



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 20537

(13) C2

(51) 6 C12P7/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ БІОСИНТЕЗУ L - ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ

1

(21) 95125214

(22) 11 12 1995

(24) 15 11 2002

(46) 15 11 2002, Бюл №11, 2002 р

(72) Олійничук Сергій Тимофійович, Вакуленко Володимир Олексійович, Шевченко Василь Іванович

(73) Український науково-дослідний інститут спирту і біотехнології продовольчих продуктів

(56) Еникеев ЭШ Влияние солей фосфора на биосинтез глутаминовой кислоты. НТИСС ВНИИ-СЭНТИ «Передовой производственный опыт в медицинской промышленности рекомендованный для внедрения», 1991, вып 11-12, С 1-15

(57) Способ биосинтеза L-глутаминовой кислоты путем культивирования *Corynebacterium glutamicum* 3144, включающий приготовление посевной среды с использованием мелассы и питатель-

2

ных солей, выращивание посевного материала в инокуляторе и собственно ферментацию в асептических, аэробных условиях с дробным добавлением в ферментер мочевины и источника углерода, отличающийся тем, что стадию выращивания посевного материала совмещают со стадией ферментации и осуществляют в одном аппарате, при этом мелассу, предназначенную для биосинтеза глутаминовой кислоты, делят в соотношении 1:5, в меньшую часть мелассы вносят все количество питательных солей, разбавляют водой до концентрации 4 - 6% сухого вещества и используют для выращивания культуры до достижения фазы замедления роста, после чего остальную часть мелассы вводят в ферментер с периодичностью, обеспечивающей содержание сухих веществ в среде 4 - 6%

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к микробиологическому синтезу глутаминовой кислоты

Известен способ биосинтеза глутаминовой кислоты (Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов /В А Быков, И Н Крылов, М Н Манаков и др //Биотехнология, 1987 № 6), предусматривающий получение посевного материала, приготовление питательной среды, ее стерилизацию, охлаждение и засев готовым посевным материалом, выращивание продуцента в ферментере до накопления максимального количества глутаминовой кислоты.

Процесс биосинтеза ведут на питательной среде с содержанием мелассы до 20%, мочевины до 2% в течение 48 - 52ч и при интенсивной аэрации с расходом воздуха 1 объем на 1 объем среды в мин

Готовая культуральная жидкость содержит до 45г/дм<sup>3</sup> глутаминовой кислоты, выход ее по отношению к потребленным сахарам составляет 45 - 50%

Наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату является способ биосинтеза L-глутаминовой кислоты (Еникеев ЭШ Влияние солей фосфора на

биосинтез глутаминовой кислоты НТИСС ВНИИ-СЭНТИ "Передовой производственный опыт в медицинской промышленности рекомендованный для внедрения", 1991, вып 11 - 12, С 1 - 5), включающий получение посевного материала, приготовление питательной среды, ее стерилизацию, охлаждение и засев готовым посевным материалом, выращивание продуцента и ферментацию с периодической подпиткой источником углерода - 50%-ный раствор мелассы и раствором солей фосфора. Исходная концентрация мелассы в ферментационной среде составляет 20%. В результате применения такого способа биосинтеза глутаминовой кислоты сокращает фазу роста культуры и повышение скорости биосинтеза глутаминовой кислоты.

Причиной, препятствующей дальнейшему повышению продуктивности процесса по глутаминовой кислоте, является ингибирование культуры избытком питательного субстрата в первые 48 часов ферментации, что снижает выход глутаминовой кислоты и экономический коэффициент использования углеводов и удлиняет продолжительность процесса ферментации. Кроме того, высокая концентрация углеводов в среде в сочетании с повышенным содержанием биотина спо-

(13) C2

(11) 20537

(19) UA

способствует увеличению расхода углеводов на построение клеточной биомассы

Задачей изобретения является усовершенствование известного способа получения глутаминовой кислоты путем создания оптимальных условий для выращивания культуры *Corynebacterium glutamicum* 3144 и продуцирования ею целевого продукта

Техническим результатом использования предлагаемого изобретения является повышение биосинтетической активности культуры *Corynebacterium glutamicum* 3144 Потребительские свойства объекта изобретения, связанные с техническим результатом - повышение выхода целевого продукта и снижение его себестоимости за счет уменьшения углеводов на построение бактериальной биомассы

Достигается технический результат тем, что в известном способе, включающем приготовление посевной среды с использованием мелассы и питательных солей, выращивание посевного материала в инокуляторе и собственно ферментацию в асептических, аэробных условиях с дробным добавлением в ферментер мочевины и источников углерода, стадию выращивания посевного материала совмещают со стадией ферментации и осуществляют в одном аппарате, при этом мелассу, предназначенную для биосинтеза L-глутаминовой кислоты, делят в соотношении 1:5, в меньшую часть мелассы вносят все количество питательных солей, разбавляют водой до концентрации 4 - 6% сухих веществ и используют для выращивания культуры до достижения фазы замедления роста, после чего остальную часть мелассы вводят в ферментер каждые 3 часа в количестве, обеспечивающем содержание сухих веществ в ферментационной среде 4 - 6%

Предложенный в заявленном техническом решении неизвестный в микробиологии прием - совмещение в одном аппарате стадии выращивания посевного материала и собственно ферментации обеспечивает возможность приготовления посевной среды в объеме 75 - 80% от рабочего объема ферментера, снижения концентрации углеводов на фоне повышенных концентраций аммонийного азота, ведение подпитки при ферментации концентрированным источником углерода и поддержание концентрации сухих веществ в процессе 4 - 6%

