



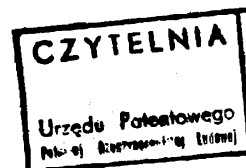
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 29.07.76 (P. 191509)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 27.02.78

Opis patentowy opublikowano: 16.07.1979



Int. Cl.² C12D 13/06

Twórcy wynalazku: Wojciech Peziński, Tadeusz Izbiński, Maria
Szczepankowska

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

Sposób otrzymywania bakteryjnej biomasy białkowej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania białkowej biomasy bakteryjnej z metanolu, mającej zastosowanie w przemyśle paszowym jako dodatek do pasz.

Fermentacyjny sposób syntezy białka przy zastosowaniu odpowiednio wyselekcjonowanych szczepów aerobowych, prowadzony w roztworach wodnych, zawierających metanol, jako jedyne źródło węgla i energii oraz inne składniki wzrostu, jest znany od dawna. Znane dotychczas pożywki o bardzo różnym składzie ilościowym i jakościowym, stosowane do różnych szczepów bakterii, metabolizujących metanol, pozwalają jednak uzyskiwać stosunkowo niskie stężenia komórek w płynie hodowlanym.

I tak na przykład w „Appl. Microbiol.” nr 23/72, s. 135—140 opisany jest sposób biosyntezy białka z metanolu przy zastosowaniu pożywki, która pozwala na uzyskiwanie stężenia komórek bakterii w granicach 2—3 g/l. Przy użyciu pożywki, której skład opisany jest w „Biotechnol. Bioeng.” nr 11/69, s. 1042—1054 w warunkach niekontrolowanego w czasie dopływu jej składników, uzyskano stężenie komórek bakterii około 7 g/l.

Zwiększenie stężenia komórek starano się uzyskać poprzez stosowanie dozowania pożywki w trakcie hodowli tak, aby wzajemne proporcje pierwiastków były niezmiennie. Podstawą do opracowania tego sposobu było stwierdzenie, że najważniejsze składniki są pobierane w stałych proporcjach do szybkości zużycia azotu. Z tego względu 1 M NH_4OH zastosowano do regulacji pH środowiska hodowlanego i jednocześnie jako czynnik, wyrównujący stężenie azotu. Pozostałe składniki pożywki

2

doprowadzano w odpowiedniej proporcji do azotu, zawartego w jednomolowym NH_4OH .

Opisany wyżej sposób nie gwarantuje jednak pożądanych wyników, gdyż uniemożliwia zachowanie warunków chemostatowych i uzyskiwanie wyższych stężeń komórek ze względu na stosunkowo niską zawartość azotu w 1M NH_4OH w odniesieniu do objętości płynu hodowlanego. Zastosowanie wyższych stężeń amoniaku stwarza problem przygotowania roztworu pozostałych soli mineralnych, w odpowiedniej do stężeń azotu proporcji, które podczas przygotowania i sterylizacji nie tworzyłyby nierozpuszczalnych i nieprzyswajalnych przez bakterie związków chemicznych.

Celem wynalazku jest opracowanie optymalnego składu pożywki oraz ustalenie warunków prowadzenia biosyntezy, które pozwoliłyby na uzyskiwanie jak najwyższego stężenia komórek bakterii w płynie hodowlanym, to jest powyżej 18 g/l przy zastosowaniu szczepu bakterii ZB18 J26 Mut-15 należącego do rodzaju *Pseudomonas*, zdeponowanego w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego.

W sposobie według niniejszego wynalazku hodowle szczepu ZB 18 J26 Mut-15 prowadzi się w warunkach aerobowych w pożywce ciekłej, zawierającej metanol jako jedyne źródło węgla oraz następujące substancje nieorganiczne:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	— 0,25—0,4%
NH_4OH (do regul. pH)	— 0,25—0,4%
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	— 0,6—1,0%
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	— 0,06—0,01%
KCl	— 0,01—0,015%

	3	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,03—0,08%
CaCl ₂ ·6H ₂ O	—	0,01—0,03%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,001—0,003%
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	0,003—0,005%
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,0005—0,001%
MnSO ₄ ·4H ₂ O	—	0,0001—0,0004
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	—	0,000008—0,000012%
CoCl ₂ ·6H ₂ O	—	0,000012—0,000016%
H ₃ BO ₃	—	0,000008—0,000012%

Największe stężenie komórek bakterii w opisanym wynalazku uzyskuje się przez dodawanie metanolu i innych składników podłoża podczas hodowli w takich ilościach, które nie inhibują wzrostu bakterii w sposób, zapewniający najkorzystniejszą wydajność komórek z zastosowanych substratów. Metanol może być dodawany w sposób ciągły lub periodyczny do podłoża podczas hodowli. Jednakże ilość dodawanego metanolu nie może inhibować wzrostu mikroorganizmu.

Zalecane jest, aby stężenie metanolu w pożywce nie przekraczało 1% (v/v). Dopływ pozostałych składników pożywki, uzupełniającej zawartość odpowiednich soli nieorganicznych do wymaganego poziomu w sposobie według wynalazku jest zapewniony przez dobranie stężenia, szybkości dopływu wodnego roztworu soli i wody amoniakalnej odpowiednio do pożądanej wartości pH. Po zakończeniu hodowli, suspensja komórek jest wstępnie zagęszczona, wirowana i płukana w celu uzyskania biomasy bakteryjnej, przeznaczonej na cele paszowe.

Sposób według wynalazku wyjaśnia bliżej przykład:

Przykład. Naczynie fermentacyjne, stosowane do hodowli zapewnia następujące warunki:

objętość całkowita	6 litrów
objętość robocza	3 litry
ilość obrotów mieszadła	1500/min.
ilość powietrza	21 l/min.

W naczyniu fermentacyjnym przygotowuje się i wyławia 2,8 litrów pożywki o następującym składzie:

(NH ₄) ₂ SO ₄	—	9,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	—	4,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	0,4 g
KCl	—	0,02 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,1 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	—	0,06 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,06 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,002 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	—	0,0006 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	—	0,2·10 ⁻⁴ g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	—	0,3·10 ⁻⁴ g
H ₃ BO ₃	—	0,2·10 ⁻⁴ g
woda uzdatniona	—	2800 ml

Do wysterylizowanej i ochłodzonej pożywki dodaje się 8,8 ml metanolu. Inokulum — wyhodowane na wytrząsarce — o zawartości komórek około 1,5 mg/l dodaje się w ilości, równej 4—6% objętości pożywki. Hodowle prowadzi się z napowietrzaniem i mieszaniem w temperaturze 31°C, z regulacją pH w zakresie 6,55±0,05 i przy stężeniu metanolu 0,25%, oraz z ilością rozpuszczonego tlenu, przekraczającą 10% wartości nasycenia w tej temperaturze. Do automatycznej regulacji pH stosuje się 3 M roztwór amoniaku w ilości 200 ml. Z tą samą szybkością dozuje się roztwór soli mineralnych o następującym składzie:

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	—	20,0 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	2,0 g

	4	
KCl	—	0,27 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	1,33 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	—	0,46 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,003 g
5 CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	0,10 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,02 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	—	7,0·10 ⁻³ g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	—	3,0·10 ⁻⁴ g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	—	4,0·10 ⁻⁴ g
10 H ₃ BO ₃	—	3,0·10 ⁻⁴ g
woda uzdatniona	—	200 ml

Sposób przygotowania roztworu mikroelementów polega na rozpuszczeniu fosforanów w 3 M roztworze NH₄OH. Pozostałe składniki w roztworach wodnych miesza się w następującej kolejności: kwas borny, molibdenian sodu, chlorek kobaltu, siarczan manganu, siarczan cynku, chlorek potasu, chlorek wapnia, siarczan magnezu. Następnie ustala się pH do wartości 7,8 i wówczas dodaje się roztworu siarczynu miedziowego i siarczynu żelazowego. Przygotowany roztwór o wartości pH=6,5 poddaje się sterylizacji. Powyższy sposób gwarantuje uzyskanie roztworu soli mineralnych w formie rozpuszczalnej.

Po 36 godzinach hodowli otrzymuje się 20 g suchych komórek w 1 litrze płynu hodowlanego z ogólnie dodanego metanolu w ilości 20%. Wyhodowane komórki wydzielają się z płynu hodowlanego metodą wirówkową. Wyszuszone bakterie zawierają ponad 70% białka (Nx6,25) o następującym składzie aminokwasowym (g/100 g suchej masy komórek):

alanina	—	5,4
walina	—	4,2
glicyna	—	3,4
izoleucyna	—	2,9
35 leucyna	—	4,7
prolina	—	2,2
treonina	—	2,7
hydroksypolina	—	0,04
fenyloalanina	—	1,9
40 kwas glutaminowy	—	5,5
kwas asparaginowy	—	4,0
lizyna	—	3,8
metionina	—	1,5
seryna	—	1,9

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania bakteryjnej biomasy białkowej na drodze hodowli bakterii szczepu ZB 18 J26 Mut-15, należącego do rodzaju *Pseudomonas*, w płynnej pożywce, zawierającej metanol jako jedyne źródło węgla i energii, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę zawierającą 0,25—0,4% (NH₄)₂SO₄, 0,25—0,4% NH₄OH, 0,6—1,0% Na₂HPO₄·12H₂O, 0,06—0,1% NaH₂PO₄·H₂O, 0,01—0,015% KCl, 0,03—0,08% MgSO₄·7H₂O, 0,01—0,03% CaCl₂·6H₂O, 0,001—0,003% FeSO₄·7H₂O, 0,003—0,005% CuSO₄·5H₂O, 0,0006—0,001% ZnSO₄·7H₂O, 0,0001—0,0004% MnSO₄·4H₂O, 0,000008—0,000012% Na₂MoO₄·2H₂O, 0,000012—0,000016% CoCl₂·6H₂O, 0,000008—0,000012% H₃BO₃, przy czym proces prowadzi się przy pH, ustalonym w granicach 6—8 i temperaturze 25—35°C, a składniki mineralne dozuje się proporcjonalnie do azotu, zawartego w trójmolekowym roztworze amoniaku, stosowanym do regulacji pH środowiska hodowlanego.