



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39807 (13) A

(51) 7 C12P13/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ L-ЛІЗИНУ

(21) 99021112

(22) 25.02.1999

(24) 15.06.2001

(33) UA

(46) 15.06.2001, Бюл. № 5, 2001 р.

(72) Лужков Олександр Михайлович, Краєва Наталя Кирилівна, Василенко Наталія Іллівна, Руських Анна Миколаївна, Роговер Валерій Семенович, Соболєнко Олександр Петрович, Мотузюк Людмила Володимирівна, Мариночкіна Лариса Іванівна

(73) Відкрите акціонерне товариство "Трипільський біохімічний завод"

(57) 1. Спосіб одержання L-лізину, що передбачає вирощування продукуючих його мікроорганізмів в умовах аерації в поживному середовищі, яке містить джерела вуглецевого, азотного живлення, мінеральні солі і ростові фактори, а також подачу в процесі ферментації підживного середовища в залежності від інтенсивності споживання поживних речовин і дихальної активності та відливи культуральної рідини при заповненні ферментатора на 60-90% з подальшим продовженням підживного режиму та після закінчення процесу ферментації концентрування, висушування або очищення цільового продукту, який відрізняється тим, що подача підживного середовища здійснюється двома потоками, один з яких містить всі необхідні речовини для синтезу L-лізину (джерела вуглецевого, азотного живлення, ростові речовини), а другий - тільки ростові речовини, при цьому поживне середовище одного потоку збалансоване таким чином, що забезпечує одночасно ріст продуценту і синтез цільового продукту, а другий потік корегує швидкість росту продуценту, відповідно до збільшення об'єму культуральної рідини та забезпечує максимальну швидкість синтезу L-лізину.

2. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що швидкість подачі підживного середовища обох потоків регулюється таким чином, щоб забезпечити співвідношення вуглецевого компоненту та ростового фактору, наприклад сахарів до амінокислоти (L-лейцину) в межах 125 - 275.

3. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що після відливу культуральної рідини швидкість подачі поживного середовища з вуглецевим джерелом збільшують в 2-5 разів, а підживного середовища з ростовим фактором - збільшують таким чином, щоб швидкість подачі амінокислоти (L-лейцину) сумарно з двох потоків збільшилась в 2-12 разів протягом 1-4 годин.

4. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як продуцент L-лізину використовують штам *Brevibacterium* sp.90 H аналогорезистентний, який є аутокотрофом по L-лейцину та лейкі-L-гомосерину.

5. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як джерело вуглецевого живлення використовують бурякову меласу, а з культуральної рідини після концентрування та змішування з наповнювачем одержують кормовий препарат "Ліпрот", що містить L-лізин і збагачений бетаїном.

Винахід належить до мікробіологічної промисловості і стосується одержання незамінної амінокислоти L-лізину, яка може бути використана в сільському господарстві як кормова добавка в раціони домашніх тварин і птиці.

Метою винаходу є зниження вартості способу за рахунок збільшення виходу продукту з одиниці обладнання на стадії біосинтезу, а також покращення кормових властивостей готового продукту.

Винахід має такий зміст.

Під час одержання L-лізину, з використанням глибинної культивування продуцентів при аерації на поживному середовищі з джерелами вуглецю, азоту, мінеральних солей та ростових речовин, для підтримання біомаси продукуючих мікроорганізмів в активному стані в культуральну рідину додають

свіже поживне середовище таким чином, щоб співвідношення між джерелом вуглеводного живлення та ростовими речовинами відповідало оптимальному фізіологічному стану продуценту та забезпечувало максимальну швидкість синтезу кінцевого продукту. При цьому для збільшення виходу продукту з одиниці обладнання при накопиченні культуральної рідини в ферментаторі проводять одно- чи багаторазові відливи культуральної рідини, не перестаючи подавати підживку та після кожного відливу міняється швидкість і співвідношення джерел живлення, що додаються.

Відомі способи одержання L-лізину мікробіологічним синтезом передбачають приготування стерильного поживного середовища посів культури продуценту та здійснення процесу біосинтезу з

(19) UA (11) 39807 (13) A

додатковою подачею поживних речовин, наприклад меляси або комплексного вуглеводного джерела (редуючих речовини + органічні кислоти чи спирти (див.: Ас. СРСР 498940, 1381991) та стимуляторів росту (див.: Ас. СРСР 494040). Подача поживних речовин відбувається з швидкістю, яка забезпечує визначену концентрацію речовин в поживному середовищі, що подаються, чи за показником дихальної активності культури або вмісту залишкового кисню в культуральній рідині (див.: Ас. СРСР 1194020).