Деление мелассы в соотношении 1:5 дает возможность из одной меньшей части приготовить необходимый объем (75 - 80%) мелассного сусла концентрацией 4 - 6%, а рабочий ввод большей части мелассы позволяет поддерживать указанную концентрацию сухих веществ на протяжении всего процесса биосинтеза глутаминовой кислоты

Концентрация сусла менее 4 % СВ (2% сахара

) лимитирует рост культуры недостатком источника углерода и замедляет процесс накопления бактериальной биомассы, повышение концентрации сусла более 6% СВ ведет к непроизводительным потерям сахара на построение биомассы и поддержание жизнедеятельности культуры

Концентрация сусла в заявляемых пределах 4 - 6% СВ на стадии выращивания посевного материала и на стадии ферментации является наиболее оптимальной, обеспечивает соотношение углерод-азот в среде 18 - 20:1, при котором культура находится в состоянии разобщенного роста и поддерживается высокая скорость катаболических реакций синтеза глутаминовой кислоты

Использование предложенных микробиологических и технологических приемов и параметров в сочетании с известными позволяет создать оптимальные условия жизнедеятельности продуцента целевого продукта и за счет этого повысить биосинтетическую активность культуры

Предлагаемый способ осуществляет следующим образом. Для ферментера с рабочим объемом 7,5 дм<sup>3</sup> и при концентрации сусла 20% СВ берут 2062г мелассы, делят ее в соотношении 3:75 и 1687г. В первую часть (375г) вносят все ингредиенты питательной среды и растворяют водой до объема 6,0 дм<sup>3</sup> и концентрации сухих веществ 4 - 6%. Полученное сусло стерилизуют, засевают культурой *Corynebacterium glutamicum* 3144 в количестве 2,5 об.% и ведут ее выращивание в течение 14 - 18 часов при аэрации один объем воздуха на один объем среды в минуту. Через 14 - 18 часов, когда наступает стадия замедления роста и начинается активный синтез глутаминовой кислоты вводят оставшуюся часть мелассы порциями, обеспечивающими содержание сухих веществ в среде 4 - 6% с одновременным внесением мочевины в количестве, обеспечивающем рН-стабирование процесса

В ходе ферментации контролируют рН среды, содержание сухих веществ, накопление биомассы и содержание глутаминовой кислоты

Пример 1. В ферментере готовят 6,0 дм<sup>3</sup> посевной среды со всеми ингредиентами и содержанием сухих веществ 5%. Полученную среду стерилизуют, засевают культурой *Corynebacterium glutamicum* 3144 в количестве 2,5 об.% и ведут ее выращивание в течение 18 часов при аэрации один объем воздуха на один объем среды в минуту. Через 18 часов роста начинают вводить оставшуюся часть мелассы порциями по 210г через каждые три часа процесса с одновременным внесением мочевины

Показатели, характеризующие процесс биосинтеза глутаминовой кислоты по предлагаемому способу приведены в табл. 1

Таблица 1

Время ферментации, ч	Технологические параметры процесса		Биохимические показатели процесса				
	Добавление, см <sup>3</sup>		рН	Оптическая плотность	Остаточные углеводы, г/дм <sup>3</sup>	Количество глутаминовой кислоты, г/дм <sup>3</sup>	Коэффициент конверсии, %
	мелассы	мочевины					
0	-	-	7,0	3,5	39	-	-
18	210	75	7,2	8,0	27,5	2,3	-

21	210	60	7,0	51,0	25,0	9,7	-
24	210	-	7,4	55,0	26,0	15,9	-
27	210	30	7,2	60,0	22,0	17,0	-
30	210	30	7,1	66,0	23,0	22,7	-
33	210	-	7,2	68,0	20,0	23,9	-
36	210	30	7,3	70,0	19,2	26,4	-
39	210	30	7,2	70,0	13,0	40,9	-
42	-	20	7,0	70,0	8,6	49,2	-
45	-	-	7,1	70,0	6,8	57,3	-
48	-	-	7,0	70,0	4,8	57,6	63,3

Показатели, характеризующие кинетику накопления глутаминовой кислоты и ее содержание в культуральной жидкости по известному и предлагаемому способам приведены в таблице 2

Таблица 2

№№ пп	Характеристика процесса	По известному способу	По предлагаемому способу
1	Концентрация суспензии посевной среды, %	10	5
2	Объем посевного материала, %	2,5	75
3	Содержание биомассы в посевном материале, г/дм <sup>3</sup>	11,4	11,0
4	Содержание сухих веществ в ферментационной среде, % на начало ферментации	20	5,0
	через 24 часа	18	6,0
	через 36 часов	12	6,5
	через 48 часов	5,5	5,5
5	Количество глутаминовой кислоты, г/дм <sup>3</sup> через 24 часа ферментации	2,4	12,8
	через 36 часов ферментации	25,0	36,9
	через 48 часов ферментации	42,8	55,0
6	Экономический коэффициент использования углеводов на 48 ча- сов, %	47,0	57,8
7	Введено углеводов с подпитками, г/дм <sup>3</sup>	21,4	21,4
8	Дополнительно получено глутаминовой кислоты, г/дм <sup>3</sup>	14,4	14,0
9	Суммарно получено глутаминовой кислоты, г/дм <sup>3</sup>	61,4	71,8
10	Продолжительность ферментации, ч	70	62
11	Экономический коэффициент использования углеводов на конец ферментации, %	58	65,2

Как видно из данных таблицы 2, при одинаковой продолжительности ферментации предлагаемый способ биосинтеза позволяет увеличить выход глутаминовой кислоты на 12,6% и повысить

коэффициент использования углеводов на 10,8% на 48 час ферментации и на 7,2% к 62 часу ферментации по сравнению с известным способом, продолжительность которого составила 70 часов

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71