

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к микробиологической и смежным отраслям промышленности, и может быть использовано при производстве продуктов микробиологического синтеза - кормовых добавок, пищевым и лекарственным препаратам, получаемых глубинным культивированием микроорганизмов, а также для исследовательских целей.

В настоящее время в биотехнологии известны способы, предусматривающие использование различных питательных добавок, пеногасителей в процессе культивирования микроорганизмов при получении продуктов микробного синтеза.

При этом известные способы предусматривают использование при культивировании микроорганизмов в качестве источников питания, пеногасителей различных веществ и составов природного происхождения, а также синтетических соединений.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является микробиологический процесс - способ получения продуктов микробиологического синтеза, включающий глубинное культивирование микроорганизмов на среде, содержащей питательные компоненты, и предусматривающий пеногашение, при этом в качестве пеногасителей и питательных добавок используют жиры. Однако, при осуществлении такого процесса используемые жиры по композиционному составу, количественному содержанию и последовательности добавления в процессе получения целевого продукта не позволяют реализовать их многосторонние полезные свойства в оптимальных функциональных возможностях одновременно по антивспенивающему, пеногасящему питательному воздействию. Перечисленные причины не позволяют при получении продуктов микробиологического синтеза известным способом обеспечить интенсивный массообмен и, решить задачу повышения выхода продукта до 110-150%.

Как видно из вышесказанного в наиболее близком к заявляемому изобретению способе, и во всех других известных способах невозможно осуществить процесс получения целевого продукта на основе микробиологического синтеза с достижением одновременно оптимального массообмена, максимально возможного коэффициента конверсии питательных веществ в целевой продукт.

В основу заявляемого изобретения поставлена задача разработки технологического процесса - способа получения продуктов микробиологического синтеза, в котором в результате возможности комплексного пенорегулирования процесса по антивспенивающему и пеногасящему факторам при одновременном обеспечении культуры микроорганизмов питательными компонентами путем внесения в определенной последовательности и в особых концентрациях единой антивспенивающей, пеногасящей и питательной композиции обеспечивается интенсивный массообмен в процессе культивирования микроорганизмов, который характеризуется конкретными параметрами: повышением коэффициента конверсии питательных веществ в целевой продукт на 5-20%, повышением концентрации целевого продукта в культуральной жидкости на 10-40% и за счет этого - увеличение выхода готового продукта на 10-40%.

Поставленная задача решается тем, что по способу получения продуктов микробиологического синтеза, который предусматривает глубинное культивирование микроорганизмов на среде, содержащей питательные компоненты, и пеногасящие, согласно изобретению в процессе культивирования микроорганизмов осуществляют внесение питательных веществ одновременно с комплексным пенорегулированием процесса путем использования в качестве единой питательной, антивспенивающей и пеногасящей добавки биолипидной композиции (БЛК) на основе природных фосфолипидов, их лизоформ, триглицеридов жирных кислот и омыленных жирных кислот. Такой питательный и пенорегулирующий комплекс используют при получении продуктов микробиологического синтеза следующим образом: как источник питания, ростовых факторов и антивспениватель добавляют в исходную питательную среду до внесения в нее посевного материала и/или одновременно с ним в количестве 0,1-2,5% от объема питательной среды, а при использовании БЛК в качестве источника питания, ростовых факторов и пеногасителя ее вносят в культуральную среду в процессе культивирования микроорганизмов при интенсивном пенообразовании в количестве 0,1-5,0% от объема среды. Согласно заявляемому способу БЛК в исходную питательную среду вносят как антивспениватель для предотвращения пенообразования на первых стадиях культивирования микроорганизмов и одновременно как дополнительный источник питания. При интенсивном пенообразовании в процессе культивирования БЛК вносят в ферментационную среду для пеногашения и питания культуры в количествах, позволяющих обеспечить интенсивный массообмен в слое пены оптимального уровня.

Согласно заявляемому способу БЛК используют в виде стабилизированной эмульсии, при этом биолипидную основу в ней составляют природные фосфолипиды-фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, их лизоформы, триглицериды жирных кислот и омыленные жирные кислоты (пальмитиновая, олеиновая, линолевая), в количестве 10-30 об.% взвешенных в воде (70-90 об.%).

В качестве стабилизатора эмульсии биолипидной композиции используют 0,1-1,5% раствор омыленных жирных кислот. При этом стабилизирующие компоненты эмульсии БЛК также являются пенорегулирующими и питательными составляющими элементами предлагаемой композиции.

За счет введения новых признаков -использование одновременно в качестве дополнительного источника питания, ростовых факторов, антивспенивателя и пеногасителя биолипидной композиции в виде эмульсии, содержащей природный фосфолипиды, их лизоформы, а также триглицериды жирных кислот и омыленные жирные кислоты с внесением ее в определенные периоды процесса ферментации, способ приобрел новые свойства, изменив характер функционирования, а именно: одновременно в оптимальном сочетании проявляются питательные и пенорегулирующие свойства.

Совокупность всех признаков заявляемого способа, в т.ч. за счет новых признаков - введения в определенные периоды процесса получения целевого продукта микробиологического синтеза (до внесения посевного материала и/или одновременно с ним и в процессе культивирования) и в определенных количествах БЛК на основе природных фосфолипидов, их лизоформ, триглицеридов жирных кислот и омыленных жирных кислот позволяет заявляемому способу в сравнении с существующими технологиями приобрести новые функциональные свойства: возможность регулирования пенообразования в процессе

культивирования и оптимального обеспечения микроорганизмов сбалансированным по составу источником питания. При осуществлении процесса согласно заявляемому способу создается оптимальный уровень слоя пены, обеспечивающий интенсивный массообмен, который в сочетании с полноценным сбалансированным питанием определяет оптимальные условия для развития и роста культуры.

Пределы концентраций фосфолипидов, их лизоформ, триглицеридов жирных кислот и омыленных жирных кислот согласно заявляемому способу позволяют осуществлять необходимое количественное варьирование добавляемой БЛК в процессе культивирования микроорганизмов для максимального использования потенциальных возможностей ее питательных и пеногасящих свойств. На первых стадиях процесса культивирования этот состав проявляет антивспенивающие и питательные свойства. При этом использование БЛК в количестве менее 0,1 % от объема питательной среды не обеспечивает пенорегулирующего действия - в малых количествах недостаточно его антивспенивающее начало, в количествах более 2,5% от объема питательной среды наблюдается повышенная ассимиляция микроорганизмами БЛК в соответствующей интенсификацией пенообразования в начальной стадии процесса. При введении БЛК согласно заявляемому изобретению в исходную питательную среду с самого начала ферментацию осуществляют при оптимальном уровне пены, обеспечивающем интенсивный массообмен, необходимый для дыхания, роста и развития микроорганизмов, образования целевого продукта. При добавлении БЛК в процессе культивирования микроорганизмов, биосинтеза целевого продукта осуществляется дополнительное обеспечение микроорганизмов питательными веществами и активное пенорегулирование, причем пеногасящим эффектом обладают в большей степени лизоформы фосфолипидов за счет их большей полярности.

Использование БЛК при ферментации в качестве пеногасителя и дополнительного источника питания в выбранных пределах концентраций 0,1-5,0% от объема культуральной жидкости обосновано физиологическими свойствами микроорганизмов-продуцентов.

Выбранные концентрации водных эмульсий БЛК 10-30% обусловлены требуемой для промышленного осуществления способа устойчивостью эмульсий,

Таким образом вышеизложенное позволяет сделать вывод, что заявляемый способ обладает новизной.

Для оценки и подтверждения промышленной применимости предлагаемого способа проведены опытно-промышленные испытания.

Сущность заявляемого способа иллюстрирована следующими примерами.

Пример 1. Культивирование микроорганизмов осуществляют в ферментере емкостью 100 м³ на стерильной питательной среде (45 м³), содержащей 9,0 т (20%) свеклосахарной мелассы; 3,6 т (8%) смеси гидролизатов кукурузного экстракта и культуральной жидкости лейцина; 0,52 т (1,15%) хлористого аммония; 0,026 т (0,057%) двузамещенного фосфата аммония и 0,5 т (1,1 %) эмульсии биолипидной композиции. Проводят биосинтез лизина с использованием культуры микроорганизма-продуцента *Brevibacterium* sp. "ВНИИГенетика-90", который хранится в Центральном музее промышленных микроорганизмов института "ВНИИГенетика" и имеет регистрационный номер ВКПМ В-5593.

Эмульсию биолипидной композиции готовят следующим образом: в реактор с мешалкой загружают 11 т воды, добавляют стабилизатор эмульсии - омыленные жирные кислоты (например soapstock из расчета получения 1,5%-ного раствора) и перемешивают в течение 30 мин, после чего добавляют 4,0 т фосфолипидов (фосфатидилхолин, фос-фатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин) и их лизоформ, например в виде концентрата фосфатидов пищевых, второй сорт по ТУ 10-02-04-59-89. После чего смесь тщательно перемешивают в течение 60 мин. Получают 15,0 т 26%-ной биолипидной эмульсии.

В качестве посевного материала используют 24-часовую культуру продуцента в количестве 5 м³, выращенную на питательной среде с 7% мелассы, 7% смеси гидролизатов кукурузного экстракта и культуральной жидкости лейцина.

Ферментацию проводят в асептических условиях при 32°C, непрерывной аэрации и перемешивании воздухом в количестве 5 м на 1 м культуральной жидкости, при pH среды в пределах 7,3-7,5, давлении в аппарате 0,2-0,5 атм. Регулирование пенообразования осуществляют путем добавления в ферментер стерильной биолипидной эмульсии порциями (открытие клапана линии подачи пеногасителя при срабатывании датчика объема пены) в периоды интенсивного пенообразования. Процесс биосинтеза ведут 60 ч. С 40-го часа роста культуры добавляют сахаросодержащую подпитку с 45% мелассы. Получают 65 м³ культуральной жидкости с содержанием лизина 68 г/л, что выше контрольных значений на 23,6% коэффициент конверсии Сахаров (по РВ) в лизин 0,41.

Суммарный расход биолипидной эмульсии на операцию составил 0,85 т.

Пример 2. Осуществляют биосинтез лизина с помощью культуры микроорганизма *Brevibacterium* sp. "ВНИИГенетика-90", как описано в примере 1.

Для приготовления 15 т эмульсии биолипидной композиции в качестве стабилизатора используют 30 кг хозяйственного мыла.

Пенорегулирование осуществляют путем внесения БЛК в количестве 0,1 т 26%-ной эмульсии, загружаемой в 100 м ферментер одновременно с посевным материалом, а также в процессе ферментации, как описано в примере 1.

Получают 70 м культуральной жидкости с содержанием лизина 65 г/л, что выше контрольных значений на 18%, коэффициент конверсии Сахаров (по РВ) в лизин 0,39.

Суммарный расход биолипидной эмульсии на операцию составил 0,55 т.

Пример 3. Проводят ферментацию рибоксина с использованием штамма *Bacillus subtilis* "ВНИИГенетика-72", который хранится в Центральном музее промышленных микроорганизмов института "ВНИИГенетика" и имеет регистрационный номер ЦМГМ В-3157. Культуру штамма, выращенную в течение 24 ч при 37°C на агаризованной среде Хоттингера, переносят в жидкую посевную среду следующего состава, %: глюкоза техническая 2,0; БВК 2,0. NaCl 0,25; вода остальное. Посевной материал выращивают в посевном аппарате в течение 20 ч при 34°C. Инокулят в количестве 2 об.% передают в ферментационную среду следующего

состава, %: глюкоза техническая 14,0; БВК 2,5; NH_4NO_3 2,5; мел 2,5; биолипидная композиция 0,1. Ферментацию проводят в аппаратах емкостью 250 л с турбинной мешалкой, число оборотов 400 об/мин, расход воздуха $10 \text{ м}^3/\text{ч}$, при температуре 34°C . Продуктивность рибоксина после 70 ч ферментации составила 28 г/л, выход рибоксина 0,21 (по глюкозе), что превышает контрольные значения на 27,3%. Суммарный расход биолипидной эмульсии, включая добавление ее в процессе выращивания культуры, составил 3,0 л.

Пример 4. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* LK-22 выращивают в лабораторных ферментерах с полезным объемом 20 л при температуре 37°C и pH среды 4,1, расходе воздуха $0,01 \text{ м}^3/\text{мин}$ и скорости мешалки 400 об/мин. В качестве питательной среды используют 10% мелассную среду, содержащую диаммонийфосфат и хлористый калий. В питательную среду добавляют 1,0% БЛК. В течение всей ферментации израсходовано 2% БЛК от объема культуральной жидкости. Конечная концентрация дрожжей - 60 г/л.

Обобщенные результаты, полученные при осуществлении заявляемого способа в опытно-промышленных условиях, приведены в таблице.

Анализ результатов, приведенных в таблице, подтверждает достижение технического результата при получении продуктов микробиологического синтеза заявляемым способом.

Сравнительная характеристика технологических показателей заявляемого и известных способов

Пример	Культура микроорганизма и продолжительность ферментации, ч	Способ получения продукта	Коэффициент конверсии	Содержание целевого продукта в КЖ, г/л	Съем целевого продукта с одного аппарата, кг
1	<i>Brevibacterium</i> sp. "ВНИИГенетика-90". 60 час	Заявляемый	0,41	68	4420
2	<i>Brevibacterium</i> sp. "ВНИИГенетика-90". 65 час	Заявляемый	0,39	65	4550

Продолжение таблицы

Пример	Культура микроорганизма и продолжительность ферментации, ч	Способ получения продукта	Коэффициент конверсии	Содержание целевого продукта в КЖ, г/л	Съем целевого продукта с одного аппарата, кг
3	<i>Brevibacterium</i> sp. "ВНИИГенетика-90". 70 час. – контроль	Известный	0,36	55	3850
	<i>Bacillus subtilis</i> "ВНИИГенетика-72". 70 час.	Заявляемый	0,21	28	4,200
4	<i>Bacillus subtilis</i> "ВНИИГенетика-72". 75 час.	Известный	0,18	22	3,300
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LK – 22	Заявляемый	–	60	0,900
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LK – 22	Известный	–	55	0,825