



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(09) **SU** (11) **1303035** **A3**

(51) 4 C 12 P 7/42

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(21) 3326314/28-13

(22) 18.08.81

(31) 8027004

(32) 19.08.80

(33) GB

(46) 07.04.87. Бюл. № 13

(71) Империял Кемикал Индастриз Лимитед (GB)

(72) Лорензо Хьюз и Кеннет Рэймонд Ричардсон (GB)

(53) 663.18(088.8)

(56) Heinzle E., Lafferty R.M. A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in *Alcaligenes entrophus* H16. "European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology", 1980, 11, N 1, 8 - 16.

Sonnleitner B., Heinzle E., Braunnegg G., Lafferty R.M. Formal Kinetics of Poly- β -Hydroxybutyric Acid Production in *Alcaligenes entrophus* H16 and *Mycoplana rubra* R 14 with Respect to the Dissolved Oxygen Tension in Ammonium-Limited Batch Cultures. "European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology", 1979, 10, N 7, 1 - 10.

(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ *ALCALIGENES ENTROPHUS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИ- β -ОКСИМАСЛЯНУЮ КИСЛОТУ

(57) Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу ферментации микроорганизмов *Alcaligenes entrophus* для получения клеток, содержащих поли- β -оксимасляную кислоту (ПОМ). Цель изобретения - повышение степени конверсии углерода. Микроорганизмы выращивают в условиях аэрации на водной питательной среде при имитации процесса по азоту. Ферментацию осуществляют непрерывно со скоростью разведения 0,05 - 0,30 ч⁻¹ так, чтобы содержание ПОМ в клетках составляло не менее 25%, при этом содержание азота в подаваемой среде равно 0,4 - 1,5 г/л. Целесообразно в полученную суспензию клеток добавлять источник углерода и проводить повторную ферментацию. Способ позволяет достичь степени конверсии углерода 69%. 1 з.п. ф-лы.

(09) **SU** (11) **1303035** **A3**

РИФ-К

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу ферментации микроорганизмов *Alcaligenes entrophus* для получения клеток, содержащих поли-β-оксимасляную кислоту (ПОМ).

Цель изобретения - повышение степени конверсии углерода.

Способ осуществляют следующим образом.

Для повышения степени конверсии ферментацию микроорганизмов *Alcaligenes entrophus* проводят в условиях, при которых происходит одновременный рост микроорганизмов и накопление в них ПОМ, а именно ферментацию осуществляют непрерывно со скоростью разведения от 0,05 до 0,30 ч⁻¹ при лимитации процесса по азоту. Содержание азота в исходной среде составляет от 0,4 до 1,5 г/л. При этом содержание ПОМ в клетках, выводимых из ферментера, составляет не менее 25%. Именно при соблюдении указанных интервалов режимов проведения ферментации достигается максимальная степень конверсии углерода как в ПОМ, так и в другие клеточные соединения.

Другие условия ферментации, а именно pH, температура, степень аэрации, концентрация минеральных солей являются обычно используемыми для культивирования бактерий *Alcaligenes entrophus*.

Выводимая из ферментера бактериальная суспензия может быть подвергнута обработке с целью выделения из клеток ПОМ. Однако целесообразно добавить в полученную суспензию источник углерода и осуществить повторную ферментацию.

Для повторной ферментации можно использовать тот же источник углерода, что и для первой ферментации. В некоторых же случаях можно повысить эффективность процесса, если на первой стадии использовать субстраты, например углеводы, которые одинаково эффективно могут превращаться и в ПОМ и в другой материал клеток, а на второй стадии использовать субстраты, например органические кислоты и их соли, которые повышают выход ПОМ, а рост клеток на них замедляется.

Пример 1. Питательная среда для выращивания микроорганизмов *Alcaligenes entrophus* N 16 имеет следующий состав (на 1 л деионизированной воды)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 г
H ₃ PO ₄ (1,1 M)	12 мл
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,8 г
H ₂ SO ₄	0,45 г
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	7,5 мг

раствор микроэлементов 24 мл, т.е. содержание N₂ 0,4 г/л.

