



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(59) **SU** (11) **1331434** **A3**

(51)4 C 12 N 1/32

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(21) 2468556/30-13

(22) 11.04.77

(31) 51198/76

(32) 08.12.76

(33) GB

(46) 15.08.87, Бюл. № 30

(71) Империял Кемикал Индастриз
Лимитед (GB)

(72) Фрэнк Питер Маслен, Джон Кларк
Аусбай и Питер Джеймс Сениор (GB)

(53) 577.15 (088.8)

(56) Патент Великобритании

№ 1370892, кл. C 12 D 13/06, опублик.
1974.

Brooks I.D. and Meers I.L.

The Effect of Discontinuous Methanol Addition on the Growth of a Carbon-limited Culture of *Pseudomonas*. - *Journal of General Microbiology*, 1973, 77, p.513-519.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО
ПРОТЕИНА

(57) Изобретение относится к микробиологической промышленности. Цель изобретения - оптимизация выхода биомассы клеток бактерий относительно метанола, подаваемого в процессе культивирования. В процессе непрерывного культивирования клеток бактерий *Methylophilus methylotrophus* в ферментере с циркуляционным контуром осуществляют введение метанола впрыскиванием таким образом, что изменение концентрации его эквивалентно скорости потребления метанола клетками культуры с установлением максимального интервала времени между последующими введениями метанола в зависимости от величины отношения $M/M_{\text{макс}}$ - удельной скорости роста к максимальной удельной скорости роста. 2 з.п.ф-лы, 4 табл.

(59) **SU** (11) **1331434** **A3**

РПФ-К

Изобретение относится к микробиологической промышленности.

Цель изобретения - оптимизация выхода биомассы клеток бактерий относительно метанола, подаваемого в процессе культивирования.

Способ заключается в том, что в процессе непрерывного культивирования клеток бактерий на питательной среде в ферментере с циркуляционным контуром осуществляют введение метанола впрыскиванием таким образом, что изменение концентрации его эквивалентно скорости потребления метанола клетками культуры с установлением максимального интервала времени между последующими введениями метанола в зависимости от величины отношения $M/M_{\text{макс}}$ - удельной скорости роста к максимальной удельной скорости роста.

Предпочтительными культурами продуцентами белка являются *Methylophilus methylotrophus* NC1B № 10508-10515 и NC1B № 10592-10596.

Опыты, проведенные с чистыми культурами бактерий при выращивании, показали, что теория и практика следует той математической модели, которая предложена настоящим изобретением.

Пример 1. Культуру *Methylophilus methylotrophus* выращивают в небольшом аппарате для ферментации, работающем циклически под давлением (т.е. ферментер, имеющий вертикальный трубопровод и спускную трубу, расположенные рядом и взаимосвязанные в своих верхних и нижних торцах, причем аэрация и непрерывная циркуляция культуры в ферментере осуществляется за счет непрерывного впрыскивания воздуха в нижнюю часть вертикального трубопровода, с объемом 165 л рабочей жидкости, при 40°C и $D = 0,25 \text{ ч}^{-1}$. Питательная среда является водной средой, содержащей следующие ингредиенты (концентрация - вес на литр за исключением специальных обозначений):

CH_3OH , г	20,0
H_3PO_4 молярная	0,0165
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г	9,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	1,05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	5,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, мг	0,1
M_2BO_3 , мг	0,07
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, мг	0,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, мг	0,5
Na_2MgO_4 , мг	0,1

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мг 13,24

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, мг 0,1

В этой среде величину pH, необходимую для обеспечения роста, регулируют добавлением смеси 4N KOH/4N NaOH в соотношении 1:1. Скорость циркуляции в пределах аппарата для ферментации составляет $30 \text{ м}^3 \text{ ч}^{-1}$, что составляет для среднего времени циркуляции величину в 20 с. Сухой вес клеток связан со скоростью прибавления метанола, составляющей 14 г/л, что отвечает концентрации сухих клеток в стационарном состоянии. Пять точек, через которые вводят метанол, распределяют вокруг аппарата для ферментации. Несмотря на то, что скорость потока метанола в каждой точке была отличной от скорости его потока в другой точке, скорости потока метанола пропорциональны объему жидкости, находящейся в данном участке аппарата для ферментации.

