas* AM 1, der er beskrevet i J. Bact. 114 (1), 390 (1973), og *Pseudomonas methylothropa*, der er beskrevet i tysk fremlæggeskrift nr. 2.161.164.

Nærværende patent omfatter ikke fremgangsmådens anvendelser ved tilvirkning af næringsmidler.

Følgende eksempler illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen yderligere.

Tabel I

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Celllestørrelse (μ)	Methylomonas clara FH-B-5460 ATCC 31226	Methylomonas methanica	Methylomonas methano- oxidans	Methylomonas methanoni- trificans	Methylococcus capsala- ticus	Methylosinus methylocystis	Ps.methanolica	Pseudomonas AM 1	Ps.methylotropha	Methylomonas methanica
Form	0,5x1,5 Stave	0,6x1,0 Stave	1x3 Stave	1x2 2x4 Stave	1x1 Kokker				Stave	
Bevægelighed	+		+	+	-				+	
Pigmentcannelse	-	+	-	+	-					+
PHBS	-	-	-	+	-		+		-	
N ₂ -fiksering	+	-		+				+		
CO ₂ -fiksering	+									
NO ₃ a. nitrogen- kilde	+	+			+					
Temp. opt. °C	37°	30	30		37					
Vækst på aminosyrer	-				+					
Methanol s. C-kilde	+		+	+	+		+	+	+	+
Methan s. C-kilde	+	+	+	+	+		-	+	+	+
Ethanol s. C-kilde		-	-	+				+	-	-
Hexulosephosphatvej	+	+	+	+	+	+				
Serinvej	+									
Formaldehyd										
Formiat										
Trimethylamid	+								-	-
Dimethylamid										
G + C (%)		50-54	50-54	50-54	62,5	62,5			54	52,1

Eksempel 1

Stammen *Methylomonas clara* FH-B-5460 ATCC 31266 holdes ved dyrkning på små skrå rør med følgende sammensætning:

Agar	18	g
85%'s H_3PO_4	2,0	ml
12%'s NH_4OH	3,0	ml
$NaHPO_4$	0,01	g
H_2SO_4	1,2	g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,8	g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,03	g
Methanol (tilsat før rørene tappes)	10,0	ml
Sporelementopl. *)	1,0	ml
Vand	1	liter
pH før sterilisation	6,7	

*) indeholder $CuSO_3$, H_3BO_3 , $MnSO_4$, $ZnSO_4$ og Na_2MoO_4

De skrå rør med denne sammensætning opvarmes 30 minutter i en autoklav til $120^\circ C$. Derefter podes rørene med *Methylomonas clara* og holdes i 2 døgn på $37^\circ C$. Fra to rør vaskes cellemassen med 10 ml fysiologisk kogsaltopløsning og overføres til næste trin.

Dette trin er en rystemkultur (forkultur), hvor der anvendes en Erlenmeyerkolbe på 2 liter, der fyldes med 1 liter næringsopløsning som ovenfor, dog uden agar, og hertil sættes 3,3 ml methanol (filtret sterilt). Denne kultur holdes i tre døgn ved $37^\circ C$ i rystemaskinen, der kører med 220 o/m og en amplitude på 4 cm. Efter 24 og 48 timers forløb tilsættes 3,3 ml methanol.

Det følgende trin (hovedkultur) foretages i en fermenteringsbeholder med et volumen på 25 liter, der fyldes med ca. 20 liter af ovenstående næringsopløsning, dog uden methanol og uden agar. Efter sterilisering (30 min./ $120^\circ C$ /1,2-1,4 bar) podes fermenteringsbeholderen med 2 liter forkultur. Fermenteringsbetingelserne i fermenteringsbeholderen, der er udstyret med en bladomrører, ventilationskrans og tre skvulpeplader, er følgende:

Temperatur	$37^\circ C$	
Udluftning	10 liter/min.	0,5 vvm
Tryk	0,2 bar	
Omdrejningstal	500 o/m	
pH-værdi	6,6	

Methanol tilsættes på forhånd med 20 ml; hver gang cellernes CO_2 -produktion falder, tilsættes yderligere 20 ml methanol. Methanol-koncentrationen bliver derved ikke mere end 0,1 volumenprocent.

