



Patent dodatkowy  
do patentu \_\_\_\_\_

Zgłoszono: 05. VI. 1967 (P 120 930)

Pierwszeństwo: \_\_\_\_\_

Opublikowano: 9. V. 1970

Kl. 6 b, 16/03

MKP C 12 d 9/00

CZYTELNIA  
UKD

Urząd Patentowy

Współtwórcy wynalazku: mgr Tadeusz Szczesniak, mgr Leonard Karabin,  
mgr Danuta Kotiuszko, mgr Barbara Ostrowska,  
dr Marian Tyc, mgr Krystyna Wituch, mgr  
Jadwiga Wolf, Sławomir Ulikowski, Andrzej  
Korona, Romuald Szewczak, Jan Piorunowski,  
Barbara Sokołowska

Właściciel patentu: Instytut Antybiotyków, Warszawa (Polska)

## Sposób podpowierzchniowej hodowli mikroorganizmów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób podpowierzchniowej hodowli mikroorganizmów.

Dotychczas do podpowierzchniowej hodowli mikroorganizmów stosowano pożywki w skład których, jako źródło węgla lub jako środki przeciwpienne wchodziły tłuszcze roślinne i zwierzęce np. olej arachidowy, olej sojowy i smalec.

W przypadku pewnych procesów biosyntezy na pożywkach zawierających wymienione tłuszcze czas hodowli mikroorganizmów był stosunkowo długi.

Sposób według wynalazku eliminuje powyższe wady przez zastosowanie jako źródła węgla i/lub środka przeciwpennego w pożywkach, tłuszczu pożelatynowego. Sposobem tym skraca się czas hodowli mikroorganizmów oraz uzyskuje wyższe wydajności produktów biosyntezy niż przy konwencjonalnych metodach podpowierzchniowej hodowli.

Tłuszcz pożelatynowy jest tłuszczem otrzymywanym podczas jednego z etapów procesu technologicznego produkcji żelatyny. Jest zbierany z powierzchni bulionu w trakcie gotowania rozdrobnionych kości i mięsa.

Jako produkt uboczny otrzymywany przy produkcji żelatyny spożywczej, jest surowcem łatwo dostępnym, nie zawiera substancji toksycznych, natomiast obecne w nim śladowe ilości składników białkowych i niektórych witamin stymulują procesy wzrostu mikroorganizmów. Tłuszcz pożela-

2

tynowy charakteryzuje się następującą przybliżoną zawartością kwasów tłuszczowych o liczbie atomów węgla  $C_{14}-C_{20}$ :

$C_{14}H_{28}O_2$ —1,4%;  $C_{16}H_{32}O_2$ —23,5%;  $C_{16}H_{30}O_2$ —4,0%;  
5  $C_{16}H_{28}O_2$ —0,5%;  $C_{16}H_{26}O_2$ —0,5%;  $C_{18}H_{36}O_2$ —10,3%;  
 $C_{18}H_{34}O_2$ —55,0%;  $C_{18}H_{32}O_2$ —3,3%;  $C_{20}H_{38}O_2$ —1,5%.

W odróżnieniu od innych tłuszczów roślinnych i zwierzęcych tłuszcz pożelatynowy zawiera dodatkowo następujące nienasycone kwasy tłuszczowe:

10  $C_{16}H_{30}O_2$ —4,0%;  $C_{16}H_{28}O_2$ —0,5%;  $C_{16}H_{26}O_2$ —0,5%;  
 $C_{20}H_{38}O_2$ —1,5% i z tego względu jest surowcem

wykazującym zwiększoną czynność w procesach biologicznych. Powyższe procenty oznaczają pro-

15 centy wagowe. Ilościowy i jakościowy skład kwasów tłuszczowych w tłuszczu pożelatynowym i innych tłuszczach obrazuje tablica 1.

Dodatkową zaletą tego sposobu jest to, że tłuszcz pożelatynowy posiada silne własności przeciwpienne i tym samym ogranicza lub wyklucza całkowicie konieczność stosowania innych środków przeciwpennych podczas hodowli mikroorganizmów.