Физическое распределение отверстий для прибавления метанола таково, что циркулирующие клетки подвергаются действию последовательных циклов в присутствии субстрата и в отсутствие субстрата каждые 3 с, или действие сходных циклов каждые 20 с, если весь метанол, подаваемый в аппарат для ферментации, поступает в одной его точке. Полученные результаты приведены в табл.1.

Пример 2. Лабораторный аппарат для проведения ферментации непрерывного действия (объем жидкости 1,5 л и сухой вес в стационарном состоянии 10 г/л) с культурой *Methylophilus methylotrophus* используют для выращивания культуры при различных скоростях разбавления при постоянном потоке среды. Применяют отдельную систему для прибавления метанола так, что достаточное количество метанола, требующееся для 3 с роста при $M = 0,2 \text{ ч}^{-1}$, поставляется в форме импульсов метанола, подаваемого в 0,3 с. Это соотношение между продолжительностью подачи и общей продолжительностью цикла поддерживается в пределах 1 к 10 при всех варьированиях продолжительности цикла. Состав среды и условия выращивания были идентичны тем, которые были описаны в примере 1. Полученные результаты приведены в табл.2.

Содержание углерода в клетках оставалось постоянным во время проведения всех опытов.

Пример 3. Проводят серию экспериментов по непрерывной культивации при скорости разбавления $0,1-0,4 \text{ ч}^{-1}$. Для каждой степени разбавления проводят эксперимент с непрерывным введением метанола при культивировании бактерий *Methylophilus methylotrophus* NC18 10515 при выращивании в аэробных условиях в реакторе непрерывной ферментации с рабочим объемом 1,5 л, работающем как хеостат, культивирование ведут при 37°C и pH 6,8 на среде, представленной в табл.3. Метанол добавляют отдельно от компонентов среды, чтобы вводить его импульсно с расходом 20 г/л. Состав питательной среды представлен в табл.3.

Эксперимент проводят с непрерывным и импульсным введением метанола для ряда длительностей импульсов для каждой из 4 различных степеней разбавления.

Полученные результаты представлены в табл.4, где D - степень разбавления в ч^{-1} и равно удельной скорости роста $/M/$; $M_{\text{макс}}$ - максимальная удельная скорость роста, равная $0,5 \text{ ч}^{-1}$.

Степень превращения углерода представляет собой процент превращения углерода метанола в клеточный углерод, например степень превращения 50% соответствует выходу клеток 0,5.

Минимально допустимая степень превращения для промышленного производства 59-60%.

Идеальной является степень превращения 64%.

Из данных видно, что удовлетворительная степень превращения углерода достигается в том случае, когда метанол подают импульсно с установленной длительностью импульсов, причем процент превращения углерода при более короткой длительности импульсов постоянен и находится в пределах ошибки эксперимента. При более длительных импульсах процент превращения углерода резко падает до неприемлемого уровня.