Efter 22 timer overføres hovedkulturens 20 liter kultursuspension til en forfermenteringsbeholder på 200 liter. Denne fermenteringsbeholder behandles nøjagtig som hovedkulturen, og den er udstyret på samme måde. Fermenteringsbetingelserne er:

Temperatur	37°C	
Udluftning	6-8 m ³ /h	0,5-0,75 vvm
Tryk	0,2 bar	
Omdrejningstal	380 o/m	
pH-værdi	6,7	

pH-værdien holdes med 10%'s sterilt ammoniakvand på 6,7-6,8. Methanoltilførslen reguleres ved måling af methanolkoncentrationen i afgangsluften ved hjælp af et FID (flammeioniseringsdetektor), idet ethvert fald i methanolværdien under 50 ppm medfører yderligere tilsætning af methanol. Ved 600 ppm methanol i udgangsluften er der 0,22% methanol i opløsningen.

Efter 20 timers fermentering podes en hovedfermenteringsbeholder med 200 liter kultursuspension fra forfermenteringsbeholderen; den indeholder 2000 liter næringsopløsning og har følgende driftsbetingelser:

Temperatur	37°C	
Udluftning	60-80 m ³ /h	0,5-0,75 vvm
Tryk	0,2 bar	
Omdrejningstal	170 o/m	
pH-værdi	6,7	

Tilsætningen af methanol sker som i forfermenteringsbeholderen på 200 liter. Methanolkoncentrationen ligger ved 50-80 ppm i næringsopløsningen. Efter 22 timers fermenteringstid høstes bakteriecellemassen. Hertil bringes kultursuspensionens pH ved tilsætning af fortyndet svovlsyre på 4,0, og cellemassen slynges i separatoren ved 400 o/m. Man kan også slynge ved pH 6,5-6,8. Den slyngede cellemasse (tørstofindhold 20%) vaskes med vand og bringes derefter i separatoren til et tørstofindhold på 25%. Herefter tørres cellemassen i en sprøjte-tørrer ved en indgangstemperatur på 120-150°C. Det således fremkomne pulver indeholder stadig en restfugtighed på 1,5-3,5% samt

(N x 6,25)	
råprotein	85%
Aminosyrer	74%
Essentielle aminosyrer heraf ca.	50%
Nucleinsyrer	8-12%
Råfedt	6- 8%
Råaske	5- 6%

(procentangivelserne er vægtprocent).

Eksempel 2

Stammen *Methylomonas clara* FH-B-5460 ATCC 31266 dyrkes som beskrevet i eksempel 1.

Hovedfermenteringsbeholderen er på 3000 liter og beregnet til kontinuerlig fermentering under stadig ventilering. Dens driftsbetingelser er følgende:

Temperatur	37°C
Udluftning	80 Nm ³ /h 0,67 vvm
Tryk	0,1 bar
Omdrejningstal	390 o/m
pH-værdi	6,8

Der podes med 200 liter kultursuspension fra forfermenteringsbeholderen; den indeholder 2000 liter næringsopløsning (som beskrevet i begyndelsen af eksempel 1, dog uden agar). Methanolkoncentrationen måles som beskrevet ovenfor og reguleres ved tilsætning af methanol/vand i et volumenforhold på 40:60, således at der opretholdes en fri middelmethanolkoncentration på 10-50 ppm methanol i næringsopløsningen.

Efter produktion af 7-10 kg cellemasse/liter optages kontinuerlig drift.

Med en gennemstrømningshastighed (D) på 0,25/h tilsættes næringsmediet; dette tal øges efter ca. 12 timer til D = 0,33/h, hvilket udgør ca. 650 l/h. Efter dette tidspunkt har strømningsligevægten reguleret sig ind. Den frie middelmethanolkoncentration holdes nu mellem 10 og 20 ppm. Den tilsvarende mængde tilgroet næringsmedium fjernes, holdes i en mellembeholder uden tilsætning af methanol i 1-2 timer og tilføres derefter til cellefraskillelse og tørring som beskrevet i eksempel 1.

Den således opnåede cellemasse indeholder 2-4% restfugtighed samt

Råprotein (N x 6,25	81%
Aminosyrer	70%
Essentielle aminosyrer	50% af de samlede aminosyrer
Nucleinsyrer	8-10%
Råfedt	5-10%
Råaske	5-10%

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af bakteriecellemasse ved dyrkning af bakterier af slægten *Methylomonas* under aerobe betingelser i et næringsmedium, der indeholder methanol som carbonkilde, nitrogenkilder og essentielle mineralsalte, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en stamme af arten *Methylomonas clara* ATCC 31226 og at koncentrationen af methanol ligger mellem 5 og 150 dpm beregnet på vægten af næringsmediet.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ved kontinuerlig drift ligger koncentrationen af methanol mellem 5 og 30 dpm beregnet på vægten af næringsmediet.

Fremdragne publikationer:
