



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ №

(19) **SU** (11) **1679801** **A1**

(51) С 12 Р 13/08, С 12 1/20

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4733582/13

(22) 29.08.89

(71) Трипольский биохимический завод
Украинского производственного биохимического объединения "Укрбиохим-препарат"

(72) А.М. Босенко, Н.Н. Якимович,
И.Е. Полкович, Н.К. Краева,
Э.П. Кузьмина, А.Н. Русских,
Л.С. Филиппова и М.А. Казарян

(53) 663.15 (088.8)

(56) Авторское свидетельство СССР
№ 378411, кл. С 12 Р 13/08, 1971.

Временный (пусковой) технологический регламент производства кормового концентрата лизина на Трипольском биохимическом заводе № ВР-02-86.
1986, с. 107-108.

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ L-ЛИЗИНА

(57) Изобретение относится к биотехнологии и касается приготовления питательных сред для культивирования

2
ния продуцентов L-лизина - незаменимой аминокислоты, которая используется в животноводстве для балансирования кормов. Целью изобретения является повышение качества среды для увеличения выхода L-лизина. Способ заключается в том, что в процессе приготовления питательной среды мелассу или другой источник углеводов смешивают с водным раствором минеральной соли или смеси минеральных солей, а стерилизацию такого мелассо-солевого раствора осуществляют при pH 7,5-10,0. Раствор источников ростовых веществ в смеси с источниками минерального фосфора или без них готовят и стерилизуют отдельно. После стерилизации растворы смешивают. Среды, приготовленная предложенным способом, имеет более высокое качество за счет лучшей сохранности витаминов (биотин, тиамин) и редуцирующих веществ при стерилизации. Выход лизина при этом возрастает на 15-20%.
3 табл.

Изобретение относится к биотехнологии и касается приготовления питательных сред для культивирования продуцентов L-лизина - незаменимой аминокислоты, которая используется в животноводстве для балансирования кормов.

Известен способ приготовления питательной среды для культивирования продуцентов L-лизина, предусматривающий приготовление водного раствора,

содержащего мелассу, минеральные соли и источники ростовых факторов, и его стерилизацию. Недостатком способа является частичное разрушение углеводов и витаминов в процессе стерилизации, приводящее к понижению выхода L-лизина.

Наиболее близким к предложенному является способ приготовления питательной среды для культивирования продуцентов L-лизина, предусматрива-

(19) **SU** (11) **1679801** **A1**

РД. 1

и при приготовлении раствора и массы и отдельно раствора, содержащего гидролизат БВК и минеральные соли, их раздельную стерилизацию и последующее смешивание

Стерилизацию раствора мелассы проводят при $124-128^{\circ}\text{C}$ и естественном pH 5,0-7,0 в течение 10-20 мин. Раствор гидролизата БВК с минеральными солями стерилизуют при $126-128^{\circ}\text{C}$ и естественном pH 4,8-6,5 в течение 10-20 мин.

Недостатком этого способа следует признать то, что в процессе стерилизации раствора мелассы из-за частичной карамелизации сахаров и разрушения витаминов снижается качество питательной среды и соответственно уменьшается выход лизина.

Целью изобретения является повышение качества среды для увеличения выхода L-лизина

Способ заключается в следующем

В процессе приготовления питательной среды мелассу или другой источник углеводов смешивают с водным раствором минеральной соли или смеси минеральных солей, необходимых для роста культуры - продуцента и биосинтеза лизина, а стерилизацию такого мелассно-солевого раствора осуществляют в щелочных условиях при pH 7,5-10,0.

При этом в мелассу добавляют раствор одной из солей аммония или раствор смеси солей аммония, например раствор хлористого или сернокислого аммония, смесь растворов хлористого и сернокислого аммония или смесь растворов хлористого аммония и диаммонийфосфата.

Раствор источников ростовых веществ в смеси с источниками минерального фосфора (например, диаммонийфосфата) или без него готовят и стерилизуют отдельно от углеводно-солевого раствора.

Конкретные температурные и временные режимы стерилизации растворов не имеют существенного значения для достижения цели изобретения и процесс стерилизации проводят в течение 15-18 мин в обычно принятых условиях при температуре $120-140^{\circ}\text{C}$.

Исходные и подпиточные среды готовят с использованием стерильного водного раствора мелассы или мелассы с питательными солями

Исходная стерильная питательная среда, приготовленная по известному и предложенному способам, содержит, мас %: меласса (50% РВ) 20, гидролизат БВК (с концентрацией прогидролизованного БВК - 20%) 7, NH_4Cl 1,6, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1.

Подпиточная стерильная питательная среда, приготовленная по известному и предложенному способам, содержит, мас %: меласса (50%) 60, гидролизат БВК (с концентрацией прогидролизованного БВК - 20%) 3, NH_4Cl 6, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,2.

Среды засевают культурой *Brevibacterium* sp. ВКПМ В-3708 (НИТИА-86). Ферментацию проводят в лабораторном ферментаторе при аэрации и механическом перемешивании среды в течение 60 ч при $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ и подаче подпитывающей среды.

Результаты, представленные в табл.1, показывают, что среда, приготовленная предложенным способом, имеет более высокое качество за счет лучшей сохраняемости витаминов и ростовых веществ (РВ) при стерилизации.

Выход лизина при этом возрастает на 15-20%.

Величина pH, при которой осуществляют стерилизацию раствора мелассы с минеральными солями, имеет определенное значение для достижения поставленной цели, что подтверждается данными табл.2

Из данных табл.2 следует, что РВ сохраняют устойчивость при значениях pH 7,5-10,0. При этих значениях pH получены более высокие показатели при ферментации

Аналогичные данные получены при использовании в качестве продуцентов L-лизина штаммов *Brevibacterium* sp. Е-531 и *Brevibacterium lactofermentum* ВКПМ В-4249 (НИТИА-88). Результаты приведены в табл.3

Пример 1. Готовят солевой раствор мелассы, содержащий, мас. %: меласса (50% РВ) 72, NH_4Cl 9,0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,35. pH раствора доводят до 7,5 и стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Параллельно готовят раствор белкового гидролизата (pH 5,1), содержащего 80 мас. % гидролизата БВК (с концентрацией прогидролизованного БВК - 20%) Раствор без корректив к pH

стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Содержание в солевом растворе мелассы отдельных компонентов до стерилизации составляет РВ 36,0 мас.%, тиамина 1050 мкг/кг, биотина 44 мкг/кг, после стерилизации: РВ - 34,9 мас.%, тиамина 940 мкг/кг, биотина 41 мкг/кг. В процессе стерилизации потери РВ, тиамина и биотина составляют соответственно 3,1 10 и 7%.

Для получения исходной питательной среды смешивают стерильный солевой раствор мелассы со стерильным раствором гидролизата БВК и стерильной водой из расчета получения в среде содержания РВ 12,5% и гидролизата БВК 7%.

Для получения подпиточной питательной среды смешивают стерильный солевой раствор мелассы со стерильным раствором гидролизата БВК и стерильной водой из расчета получения в среде содержания РВ 29% и гидролизата БВК 3,3%.

Питательную среду в количестве 5 л засевают 0,5 л посевного материала штамма *Brevibacterium* sp. ВКМ В-3708. Ферментацию проводят в лабораторном ферментаторе при аэрации и механическом перемешивании среды в течение 58 ч при 31±1°C.

В процессе культивирования в ферментационной среде поддерживают содержание сахаров на уровне 0,6-2,0 мас.% (по РВ) путем внесения подпитки. Введение подпитки осуществляют при падении в ферментационной среде уровня сахаров ниже 2%.

Всего внесено 1,5 л подпитки. В культуральной жидкости накоплено 65,3 г/л лизина; коэффициент конверсии субстрата 0,43.

Пример 2. Готовят солевой раствор мелассы, содержащий, мас.%: меласса (50% РВ) 64, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10. Раствор доводят до pH 8,7 и стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Параллельно готовят раствор гидролизата БВК с диаммонийфосфатом: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (pH 5,0), содержащий 80 мас.% гидролизата БВК и 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Раствор гидролизата с диаммонийфосфатом без корректировки pH стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Содержание в солевом растворе мелассы отдельных компонентов состав-

ляет до стерилизации: РВ 32 мас.%, тиамин 980 мкг/кг, биотин 38 мкг/кг, после стерилизации: РВ 34,4 мас.%, тиамин 890 мкг/кг, биотин 35,5 мкг/кг.

В процессе стерилизации потери РВ, тиамина и биотина составляют 2,0, 9,0 и 6,7% соответственно.

Получение исходной и подпиточной питательных сред из стерильных солевых растворов мелассы и гидролизата БВК с диаммонийфосфатом, процесс биосинтеза лизина с подачей подпитки проводят по примеру 1. После окончания процесса ферментации содержание лизина в культуральной жидкости составляет 68,7 г/л; коэффициент конверсии субстрата 0,43.

Пример 3. Готовят солевой раствор мелассы, содержащий, мас.%: меласса (50% РВ) 70, NH_4Cl 8,8, pH раствора доводят до 8,7 и стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Параллельно готовят раствор гидролизата БВК с диаммонийфосфатом (pH 5,0), содержащий 80 мас.% гидролизата БВК и 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Раствор гидролизата БВК с диаммонийфосфатом без корректировки pH стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Состав мелассно-солевой части питательной среды до стерилизации: РВ 35 мас.%; тиамин 1000 мкг/кг; биотин 40 мкг/кг; после стерилизации: РВ 33,8 мас.%, тиамин 920 мкг/кг, биотин 36 мкг/кг. В процессе стерилизации потери РВ, тиамина и биотина составляют соответственно 3,4, 8, 10%.

Получение исходной и подпиточной питательных сред из стерильных солевых растворов мелассы и гидролизатов БВК с диаммонийфосфатом, процесс биосинтеза лизина с подачей подпитки проводят по примеру 1.

После окончания процесса ферментации содержание лизина в культуральной жидкости 65,9 г/л, коэффициент конверсии субстрата 0,42.

Пример 4. Готовят солевой раствор мелассы, содержащий, мас.%: меласса (50% РВ) 80, NH_4Cl 4,5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5,5 pH раствора доводят до 10 и стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Содержание в солевом растворе мелассы составляет до стерилизации: РВ 39 мас.%, тиамин 1220 мкг/кг, биотин 60 мкг/кг, после стерилиза-

цин: РВ 37,9 мас.%, тиамин 1084 мкг/кг, биотин 55 мкг/кг.

Параллельно готовят раствор гидролизата БВК с диаммонийфосфатом (рН 5,0), содержащий, мас.%, гидролизат БВК 80, диаммонийфосфата 1,4. Раствор гидролизата с диаммонийфосфатом без корректировки рН стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

В процессе стерилизации потери РВ, тиамина и биотина составляют соответственно 2,9, 12 и 8%.

Получение исходной питательной среды из стерильных солевых растворов мелассы и гидролизата БВК с диаммонийфосфатом, процесс биосинтеза лизина проводят по примеру 1.

После окончания процесса ферментации содержание лизина в культуральной жидкости 67,4 г/л и коэффициент конверсии субстрата 0,42.

Пример 5. Готовят солевой раствор жидких сахаросодержащих продуктов (ЖСП), полученных в процессе сахароварения, мас.%, ЖСП (60% РВ) 70, NH_4Cl 7,7. рН раствора доводят до 9,0 и стерилизуют при 126°C в течение 18 мин.

Параллельно готовят раствор гидролизата БВК с диаммонийфосфатом (рН 5,0), содержащий 80 мас.% гидролизата БВК, 1,5 мас.% кукурузного экстракта и 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Приготовленный раствор стерилизуют при

126°C в течение 18 мин. Процесс биосинтеза осуществляют по примеру 1. В конце ферментации в культуральной жидкости накоплено 70 г/л лизина при коэффициенте конверсии 0,42.