Изобретение позволяет оптимизировать выход биомассы клеток бактерий относительно метанола.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ получения микробного протеина, предусматривающий непрерывное культивирование клеток бактерий в ферментере с циркуляционным контуром с заданной скоростью разбавления на питательной среде, содержащей метанол в качестве источника углерода и питательного вещества, ограничивающего рост культуры, источника азота, фосфора и минеральные соли путем изменения концентрации метанола введением его впрыскиванием в нескольких точках контура с заданными интервалами времени введения, отличающийся тем, что, с целью оптимизации выхода биомассы клеток бактерий относительно метанола, подаваемого в процессе культивирования, введение метанола впрыскиванием осуществляют так, что изменение концентрации его эквивалентно скорости потребления метанола клетками культуры, а максимальный интервал времени между последующими введениями метанола устанавливают в зависимости от величины отношения $M/M_{\text{макс}}$ - удельной скорости роста к максимальной удельной скорости роста: 30 с при $M/M_{\text{макс}}$ более 0,5; 6 с при $M/M_{\text{макс}}$ равной 0,2; 4 с при $M/M_{\text{макс}}$ равной 0,1; 3 с при $M/M_{\text{макс}}$ равной 0,05; 2,5 с при $M/M_{\text{макс}}$ менее 0,02 или когда $M/M_{\text{макс}}$ попадает между любыми из этих удельных значений - в линейной пропорции к временному циклу этой пары.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что при культивировании со скоростью разбавления $0,07-0,4 \text{ ч}^{-1}$ максимальный интервал времени устанавливают в зависимости от величины отношения $M/M_{\text{макс}}$ для культуры: 5 с при $M/M_{\text{макс}}$ равной 0,2; 3,5 с при $M/M_{\text{макс}}$ равной 0,1; 2,5 с при $M/M_{\text{макс}}$ менее 0,2, или продолжительность введения имеет линейную зависимость от этой величины для других значений $M/M_{\text{макс}}$.

3. Способ по пп.1 и 2, отличающийся тем, что используют клетки бактерий штаммов *Methylophilus methylotrophus* NC18 № 10508-10515 и NC18 № 10592-10596.

Т а б л и ц а 1

Продолжительность цикла прибавления метанола, с	От С до клеток	От С до CO ₂	От С до S/N
20	57,8	38,6	4,3
3	65,1	30,9	3,2

П р и м е ч а н и е: От С до клеток - это процент углерода метанола, превратившегося в углерод клеток; от С до CO₂ - это процент углерода метанола, превратившегося в углерод двуокиси углерода; от С до S/N - это процент углерода метанола, превратившегося в углерод, присутствующий в верхнем слое жидкости.

Т а б л и ц а 2

Скорость разбавления ч	Продолжительность цикла, с	*С в клет- ках, %
0,07	2,75	56,2
	5,5	49,3
	11,0	47,5
	22,0	42,3
0,20	1,0	64,4
	2,0	62,4
	2,5	61,0
	3,0	59,5
	4,0	54,5
	8,0	53,0
	11,0	47,1
	20,0	46,2
0,4	33,0	48,8
	2,75	62,1
	5,5	61,5

* % (вес/вес) - углерода метанола, введенного в углерод клеток.

Т а б л и ц а 3

Элемент	Источник	Концентрация в культуральной среде, млн.кл
P	H_3PO_4 и K_2HPO_4	885
Mg	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	160
K	$K_2HPO_4 \cdot K_2SO_4$	400
S	$K_2SO_4 \cdot MgSO_4 \cdot 8H_2O$	250
Fe	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	8
Cu	Раствор	0,18
Zn	микроэлементов	0,83
Mn		1,2
Ca		26,0

Т а б л и ц а 4

Степень раз- бавления Д, ч ⁻¹	Д/М _{макс} или М/М _{макс}	Длительность импульса, с	% превращения углерода
1	2	3	4
0,1	0,2	0	68,0
		4	68,0
		12	54,2
		16	48,8
		32	45,4
0,2	0,4	0	68,1
		4	66,4
		12	48,0
		16	49,0
		32	50,3
0,3	0,6	0	66,5
		4	64,9

9		1331434		10	
		Продолжение табл.4			
1	2	3	4		
		12	61,2		
		16	52,3		
		32	51,4		
0,4		0	66,7		
	0,8	8	61,6		
		12	61,6		
		16	59,3		
		32	51,9		

Составитель И.Привалова
 Редактор А.Долгинич Техред М.Ходанич Корректор Н.Король
 Заказ 3596/58 Тираж 499 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