Sposób według wynalazku odnosi się zwłaszcza do procesów biosyntezy witamin i antybiotyków w których stosowane są mikroorganizmy: należący do klasy Ascomycetes, grzyb *Ashbya gossypii* wytwarzający ryboflawinę oraz należące do promieniowców gatunki *Streptomyces species 88* wytwarzający tetracyklinę i *Streptomyces erythreus* wy-

Tablica 1  
Ilościowy i jakościowy skład kwasów tłuszczowych w różnych tłuszczach

| Wzór sumaryczny kwasu tłuszczowego      | Zawartość kwasów tłuszczowych w procentach wagowych |                    |                |           |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|----------------|-----------|
|                                         | **) Tłuszcz pożelatynowy                            | *) Olej arachidowy | *) Olej sojowy | *) Smalec |
| $C_{14}H_{28}O_2$                       | 1,4                                                 | —                  | 0,0—0,6        | 0,7—4,7   |
| $C_{16}H_{32}O_2$                       | 23,5                                                | 4,0—8,5            | 11,2—14,3      | 24,3—30,8 |
| $C_{16}H_{30}O_2$                       | 4,0                                                 | —                  | —              | —         |
| $C_{16}H_{28}O_2$                       | 0,5                                                 | —                  | —              | —         |
| $C_{16}H_{26}O_2$                       | 0,5                                                 | —                  | —              | —         |
| $C_{18}H_{36}O_2$                       | 10,3                                                | 2,6—6,3            | 11,2—14,3      | 8,5—21,4  |
| $C_{18}H_{34}O_2$                       | 55,0                                                | 53,4—71,3          | 25,9—33,7      | 41,3—60,5 |
| $C_{18}H_{32}O_2$                       | 3,3                                                 | 13,0—27,4          | 52,0—58,8      | 0,8—13,0  |
| Kwasy wysoko nienasycone o 18 atomach C | —                                                   | —                  | 2,1—5,8        | —         |
| $C_{20}H_{38}O_2$                       | 1,5                                                 | —                  | —              | —         |

\*) — według Profic I., Stępniewski L., Smidtagal E., Zyss B., „Technologia tłuszczów”. Wydawnictwo Min. Przem. Lekkiego i Spoż., 1954 r. cz. I str. 48.

\*\*) — według analizy próbki wykonanej na zlecenie Instytutu Antybiotyków w Instytucie Przemysłu Tłuszczowego.

tworzący erytromycynę, *Streptomyces* species wytwarzający wiomycynę.

Sposób według wynalazku polega na podpo-  
wierzchniowej hodowli mikroorganizmów na po-  
żywkach zawierających tłuszcz jako źródło węgla  
i/lub środek przeciwpieenny. Jako tłuszcz stosuje  
się tłuszcz pożelatynowy w ilości 0,1—10,0% obję-  
tościowych w stosunku do ilości pożywki. Tłuszcz  
pożelatynowy wprowadza się do pożywki bezpo-  
średnio przed jej sterylizacją korzystnie w ilości  
0,1—6,0% objętościowych lub w sposób jałowy  
podczas hodowli mikroorganizmów korzystnie  
w ilości 0,1—5,0% objętościowych przy czym ilości  
procentowe odnoszą się do ilości pożywki.

Tłuszcz pożelatynowy wprowadza się do pożywki  
podczas hodowli mikroorganizmów pomiędzy 6—  
120 godziną hodowli.

Tłuszcz pożelatynowy dodawany bezpośrednio do  
pożywki jest źródłem węgla dla mikroorganizmów  
i w tym przypadku jest hydrolizowany do glice-  
ryny i kwasów tłuszczowych, a w następnych eta-  
pach metabolizmu składniki te zostają całkowicie  
zużyte.

Niezależnie od jego bezpośredniej roli odżywczej  
jako niejonowy związek powierzchniowo czynny  
powoduje obniżenie napięcia powierzchniowego po-  
między membranami komórkowymi i pożywką.  
W konsekwencji zmienia się przepuszczalność ścia-  
ny komórkowej i tym samym zwiększa się prze-  
nikanie innych składników pożywki do wnętrza  
komórki oraz zwiększa się także wydzielanie z ko-  
mórki do środowiska zewnętrznego produktów me-  
tabolizmu takich jak witaminy i antybiotyki.

Ponadto tłuszcz pożelatynowy obniżając napię-  
cie powierzchniowe płynnych pożywek zmniejsza  
również znacznie, względnie likwiduje całkowicie  
pienie się pożywek.

Tłuszcz pożelatynowy dodawany do pożywki  
podczas hodowli mikroorganizmów może spełniać  
jedną lub obie role opisane powyżej w konse-  
kwencji czego powoduje wystąpienie drugiego cy-  
klu wzrostu mikroorganizmów i wytwarzanie pro-  
duktów biosyntezy.

W przypadku stosowania tłuszczu pożelatynowe-  
go bezpośrednio do pożywki postępuje się nastę-  
pująco: do płynnych pożywek hodowlanych będą-  
cych roztworem lub zawiesiną nieorganicznych  
i organicznych składników pożywki, wprowadza  
się tłuszcz pożelatynowy w ilości 0,1—6,0% obję-  
tościowych w stosunku do ilości pożywki, nastą-  
wia pH do wartości 6,0—7,5 w zależności od zasto-  
sowanego mikroorganizmu i wyjaławia w tempe-  
raturze od 110—120°C w ciągu 30—200 minut.  
Schłodzone pożywki szczepi się zawiesiną odpo-  
wiedniego mikroorganizmu. W przypadku stosowa-  
nia tłuszczu pożelatynowego podczas hodowli jako  
źródła węgla i/lub środka przeciwpieennego, tłuszcz  
ten wprowadza się w sposób jałowy do kultur  
mikroorganizmów rosnących na pożywkach przy-  
gotowanych metodą wyżej opisaną, między 6—120  
godziną hodowli w ilości 0,1—5,0% objętościowych  
w stosunku do objętości pożywki.

Zwiększenie wydajności produktów biosyntezy  
w pożywkach zawierających tłuszcz pożelatyno-  
wy w stosunku do wydajności otrzymywanych  
w pożywkach z innymi tłuszczami, podczas ho-

dowli podpowierzchniowej mikroorganizmów przedstawiają szczegółowe przykłady, w których procenty oznaczają procenty wagowe o ile nie zaznaczono inaczej.

**Przykład I.** Przygotowywano płynną pożywkę do otrzymywania askospor grzyba *Ashbya gossypii* o składzie:

Glukoza czysta (100% suchej masy) 1,0%  
Tiamina HCl — (chlorowodorek tiaminy) 0,1%

Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do 100,0% objętościowych. (Woda drożdżowa — jest to wodny wyciąg z drożdży spożywczych; zawiera wolne aminokwasy, kwas mlekowy, kwas octowy i witaminy — tiaminę (B<sub>1</sub>), biotynę (H), pirydoksal (B<sub>6</sub>) oraz inne witaminy z zespołu B, a także niezoinozytol, związek, którego rola metaboliczna nie jest znana, a który jest niezbędny dla wzrostu i życia licznych mikroorganizmów).

Wartość pH pożywki nastawiano na 6,9 za pomocą wodorotlenku potasu. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano po 10 ml do probówek i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Probówki z pożywką szczepiono 5-dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Przygotowywano pożywkę stałą o następującym składzie:

Glukoza czysta (100% suchej masy) 2,0%  
Agar 2,0%

Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do 100,0% objętościowych.

Wartość pH pożywki nastawiano za pomocą wodorotlenku potasu do 7,2 i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Pożywkę rozlewano do płytek Petri'ego po 20 ml.

Pożywkę stałą szczepiono zawiesiną askospor wyhodowaną na pożywce płynnej. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 28° w ciągu 5 dni.

Otrzymane w ten sposób kolonie grzyba stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej I.

Przygotowano płynną pożywkę posiewową I o składzie:

Glukoza czysta (100% suchej masy) 1,0%  
Laktoza czysta (100% suchej masy) 0,3%  
Enzymatyczny hydrolizat maki rybnej 0,5%  
Woda drożdżowa (0,5% suchej masy) do 100,0% objętościowych.

Wartość pH pożywki nastawiano na 6,5 za pomocą wodorotlenku potasu, rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową I stadium szczepiono 5-dniową kolonią grzyba wyhodowaną na pożywce stałej.

Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, na trzęsawce obrotowej o 220 obr./min. i mimośrodzie 25 mm w temperaturze 28°C w ciągu 24 godzin.

Otrzymaną w ten sposób zawiesinę grzybní stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej II.

Przygotowywano płynną pożywkę posiewową II o składzie:

Drożdże paszowe 2,0%  
Olej sojowy 1,5%

objętościowych  
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) 3,0%

Woda wodociągowa do 100,0% objętościowych

Wartość pH pożywki nastawiano na 7,2 rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową II szczepiono 1 ml zawiesiny grzybní z płynnej pożywki posiewowej I.

Hodowlę prowadzono w ciągu 24 godzin w takich samych warunkach jak na płynnej pożywce posiewowej I.

Otrzymaną w ten sposób zawiesinę grzybní szczepiono płynną pożywkę produkcyjną.

Przygotowywano płynną pożywkę produkcyjną o składzie:

Żelatyna 3,0%  
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) 6,0%  
Glicyna 0,15%  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15%  
Mg<sup>++</sup> 1 µg/ml  
Co<sup>++</sup> 2 µg/ml  
Mn<sup>++</sup> 5 µg/ml  
Zn<sup>++</sup> 10 µg/ml

Wartość pH pożywki nastawiano na 6,8 za pomocą wodorotlenku potasu.

Pożywkę rozlewano po 30 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i rozlewano na cztery partie. Do każdej kolby z określonej partii pożywki dodawano tylko jeden z tłuszczów, odpowiednio olej arachidowy, olej sojowy, smalec i tłuszcz pożelatynowy.

Tłuszcze dodawano w ilości 4,0% objętościowych. Wszystkie pożywki wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 3 godzin.

Każdą kolbę z pożywką szczepiono 1 ml zawiesiny grzybní z płynnej pożywki posiewowej II.

Hodowlę prowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu na trzęsawce obrotowej o 220 obr./min. i mimośrodku 25 mm w temperaturze 28° w ciągu 168 godzin.

Zawartość ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) w pożywkach z różnymi tłuszczami po 168 godzinach hodowli *Ashbya gossypii* przedstawione są w tablicy II.

Tablica II

| Pożywka zawierająca |             |           |                      |
|---------------------|-------------|-----------|----------------------|
| Olej arachidowy     | Olej sojowy | Smalec    | Tłuszcz pożelatynowy |
| 2020 µg/ml          | 2201 µg/ml  | 870 µg/ml | 2419 µg/ml           |

Jak wykazano wyżej tłuszcz pożelatynowy dodany bezpośrednio do pożywki hodowlanej — produkcyjnej wpływa na zwiększenie wydajności ryboflawiny w porównaniu z wydajnościami otrzymanymi w pożywkach z innymi tłuszczami.

Przykład II. Skład jakościowy i ilościowy pożywek, sposób ich przygotowywania oraz sposób przeszczepiania i warunki hodowli *Ashbya gossypii* były takie same jak w przykładzie I.

Do poszczególnych partii kolb z płynnymi pożywkami produkcyjnymi zawierającymi jeden z badanych tłuszczów w ilości 4,0% objętościowych dodawano odpowiednio taki sam tłuszcz w ilości 2,5% objętościowych w 72 godzinie hodowli *Ashbya gossypii*.

Zawartość ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) w pożywkach z różnymi tłuszczami po 168 godzinach hodowli *Ashbya gossypii* przedstawione są w tabelicy III.

Tablica III

| Pożywka zawierająca |             |           |                      |
|---------------------|-------------|-----------|----------------------|
| Olej arachidowy     | Olej sojowy | Smalec    | Tłuszcz pożelatynowy |
| 3105 µg/ml          | 3183 µg/ml  | 858 µg/ml | 3325 µg/ml           |

Jak wykazano wyżej tłuszcz pożelatynowy dodany do pożywki w 72 godzinie hodowli *Ashbya gossypii* wpływa na zwiększenie wydajności ryboflawiny w porównaniu z wydajnościami otrzymanymi w pożywkach z innymi tłuszczami.

Przykład III. Skład jakościowy i ilościowy pożywek, sposób ich przygotowywania oraz sposób przeszczepiania i warunki hodowli *Ashbya gossypii* były takie same jak w przykładzie I.

Do poszczególnych partii kolb z płynnymi pożywkami produkcyjnymi zawierającymi jeden z badanych tłuszczów w ilości 4,0% objętościowych dodawano odpowiednio taki sam tłuszcz w ilości 2,5% objętościowych w 72 i 120 godzinie hodowli *Ashbya gossypii*.

Zawartości ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) w pożywkach z różnymi tłuszczami po 168 godzinach hodowli *Ashbya gossypii* przedstawione są w tabelicy IV.

Tablica IV

| Pożywka zawierająca |             |           |                      |
|---------------------|-------------|-----------|----------------------|
| Olej arachidowy     | Olej sojowy | Smalec    | Tłuszcz pożelatynowy |
| 2857 µg/ml          | 3349 µg/ml  | 923 µg/ml | 3781 µg/ml           |

Jak wykazano wyżej tłuszcz pożelatynowy dodany do pożywki w 72 i 120 godzinie hodowli *Ashbya gossypii* wpływa na zwiększenie wydajności ryboflawiny w porównaniu z wydajnościami otrzymanymi w pożywkach z innymi tłuszczami.

Przykład IV. Do kolb Erlenmayer'a o pojemności 500 ml, zawierających po 50 ml pożywki o składzie niżej podanym, przeniesiono zarodniki szczepu *Streptomyces species* 106, zebrane oczkiem ezy z hodowli agarowej.

Skład pożywki posiewowej i produkcyjnej:

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Mąka sojowa                  | 3,0% |
| Glukoza techniczna           | 3,0% |
| Skrobia                      | 1,0% |
| NaNO <sub>3</sub> techniczny | 1,0% |
| CaCO <sub>3</sub>            | 0,3% |

Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy)

0,5%

Olej sojowy (lub olej arachidowy lub tłuszcz pożelatynowy)

2,0%

Woda wodociągowa ad 100%

Pożywkę sterylizowano w temperaturze 117° w ciągu 30 minut przy wartości pH = 6,6—6,8 po sterylizacji.

Zaszczepione pożywki w kolbach umieszczono na trzaskawce obrotowej o 220 obr./min. Hodowlę prowadzono w temperaturze 27—29° w ciągu 42—46 godzin. Otrzymana hodowla (stadium posiewowe) służyła jako inoculum do szczepienia pożywek stadium produkcyjnego. Do kolb produkcyjnych dodano inoculum w ilości 1—4% w stosunku do objętości pożywki. Warunki fermentacji stadium produkcyjnego były takie same jak stadium posiewowego. Czas potrzebny do uzyskania maksymalnej wydajności antybiotyku w brzeczce fermentacyjnej wynosił 115—140 godzin.

Zależność między stężeniem wiomycyny w brzeczce pofermentacyjnej i rodzajem użytego tłuszczu przedstawia tablica V.

Tablica V

| Pożywka zawierająca |                 |                      |
|---------------------|-----------------|----------------------|
| Olej sojowy         | Olej arachidowy | Tłuszcz pożelatynowy |
| 2600 µg/ml          | 2400 µg/ml      | 2600 µg/ml           |

Przykład V. Przygotowywano pożywkę stałą do otrzymywania zarodników *Streptomyces species* 88 o składzie:

|                |      |
|----------------|------|
| Płatki owsiane | 2,0% |
| Agar           | 1,8% |

Woda wodociągowa do 100,0%

Wartość pH pożywki nastawiano na 7,0 za pomocą wodorotlenku sodu. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano po 10 ml do probówek i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut. Probówki z pożywką szczepiono zarodnikami *Streptomyces species* 88 wyhodowanymi na takiej samej pożywce.

Inkubację przeprowadzono w temperaturze 28° w ciągu 7 dni.

Otrzymane w ten sposób zarodniki stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej.

Przygotowywano płynną pożywkę posiewową o składzie:

|              |      |
|--------------|------|
| Mąka owsiana | 1,0% |
| Skrobia      | 2,5% |

Wyciąg namokowy kukurydzy (100,0% suchej masy) 0,6%  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,4%  
 $\text{CaCO}_3$  0,5%  
 Woda wodociągowa do 100,0%  
 Wartość pH pożywki nastawiano na 6,8 za pomocą wodorotlenku sodu, rozlewano po 30 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową szczepiono zarodnikami pobranymi z pożywki stałej.

Hodowlę prowadzono na trzęsawce obrotowej o 220 obr./min. i mimośrodku 25 mm w temperaturze 28° w ciągu 24 godzin.

Otrzymaną w ten sposób zawieszinę grzybni stosowano do szczepienia płynnej pożywki produkcyjnej.

Przygotowywano płynną pożywkę produkcyjną o składzie:

Mąka arachidowa 2,0%  
 Mąka ziemniaczana 2,0%  
 Mąka owsiana 2,0%  
 Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) 1,25%  
 $\text{CaCO}_3$  0,4%  
 $\text{NaCl}$  0,2%  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,5%  
 Woda wodociągowa do 100,0%

Wartość pH pożywki nastawiano na 7,2 za pomocą wodorotlenku sodu.

Pożywkę rozlewano po 30 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i rozdzielano na cztery partie. Do każdej kolby z określonej partii pożywki dodawano tylko jeden z tłuszczów, odpowiednio olej arachidowy, olej sojowy, smalec i tłuszcz pożelatynowy. Tłuszcze dodawano w ilości 1,0% objętościowego w stosunku do ilości pożywki.

Wszystkie pożywki wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z pożywką szczepiono 3 ml zawiesziny grzybni z płynnej pożywki posiewowej.

Hodowlę prowadzono na trzęsawce obrotowej o 220 obr./min. i mimośrodku 25 mm w temperaturze 28° w ciągu 42 godzin.

Zawartości tetracykliny w pożywkach z różnymi tłuszczami po 42 godzinach hodowli *Streptomyces* species 88 przedstawione są w tablicy VI.

Tablica VI

| Pożywka zawierająca |             |            |                      |
|---------------------|-------------|------------|----------------------|
| Olej arachidowy     | Olej sojowy | Smalec     | Tłuszcz pożelatynowy |
| 2211 µg/ml          | 2281 µg/ml  | 2018 µg/ml | 2326 µg/ml           |

Jak wykazano wyżej tłuszcz pożelatynowy dodawany bezpośrednio do płynnej pożywki produkcyjnej wpływa na zwiększenie wydajności te-

tracykliny w porównaniu z wydajnościami otrzymanymi w pożywkach z innymi tłuszczami.

Przykład VI. Przygotowywano pożywkę stałą do otrzymywania zarodników *Streptomyces erythreus* o składzie:

Wyciąg drożdżowy 1,0%  
 Wyciąg mięsny 1,0%  
 Pankreatyczny hydrolizat kazeiny 2,0%  
 Laktoza 0,2%  
 Agar 2,5%  
 Woda destylowana do 100,0%

Wartość pH pożywki nastawiano na 7,5 za pomocą wodorotlenku sodu. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano po 10 ml do probówek i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Probówki z pożywką, szczepiono zarodnikami *Streptomyces erythreus* wyhodowanymi na takiej samej pożywce.

Inkubację przeprowadzano w temperaturze 30° w ciągu 6 dni.

Otrzymane w ten sposób zarodniki stosowano do szczepienia płynnej pożywki posiewowej.

Przygotowywano płynną pożywkę posiewową o składzie:

Sacharoza 3,0%  
 Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) 3,0%  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,4%  
 $\text{CaCO}_3$  0,6%  
 Woda wodociągowa do 100,0%

Wartość pH pożywki nastawiano na 6,5 za pomocą wodorotlenku sodu rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z płynną pożywką posiewową szczepiono zarodnikami pobranymi z pożywki stałej.

Hodowlę prowadzono na trzęsawce obrotowej o 220 obr./min. i mimośrodku 25 mm w temperaturze 32° w ciągu 48 godzin.

Otrzymaną w ten sposób zawieszinę grzybni stosowano do szczepienia płynnej pożywki produkcyjnej.

Przygotowywano płynną pożywkę produkcyjną o składzie:

Mąka sojowa 3,0%  
 Skrobia 2,0%  
 Glukoza 4,0%  
 $\text{NaCl}$  0,5%  
 $\text{CaCO}_3$  0,6%  
 Alkohol propylowy 0,9%  
 Woda wodociągowa do 100,0%

Wartość pH pożywki nastawiano na 7,5 za pomocą wodorotlenku sodu.

Pożywkę rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i rozdzielano na dwie partie. Do każdej kolby z określonej partii pożywki dodawano tylko jeden z tłuszczów, odpowiednio olej sojowy i tłuszcz pożelatynowy. Tłuszcze dodawano w ilości 0,8% objętościowych w stosunku do ilości pożywki.

Wszystkie pożywki wyjaławiano w temperaturze 110° w ciągu 30 minut.

Każdą kolbę z pożywką szczepiono 5 ml zawiesiny grzybni z płynnej pożywki posiewowej.

Hodowlę przeprowadzano na trzęsawce obrotowej o 220 obr./min. i mimośrodzie 25 mm w temperaturze 32° w ciągu 120 godzin.

Zawartości erytromycyny w pożywkach z olejem sojowym i tłuszczem pożelatynowym po 120 godzinach hodowli *Streptomyces erythreus* przedstawione są w tablicy VII.

Tablica VII

| Pożywka zawierająca |                      |
|---------------------|----------------------|
| Olej sojowy         | Tłuszcz pożelatynowy |
| 2393 µg/ml          | 2612 µg/ml           |

Jak wykazano wyżej tłuszcz pożelatynowy dodawany bezpośrednio do płynnej pożywki produkcyjnej wpływa na zwiększenie wydajności erytromycyny w porównaniu z wydajnościami otrzymywanymi w pożywce z olejem sojowym.

# Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób podpowierzchniowej hodowli mikroorganizmów na pożywkach zawierających tłuszcz jako źródło węgla i/lub środek przeciwpienienny **znamienny tym**, że jako tłuszcz stosuje się tłuszcz pożelatynowy w ilości 0,1—10,0% objętościowych w stosunku do ilości pożywki.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że tłuszcz pożelatynowy wprowadza się do pożywki bezpośrednio przed jej sterylizacją w ilości 0,1—6,0% objętościowych lub w sposób jałowy podczas hodowli mikroorganizmów w ilości 0,1—5,0% objętościowych w stosunku do ilości pożywki.
3. Sposób według zastrz. 1, 2 **znamienny tym**, że tłuszcz pożelatynowy wprowadza się do pożywki podczas hodowli mikroorganizmów pomiędzy 6—120 godziną hodowli.