Раствор микроэлементов имеет следующий состав:

Кальций	720 мг/л
Медь	5 мг/л
Марганец	24 мг/л
Цинк	22 мг/л

3,5 л питательной среды и 35 г фруктозы загружают в ферментер с мешалкой емкостью 5 л и выдерживают смесь при 30°C. Ферментацию ведут в аэробных условиях при парциальном давлении растворенного кислорода 60% от насыщения воздухом. В процессе ферментации значение pH среды автоматически поддерживают равным 6,8 путем добавления 4M NaOH. Для поддержания избытка субстрата периодически добавляют дополнительное количество фруктозы.

После окончания периодической ферментации процесс продолжают непрерывно, при подаче питательной среды, содержащей 16 г/л фруктозы. После установления стационарного состояния ферментацию продолжают в течение 2 недель. Скорость разведения среды 0,1 г⁻¹.

Выход клеток 0,575 г на г субстрата, содержание ПОМ в клетках 30%, степень конверсии углерода 71%. По известному способу в аналогичных условиях получают выход клеток 0,42 г на г субстрата, содержание ПОМ в клетках 70%, степень конверсии углерода 54%.

Пример 2. Способ осуществляют согласно примеру 1, но в качестве субстрата используют глюкозу, а в качестве микроорганизма потребляющий глюкозу мутант *Alcaligenes entrophus* S 301/05. Температура ферментации 34°C, питательная среда, которую непрерывно подают в ферментер, содержит 15 г/л глюкозы. Выход клеток 0,542 г на г субстрата, содержание ПОМ 47%, степень конверсии углерода 69%.

Пример 3. Способ осуществляют согласно примеру 2.

В суспензию бактерий, непрерывно отводимую из ферментера, добавляют 15 г/л глюкозы и подают во второй ферментер емкостью 10 л, где осуществляют ферментацию при 34°C, pH 6,8 и парциальном давлении растворенного

кислорода 60% от насыщения воздухом. Когда объем подаваемой во второй ферментер среды достигает 7 л, ее начинают отводить со скоростью, соответствующей скорости отвода ее из первого ферментера, таким образом, что скорость разведения составляет $0,05 \text{ г}^{-1}$.

После установления стационарного состояния процесс ведут в течение двух недель. Среднее содержание клеток в среде, выводимой из второго ферментера, $10,9 \text{ г/л}$ при концентрации в них ПОМ 70%. Степень конверсии углерода на второй стадии 45%. Степень конверсии углерода всего процесса 57,9%.

Пример 4. Способ осуществляют согласно примеру 2, но содержание азота в исходной среде составляет $1,5 \text{ г/л}$, а скорость разведения $0,07 \text{ г}^{-1}$. Концентрация клеток на сухой вес $24,5 \text{ г/л}$, концентрация ПОМ в клетках 49%, степень конверсии углерода 59%.

Пример 5. Способ осуществляют согласно примеру 2, содержание азота в исходной среде составляет $0,69 \text{ г/л}$, а скорость разведения $0,05 \text{ г}^{-1}$. Концентрация клеток на сухой вес $18,6 \text{ г/л}$, концентрация ПОМ в клетках 65%, степень конверсии углерода 63%.

Пример 6. Способ осуществляют согласно примеру 2, но содержание азота в исходной среде составляет $0,78 \text{ г/л}$.

а скорость разведения $0,3 \text{ г}^{-1}$. Концентрация клеток на сухой вес $8,2 \text{ г/л}$, концентрация ПОМ в клетках 25%, степень конверсии углерода 66%.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет повысить степень конверсии углерода и тем самым увеличить выход биомассы.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ ферментации микроорганизмов *Alcaligenes entrophus* для получения клеток, содержащих поли- β -оксимасляную кислоту, в условиях аэрации на водной питательной среде, содержащей источник углерода и энергии, в состав которого входит углерод и водород, а также минеральные соли, содержащие источники азота и фосфора, при лимитации процесса по азоту с получением суспензии клеток, отличающийся тем, что, с целью повышения степени конверсии углерода, ферментацию осуществляют непрерывно со скоростью разведения $0,05 - 0,30 \text{ ч}^{-1}$ так, чтобы содержание поли- β -оксимасляной кислоты в клетках составляло не менее 25%, при этом содержание азота в подаваемой среде равно $0,4 - 1,5 \text{ г/л}$.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в суспензию клеток добавляют источник углерода и осуществляют повторную ферментацию.

Составитель Т.Мелентьева

Редактор А.Ворович

Техред Л.Олейник

Корректор М.Самборская

Заказ 1228/58

Тираж 500

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4