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб, що передбачає подачу свіжого поживного середовища до досягнення об'єму 0,6-0,9 від об'єму ферментатора з припиненням його подачі до моменту зниження інтенсивності дихання на 30-60% від рівня, при якому припиняють підживку з наступним відливом культуральної рідини з її верхньої частини до досягнення об'єму 0,4-0,65 від об'єму ферментатора та відновленням підживки в кількості, що забезпечує інтенсивність дихання на рівні до припинення подачі підживки (див.: Ас. СРСР 1460999).

Треба визнати такі недоліки цього способу: припинення подачі підживки та наступний відлив культуральної рідини створюють несприятливі умови для життєдіяльності культури продуценту, внаслідок чого треба час (непродуктивний) для активізації культури; підживка, що подається має всі компоненти поживного середовища та однаковий склад на протязі всього процесу, тому після відливу культура не досягне максимально можливої продуктивності внаслідок неоптимального (розбалансу) співвідношення компонентів поживного середовища для кожного періоду росту; регулювання швидкості подачі підживки в визначеному інтервалі залежно від дихальної активності культури, не дає об'єктивної оцінки потенційних можливостей культури продуценту в швидкості росту та синтезу продукту, внаслідок чого відбувається уповільнення процесу чи не ефективне використання вуглеводної сировини.

Таким чином, під час здійснення цього способу в умовах багатотоннажного виробництва рівень накопичення L-лізину досягне не більше 60 г/л і продуктивність ферментатора 11-13 кг/м³·добу.

Спосіб, що пропонується, усуває вище згадані недоліки і створює умови для підвищення продуктивності продуценту, дає можливість досягнути рівня накопичення L-лізину в багатотоннажному виробництві до 90-120 г/л, збільшити продуктивність ферментаційного обладнання на 20-70%.

Спосіб має такий зміст.

В процесі глибинної культивування продуцентів L-лізину, переважно роду *Brevibacterium*, на поживному середовищі з джерелами вуглецю, азоту, мінеральних солей та ростових речовин подачу свіжого поживного середовища здійснюють двома потоками, один з яких має всі необхідні речовини для росту продуцента та синтезу продукту, а інший - тільки ростові речовини. Таким чином, потік поживного середовища з комплексом поживних речовин (джерела вуглецю, мінеральний азот, ростові речовини), збалансований так, що забезпечує швидкість росту продуцента, яка не лімітується киснем (тобто у відповідності з масообмінними характеристиками ферментатора).

Другий потік, що складається тільки з ростових факторів, застосовують для корегування швидкості росту продуцента під час процесу біосинтезу L-лізину, коли об'єм культуральної рідини незначний та масообмінні характеристики ферментатора максимальні, а також для активізації культури продуценту після відливу культуральної рідини, що здійснюють коли об'єм в ферментаторі буде не менше 60% та зменшиться швидкість біосинтезу. Подачу підживного середовища, що включає ростові фактори починають при споживанні одного з головних факторів росту, наприклад L-лейцину не менш як на 40% від початкової концентрації. Швидкість подачі вибирають залежно від бажаної швидкості росту культури продуцента, тобто оптимальної для цих умов в межах 0,01-0,03 г/л·год. Подачу комплексного поживного середовища починають коли концентрація редуючих речовин в культуральній рідині зменшиться до 5-20 г/л з швидкістю 3-7,5 г/л·год, при цьому поступає частково ростовий фактор, що містить L-лейцин, і це дає змогу підтримувати співвідношення концентрацій головних компонентів поживного середовища (редуючих речовин до L-лейцину) в межах 125-275.

Коли об'єм в ферментаторі буде не меншим 60% здійснюють відлив культуральної рідини в кількості від 10% до 50% від об'єму культуральної рідини не припиняючи подачі підживки. Після закінчення відливу збільшують швидкість подачі підживного середовища, що містить ростові речовини та комплексного підживного середовища таким чином, щоб швидкість подача вуглеводного компоненту (редуючих речовин) збільшилась в 2-5 разів, а швидкість подачі ростових факторів в розрахунку на вміст L-лейцину (в сумі з двох потоків) збільшилась в 2-12 разів. Тривалість періоду подачі підживних середовищ з збільшеною швидкістю змінюється в межах від 1 до 4 годин залежно від об'єму культуральної рідини, що залишилась, та умов масообміну.