При осуществлении способа в аналогичных условиях на исходной и подпиточной средах, приготовленных известным способом, накопление лизина в культуральной жидкости составляет 57,3 г/л, коэффициент конверсии субстрата 0,37.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ приготовления питательной среды для культивирования продуцентов L-лизина, предусматривающий приготовление водных растворов, содержащих углеводы, минеральные соли азота и фосфора, а также гидролизат БВК в качестве источника ростовых веществ, их стерилизацию и последующее смешивание, отличающийся тем, что, с целью повышения качества питательной среды для увеличения выхода L-лизина, осуществляют смешивание водных растворов, содержащих углеводы и по крайней мере одну из минеральных солей, а стерилизацию полученного углеводно-солевого раствора осуществляют при рН 7,5-10,0.

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика известного и предложенного способов

Показатели	Известный способ		Предложенный способ	
	до стерилизации	после стерилизации	до стерилизации	после стерилизации

Содержание сахаров (РВ), %:

- в растворе мелассы с солями

- 35,3 34,4

- в растворе мелассы

35,7 32,5

- -

Продолжение табл. 1

Показатели	Известный способ		Предложенный способ	
	до стерилизации	после стерилизации	до стерилизации	после стерилизации
Содержание тиамина, мкг/л:				
- в растворе мелассы с солями	-	-	1150	1020
- в растворе мелассы	1150	830	-	-
Содержание биотина, мкг/л:				
- в растворе мелассы с солями	-	-	46,0	42,5
- в растворе мелассы	46,3	34,2	-	-
Содержание лизина в культуральной жидкости, г/л	58,3		68,5	
Коэффициент конверсии субстрата в лизин	0,36		0,42	

Примечание. Испытуемые водные растворы мелассы и мелассы с питательными солями (питательной солью) готовят из одной порции мелассы. Штамм-продуцент - *Brevibacterium* sp. ВКМ-3708 (НИИА-86)

Таблица 2

Влияние pH стерилизуемой углеводно-солевой части питательной среды на содержание РВ среды и выход L-лизина

pH стерилизуемой углеводно-солевой части питательной среды	Редуцирующие вещества в углеводно-солевой части питательной среды			Содержание лизина в культуральной жидкости, г/л	Коэффициент конверсии субстрата в лизине
	до стерилизации, %	после стерилизации, %	потери, %		
6,0	36,2	33,0	9,0	62,1	0,36
7,0	36,2	33,4	7,8	63,0	0,36
7,5	36,2	34,6	4,5	66,8	0,40
8,0	36,2	34,7	4,1	68,1	0,42

Продолжение табл. 2

pH стерилизуемой углеводно-солевой части питательной среды	Редуцирующие вещества в углеводно-солевой части питательной среды			Содержание лизина в культуральной жидкости, г/л	Коэффициент конверсии субстрата в лизине
	до стерилизации, %	после стерилизации, %	потери, %		
8,5	36,2	35,0	3,3	69,4	0,41
9,0	36,2	35,1	2,9	67,5	0,42
10,0	36,2	35,1	2,9	65,9	0,40
10,5	36,2	34,3	5,3	56,5	0,35

Т а б л и ц а 3

Влияние способа приготовления питательной среды на ее качество и выход лизина

Штамм-продуцент	Способ приготовления среды	Содержание РВ, % к массе подпитки		Потери РВ в процессе стерилизации, %	Тиамин, % потерь после стерилизации	Биотин, % потерь после стерилизации	Содержание лизина в культуральной жидкости, г/л	Конверсия РВ в лизин, %	Производительность, кг/м³ сут
		до стерилизации	после стерилизации						
<i>Brevibacterium</i> sp.	Известный	20,5	18,5	11,1	20	23	42,4	30,0	12,8
Р-531	Предлагаемый	28,0	27,0	3,7	13	9	51,4	32,0	13,8
<i>B. lactofermentum</i>	Известный	20,3	18,5	9,8	18	21	49,8	41,6	13,4
ВКПМ В-4249	Предлагаемый	23,3	23,0	1,3	12	7	56,2	46,0	14,6

Составитель Л. Минеева

Редактор Т. Иванова

Техред Л. Олийник

Корректор С. Пекмар

Заказ 3642/ДСП

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101