Протягом процесу біосинтезу здійснюють від 1 до 4 відливів культуральної рідини, збільшуючи об'єм культуральної рідини з одного ферментатора на 40-60%. Рівень накопичення L-лізину в першому відливі не менше 70 г/л, в кінцевому зливі - не менше 85 г/л.

Управління швидкостями потоків підживних середовищ в вище згаданих межах здійснюють, враховуючи концентрацію вуглеводів в культуральній рідині на рівні 5-15 г/л та концентрацію вуглекислого газу в відпрацьованому повітрі в межах 1-2,6%, що дає можливість мати оперативну інформацію про швидкість споживання вуглеводів.

Культуральну рідину, що одержують в результаті ферментації, переробляють одним з відомих способів для одержання кінцевого продукту - кормового концентрату або кристалічного L-лізину.

Склад підживних середовищ підбирається таким чином, щоб забезпечити регулювання швидкості подачі двох потоків, враховуючи оптимальне співвідношення між вуглецевим та ростовим компонентами.

Вуглецевий компонент (сахароза, глюкоза) визначається за редуючими речовинами, а ростовий - за амінокислотою L-лейцином. Оптимальні границі цього співвідношення визначені експериментально за максимальною питомою швидкістю

синтезу L-лізину Yr (год^{-1}), під час біосинтезу в 100 м^3 ферментаторах і наведені в табл. 1.

Для забезпечення високої продуктивності об'єднання питома швидкість синтезу L-лізину повинна бути не меншою $0,05 \text{ год}^{-1}$, отже оптимальне співвідношення редуруючих речовин до L-лейцину повинно бути в межах 125-275.

Межу кратності збільшення швидкості подачі вуглецевого живлення (редуючих речовин - р.р.) після відливу визначили експериментальне за економічним коефіцієнтом процесу біосинтезу L-лізину в 100 м^3 ферментаторах і представили в табл. 2.

Найбільш економічно використання р.р. для синтезу L-лізину відбувається при збільшенні швидкості подачі р.р. після відливу в 2-5 разів, подальше підвищення швидкості дасть різке збільшення витрат вуглецевого компонента для підтримки та синтезу біомаси.

Для вибору оптимальної межі збільшення швидкості подачі підживного середовища, що містить L-лейцин, визначили питому швидкість синтезу L-лізину та росту біомаси при різній швидкості подачі L-лейцину після відливу (сумарно за двома потоками) в процесі біосинтезу L-лізину в 100 м^3 ферментаторі (табл. 3).

В зв'язку з тим, що головною метою подачі підживного середовища, що містить L-лейцин, є підвищення швидкості росту при збереженні високої продуктивності, то після відливу Yx не повинна бути нижче $0,02 \text{ год}^{-1}$. Таким чином, оптимальна кратність збільшення подачі L-лейцину після відливу, що забезпечує ці показники, складає 2-12 разів.

Для оцінки ефективності способу, що пропонується, як прототип використали дані а.с. № 1460999 та результати промислових випробувань. Дані наведені в табл. 4.

Штам продуцент L-лізину *Brevibacterium* sp 90 (реєстраційний номер ВКПМ В-5593) аналогорезистентний ауксотроф за L-лейцином з зниженою потребою для росту в цьому факторі, для росту на мінімальному середовищі потребує біотину та тіаміну, досягає в виробничих умовах на середовищах з м'ясом рівня накопичення L-лізину 70-85 г/л, конверсії 35-37%. Особливістю цього штаму є уповільнений ріст та незначна швидкість біосинтезу L-лізину. З метою одержання нового штаму більш продуктивного була проведена селекція. Під дією мутагену нітрозоганідину з штаму *Brevibacterium* sp 90, шляхом багатоступеневої селекції було одержано штам *Brevibacterium* sp 90 Н з підвищеною швидкістю росту та синтезу L-лізину порівняно з вихідним штамом.

На поживному середовищі з м'ясом новий штам дає можливість одержувати за 72 години 100 г/л L-лізину, на середовищі з глюкозою – 120 г/л за 85 годин при коефіцієнті конверсії 42-48%.

На першому етапі селекції одержані мутанти стійкі до структурного аналогу L-лізину 8-(2-аміноетил)-цистеїну та їх колонії на мінімальному середовищі з L-лейцином та гомосерином відрізняються більшим розміром порівняно з колоніями вихідного штаму.

Шляхом багатоступеневого відбору на поживних середовищах з м'ясом і білковою сирови-

ною, що містять L-лейцин в різних концентраціях, одержано штам *Brevibacterium* sp 90 Н, який перевищує вихідний за швидкістю росту біомаси та продуктивністю. Під час культивування в колбах на качалці рівень накопичення L-лізину досягає 68 г/л за 68 годин. Штам має підвищену потребу в L-лейцині порівняно з вихідним штамом та в присутності мінімальної кількості гомосерину збільшує швидкість росту та синтезу цільового продукту.

Новий штам *Brevibacterium* sp 90 Н має такі культурально-морфологічні та біохімічні ознаки.

Культурально-морфологічні ознаки

Клітини овальні, розміри 1,0-1,5 мкм та 0,6-0,8 мкм, нерухомі, грампозитивні, спор не утворюють. Через 2-3 доби росту при 30°C на МПА утворюють колонії 2-4 мм жовтого кольору, поверхня гладенька, форма випукла, край рівний, структура однорідна тістоподібна. Коли посіяти штрихом, то через дві доби ріст хороший, край рівний, поверхня матова. Коли посіяти уколом, ріст в глибині агару слабкий, на поверхні помірний. Через 2-3 доби росту при 30°C на глюкозно-мінеральному середовищі Гловера, що містить L-лейцин, гомосерин, колонії 2-3 мм, край рівний, структура однорідна, консистенція тістоподібна, поверхня гладенька, колір колоній жовтий. Ріст штриха на цьому середовищі через 2 доби хороший.

Фізіолого-біохімічні ознаки

Аероб. Желатину не розріджує. Добре росте на глюкозі, сахарозі, мальтозі, фруктозі, манозі, етанолі, оцтовій кислоті. Не росте на ксилізі, арабінозі, лактозі, рафінозі. Засвоює азот в формі солей амонію та сечовини. Не засвоює нітратний азот. Росте при температурі $24-42^\circ\text{C}$. Оптимальна температура 32°C . Росте на середовищах з рН від 6 до 8,5. Оптимальне значення рН 6,8-7,2. Для росту на мінімальному середовищі потребує L-лейцин, лейкі-L-гомосерин. Стійкий до бактеріофагів, що лізують штам - прототип *Brevibacterium* sp 90. Стійкий до аналогу L-лізину 8-(2-аміноетил)-цистеїну. Штам зберігається при температурі 4°C на косяках з агаром Хоттінгера протягом 6 місяців чи в ліофільне висушених ампулах на протязі року.

Спосіб ілюструється такими прикладами.

Приклад 1

Як продуцент використовують культуру *Brevibacterium* sp 90 Н. Посівний матеріал вирощують в качалочних колбах об'ємом 750 мл з поживним середовищем об'ємом 50 мл такого складу, %: м'яса - 5, кукурудзяний екстракт - 4, культуральна рідина L-лейцину - 0,2 г/л (за вмістом L-лейцину), крейда - 1. Перед посівом рН середовища доводять до 7-7,2. Через 20 годин культивування при температурі 32°C посівний матеріал в кількості 10% подають в ферментатор об'ємом 10 л з поживним середовищем об'ємом 4,5 л такого складу, %: м'яса - 14, гідролізат кормових дріжджів - 5,5, кукурудзяний екстракт - 2, NH_4Cl - 1, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 0,1, культуральна рідина L-лейцину - 0,2 г/л (за вмістом L-лейцину), дестіобіотин - 250 мкг/л, тіамін - 250 мкг/л. Біосинтез L-лізину ведуть при аерації стерильним повітрям і перемішуванні з швидкістю 500 об./хв, що забезпечує масообмін $5 \text{ г O}_2 \text{ л/год}$ (по сульфитному числу). рН середовища підтримують на рівні 6,8-7,2 аміачною водою. Процес ведуть при температурі 32°C . Як піногасник використовують пропіол Б-400. З 6 години росту, коли

біомаса досягне рівня 6 г/л починають подавати підживне середовище (1) такого складу, %: кукурудзяний екстракт - 40, культуральна рідина L-лейцину - 40. Вміст L-лейцину складає 10 г/л. Швидкість подачі в перерахунку на L-лейцин - 0,01 г/л·год.

При зменшенні в поживному середовищі р.р. до 5 г/л починають подавати підживне середовище (2) такого складу, %: меляса - 54, гідролізат кормових дріжджів - 2,5, кукурудзяний екстракт - 1, NH_4Cl - 4, культуральна рідина L-лейцину - 0,15 г/л (за вмістом L-лейцину), дестіобіотин - 250 мкг/л, тіамін - 250 мкг/л, з швидкістю в перерахунку на р.р. 5,5 г/л·год. При цьому швидкість подачі L-лейцину сумарно за двома потоками складає 0,028 г/л·год, а співвідношення р.р. до L-лейцину - 196. При збільшенні об'єму культуральної рідини до 7,5 л на 39 годин росту здійснюють відлив 2 л з вмістом L-лізину 70 г/л.

Після відливу збільшують подачу підживного середовища (2) в розрахунку на р.р. до 11 г/л протягом години, а середовища (1) до 0,06 г/л L-лейцину протягом години (за сумарним вмістом двох потоків). Потім швидкість подачі підживних середовищ зменшують до 4,7 г/л·год по р.р. і 0,019 г/л·год по L-лейцину. На 50 годині росту роблять відлив культуральної рідини в об'ємі 2 л з вмістом L-лізину - 80 г/л і збільшують подачу середовищ (1) та (2) вдвічі протягом 1,5 год, потім зменшують подачу середовища (2) до 4,2 г/л·год по р.р., а середовища (1) - до 0,016 г/л·год по сумарному L-лейцину. На 59 годині росту роблять відлив культуральної рідини в об'ємі 1,2 л з вмістом L-лізину 87 г/л. Далі процес ведуть, як згадано вище, і через 8 год роблять відлив культуральної рідини в об'ємі 1,2 л з вмістом L-лізину 93 г/л і на 72 години росту процес закінчують, вміст L-лізину в культуральній рідині 102 г/л. Загальна кількість синтезованого L-лізину 1005 г, об'єм культуральної рідини 11,2 л, коефіцієнт конверсії 48%.

Приклад 2

Посівний матеріал штаму *Brevibacterium* sp 90 Н вирощують, як зазначено в прикладі 1. Ферментаційне середовище має такий склад, %: глюкоза - 8, гідролізат соєвого шроту - 6, кукурудзяний екстракт - 2, культуральна рідина L-лейцину - 0,3 г/л (в перерахунку на L-лейцин), MgSO_4 - 0,025; K_2HPO_4 - 0,225; KH_2PO_4 - 0,075, дестіобіотин - 250 мкг/л, тіамін - 250 мкг/л. Ферментацію ведуть в 20 л ферментаторі з аерацією та перемішуванням культуральної рідини, що відповідають сульфитному числу 6-7 г O_2 /л·год. Початковий об'єм поживного середовища 7,5 л. Умови культивування, як в прикладі 1. Підживне середовище (1), що містить рости́вий фактор такий же, як в прикладі 1, підживне середовище (2) такого складу, %: глюкоза - 45, гідролізат соєвого шроту-6,5, кукурудзяний екстракт - 2, культуральна рідина L-лейцину - 0,25 г/л (в перерахунку на L-лейцин), вітаміни в такій самій кількості, як в початковому середовищі. Подачу обох підживок починають при рівні накопичення біомаси 20 г/л на 12 годині культивування, при цьому р.р. подають з швидкістю 3-3,5 г/л·год, а L-лейцин - 0,014 г/л·год, тобто забезпечують співвідношення 210-250. На 46 год культивування роблять відлив культуральної рідини, що містить 74 г/л L-лізину в об'ємі 1,7 л. Після відливу збільшують швидкість

подачі підживного середовища (2) в 3 рази в перерахунку на р.р., а середовища (1) в перерахунку на сумарний L-лейцин в 3 рази протягом 4 год. Потім зменшують швидкість подачі підживних середовищ відповідно до 4-6 г/л·год по р.р. і 0,022 г/л·год по L-лейцину. Кожні наступні 8-10 годин роблять відлив культуральної рідини по 1,2-1,5 л з наступним збільшенням подачі підживних середовищ в 2,5-3 рази протягом 1,5-2,0 годин. Через 85 годин від початку процесу одержують 11,5 л культуральної рідини з вмістом L-лізину 120 г/л. Загальний об'єм одержаної культуральної рідини 17 л або 1864 г L-лізину, коефіцієнт конверсії сахарів - 41%.

Приклад 3

Посівний матеріал штаму *Brevibacterium* sp 90 Н вирощують на поживному середовищі, як зазначено в прикладі 1, але в об'ємі 5 м³ в 10 м³ ферментаторі. Ферментаційне середовище в кількості 37 м³ завантажують в 100 м³ ферментатор, обладнаний мішалкою, автоматичними системами регулювання температури, рН середовища, піногасіння та аналізатором вуглекислого газу в відпрацьованому повітрі. Поживне середовище має такий склад, %: меляса - 24, гідролізат кормових дріжджів - 3, кукурудзяний екстракт - 5, NH_4Cl - 0,8, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 0,1, культуральна рідина L-лейцину - 0,15 г/л (за вмістом L-лейцину). В стерильне поживне середовище подають посівний матеріал в кількості 5 м³ і далі процес ферментації ведуть при температурі 32°C, рН 6,8-7,2, витраті повітря 1-1,2 об'єму на об'єм середовища та перемішуванні з швидкістю 120 об./хв. З 20-ї години росту при рівні біомаси 24 г/л та вмісті р.р. 9 г/л додають підживне середовище двома потоками такого складу, %: 1-й потік - кукурудзяний екстракт - 30, культуральна рідина L-лейцину - 30; 2-й потік - меляса - 54, гідролізат кормових дріжджів - 1,6, кукурудзяний екстракт - 2,5, культуральна рідина L-лейцину - 0,15 г/л (в перерахунку на L-лейцин), NH_4Cl - 3,7 (вміст L-лейцину - 1,1 г/л). Подачу підживного середовища другого потоку здійснюють з швидкістю 0,6-0,8 м³/год, і таким чином забезпечують подачу р.р. з швидкістю 4 г/л·год. Подачу підживного середовища першого потоку здійснюють з швидкістю 20-60 л/год і таким чином забезпечують подачу L-лейцину з двома потоками зі швидкістю 0,015-0,02 г/л·год та співвідношення р.р. до L-лейцину 200-266. Регулюють швидкість подачі підживного середовища в зазначених межах за показником вмісту вуглекислого газу в відпрацьованому повітрі в межах 1-2,6%. Коли об'єм культуральної рідини в ферментаторі буде 62 м³, а вміст L-лізину 75 г/л, на 57-й годині росту здійснюють відлив 15 м³, далі швидкість подачі поживного середовища 1-го потоку збільшують в 3 рази, а 2-го - в 2,5 рази протягом 1 години і потім відновлюють попередній режим до наступного відливу. Через 16 годин після 1-го відливу здійснюють 2-й відлив об'ємом 15 м³ з вмістом L-лізину 81 г/л. Подальше управління підживним середовищем здійснюють так, як після 1-го відливу.

Процес закінчують на 105-й годині росту з об'ємом культуральної рідини 64 м³ та вмістом L-лізину 97 г/л. За весь процес одержують 94 м³ культуральної рідини з 8,5 т L-лізину. Коефіцієнт конверсії вуглеводів меляси в L-лізін - 38%. З одержаної культуральної рідини відділяють біома-

су і з допомогою іонного обміну одержують кристалічний L-лізину одним з відомих способів.

Приклад 4

Процес ведуть, як зазначено в прикладі 3, але з продуцентом *Brevibacterium* sp 90, а поживні середовища містять в 1,5 раза менше ростових речовин. Процес закінчують на 120 годині росту з вмістом L-лізину в культуральній рідині 85 г/л. Загальний вихід L-лізину 7,7 т в 93 м³ культуральної рідини. Культуральну рідину випарюють під вакуумом, змішують з наповнювачем (висівками) та висушують. Одержаний кормовий препарат "ЛІПРОТ" містить, крім L-лізину, інші амінокислоти, білок, мікроелементи та вітаміни.

При використанні як вуглеводного джерела бурякової меляси в культуральній рідині накопичу-

ється бетаїн - речовина, що містить азот, не засвоюється продуцентами L-лізину і повністю зберігається в готовому кормовому препараті "ЛІПРОТ". Бетаїн відіграє важливу роль як компонент живлення сільськогосподарських тварин і птиці. Бетаїн є джерелом лабільних металічних груп і може забезпечити ендогенне утворення холіну. Так, в комбікормах для птиці бетаїн враховується разом з холіном (див.: Ємеліна Н.Т. та ін. Вітаміни в годівлі сільськогосподарських тварин і птиці. - М.: Колос, 1970. - 312 с.). В мелясі вміст бетаїну змінюється в межах від 6% до 13%. В способі одержання L-лізину, що пропонується, меляси додається в культуральну рідину на 10-15% більше, ніж в прототипі. Таким чином, кормовий препарат "ЛІПРОТ" містить від 7,5% до 14% бетаїну.

Таблиця 1

Співвідношення редуруючих речовин до L-лейцину	100	125	150	175	200	250	275	300
Питома швидкість синтезу Y_p (год ⁻¹)	0,025	0,05	0,06	0,085	0,09	0,095	0,08	0,035

Таблиця 2

Швидкість подачі підживного середовища з вуглецевим компонентом в розрахунку на р.р.
Vc г/л·год до відливу - 3,5 (середнє)

Vc після відливу	8	10	12	14	16	1 [^]	20
Кратність збільшення Vc	2,3	2,9	3,4	4	4,6	5,1	5,7
Економічний коефіцієнт після відливу, Vc, год ⁻¹	3,6	3,3	3	2,7	3	3,6	5,5

Таблиця 3

Швидкість подачі L-лейцину до відливу Y_{lei} , г/л·год (0,015±0,005)

Y_{lei} після відливу	0,04	0,06	0,08	0,09	0,1	0,11	0,012	0,013	0,014
Кратність збільшення Y_{lei}	2-4	3-6	4-8	4,5-9	5-10	5,5-11	6-12	6,5-13	7-14
Після відливу Y_p , год ⁻¹	0,05	0,06	0,06	0,08	0,085	0,085	0,08	0,08	0,06
Питома швидкість росту біомаси Y_x , год ⁻¹	0,02	0,026	0,038	0,038	0,04	0,032	0,027	0,018	0,01

Таблиця 4

Порівняльні показники біосинтезу L-лізину на поживних середовищах з м'ясою за способом, що пропонується, та прототипом

1. Біосинтез в лабораторному ферментаторі об'ємом 10 л

Спосіб	Кількість відливів	Кількість підживки, л	Співвідношення ред. речовин до ростових факторів		Швидкість подачі поживних речовин, г/л-год			
			під час процесу	після відливу	ред. речовини		рост. фактори	
					під час процесу	після відливу	під час процесу	після відливу
Прототип	4	12	714	714	9,3	12,5	0,013	0,018
Спосіб, що пропонується	4	5,2	256	160	5,3	8	0,02	0,05

Продовження табл. 4

Спосіб	Накопичення L-лізину, г/л	Вихід L-лізину з операції, г	Продуктивність, г/л·добу	Витрата м'яси г/г L-лізину
Прототип	49	847	24,2	5,7
Спосіб, що пропонується	102	1005	25,5	4,8

Продовження табл. 4

2. Біосинтез в 100 м³ ферментаторі

Спосіб	№ п/п	Кількість відливів	Кількість підживки, м ³	Співвідношення ред. речовин до ростових факторів		Швидкість подачі поживних речовин, кг/м ³ ·год			
				під час процесу	після відливу	ред. речовини		рост. фактор	
						під час процесу	після відливу	під час процесу	після відливу
Прототип	1	1	46	850	850	4,5	4,5	0,01	0,01
	2	2	73	660	660	5,0	5,0	0,01	0,01
	3	3	92	460	460	6,2	6,2	0,015	0,015
Спосіб, що пропонується	4	1	48	240	200	3,2	16,0	0,013	0,08
	5	2	55	200	160	3,0	9,6	0,015	0,06
	6	2	57	175	125	3,0	15,0	0,017	0,12
	7	3	67	220	160	3,4	15,4	0,015	0,096

Продовження табл. 4

Спосіб	№ п/п	Накопичення L-лізину, кг/м ³	Вихід L-лізину з операції, кг	Продуктивність, кг/м ³ ·добу	Витрата м'яси кг/кг L-лізину
Прототип	1	45,1	4490	10,8	8,3
	2	45,2	5560	12,6	8,7
	3	47,0	6436	13,4	8,2
Спосіб, що пропонується	4	88,6	7358	15,0	5,8
	5	88,0	8796	16,0	5,6
	6	9838	8941	14,0	6,2
	7	85,0	7442	13,6	6,4

ДП "Український інститут промислової власності (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид.арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул.. Горького, 180.
(044) 268-25-22
