



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 945173

(89) 126704(ГДР)

(61) Дополнительное к авт. свид-ву

(22) Заявлено 28.11.77 (21) 777045/28-13

(23) Приоритет — (32) 16.12.76

(31) WPS 12d/196391 (33) ГДР

(51) М. Кл.³

С 12 N 1/28

Опубликовано 23.07.82 Бюллетень № 27

(53) УДК 663.18
(088.8)

Дата опубликования описания 23.07.82

(72) Авторы
изобретения

Иностранцы

Любберт Густав-Адольф, Рейхелт Лотар, Гейденрейх
Рейтер Урзула, Баух Йоахим и Гентши Герберт
(ГДР)

(71) Заявитель

Иностранное предприятие

"ФЕБ Петролхемишес Комбинат Шведт"
(ГДР)

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1

Изобретение касается способов культивирования микроорганизмов на прямоцепных углеводородах, в особенности культивирования микроорганизмов с поглощением кислорода, причем микроорганизмы культивируются для получения простейших протеинов, для целей кормления или также для питания людей. Изобретение относится к технической микробиологии и может быть использовано в установках, в которых из углеводородов получают протеины.

При промышленном использовании способа наряду с качеством продукции решающую роль играет экономичность способа, причем стремятся к следующим главным целям:

Высокая степень использования применяемого источника углеводородов для синтеза клеточного вещества.

Высокая степень использования подаваемого кислорода для синтеза клеточного вещества, так как для диспергирования кислорода или кислородсодержащего газа должна потребляться энергия, и поглощение кислорода приводит кроме того к потерям углерода.

2

Если биомасса должна быть переработана в продукты кормления или питания, стремятся к высокому содержанию основы протеина и выгодной степени использования израсходованного азота для легко усваиваемого протеина, так что, например, поддерживается возможно низкое содержание азота в нуклеиновой кислоте.

Достижение высокой концентрации биомассы в ферментере, чтобы снизить затраты на переработку.

Разработаны ферментеры с высокой интенсивностью газации и высокой степенью превращения азота, например ферментеры с подачей потока (экономический патент 111 144). Для улучшения обмена веществ с кислородом из воздуха в ферментационной среде предложено использовать поверхностно-активные вещества (выкладное описание изобретения к неакцептованной заявке 1 442 296).

Исследовано и предложено большое количество различных микроорганизмов соответственно их различным специфическим характеристикам производительности и качества.

Предложены также различные вещества в качестве стимуляторов роста и качества (выкладное описание изобретения к неакцептованной заявке 1 470 490, выкладное описание изобретения к неакцептованной заявке 1 470 507, экономический патент ГДР 50 543 и выкладное описание изобретения к неакцептованной заявке 2 043 206).

Использование источника углерода с предпочтительным числом С 10–14 для ферментации на *n*-парафинах в фазе логарифмического роста дрожжевых клеток между 0,08 и 0,10 вес. ч. суспензии культуры (патент исключительного права ГДР 113 927).

Используемые микроорганизмы имеют значительные резервы относительно использования израсходованного углерода, кислорода и также азота в пользу желаемого чистого протеина.

Цель изобретения – повышение экономичности способа культивирования микроорганизмов на прямоцепных углеводородах, вследствие лучшего использования микроорганизмов, а также создание таких условий способа, чтобы достигался оптимальный коэффициент созревания клеток микроорганизмов.

Состав *n*-парафинов по характеристике используемого углеводородного сырья в связи с определенными условиями способа оказывает значительное влияние на коэффициент созревания клеток микроорганизмов, а также на качество продукции.

Для культивирования микроорганизмов исходные продукты источника углеродов используются так, как они поступают на рафинированное очищение.

С другой стороны *n*-парафиносодержащие углеводородные фракции используются так, что после микробиологической депарафинизации они удовлетворяют предусмотренным целям применения. Связи между созреванием клеток микроорганизмов, качеством конечного продукта протеина относительно исходной фракции и условиями ферментации до сих пор еще не известны.

Вместо общеизвестных используемых исходных фракций кипящего положения 200–300°C используются определенные срезы *n*-парафинов или *n*-парафиносодержащих углеводородных смесей более высокого уровня кипения и соответственно для срезов выбирают условия наиболее благоприятного результата выращивания, достигаются значительно лучшие результаты при улучшении удельного расхода кислорода, углерода и азота в пользу чистого протеина.

Высокая концентрация биомассы достигается, если используемые срезы *n*-парафинов или *n*-парафиносодержащих смесей имеют температуру начала кипения выше на 60–120°C, в осо-

бенности на 80–100°C, т. е. необходимо более высокое число С *n*-парафинов, при одновременном сужении диапазона числа С.

Это значение достигается, если по меньшей мере 70% используемых прямоцепных углеводородов имеют число С больше, чем 15.

Продолжительность контакта ферментационной смеси с микроорганизмами (источником углерода), водяным раствором питательного вещества в ферментере не должно быть сокращено ниже определенного граничного значения. Это граничное значение составляет примерно на 1–2 ч больше, чем было бы возможно соответственно естественной скорости роста микроорганизмов при условиях углеводородной ферментации, и используется до сих пор в известных способах.

При введении нормальных смесей устанавливают возможно короткое время реакции, чтобы избежать высокой степени поглощения использованного источника углерода и подаваемого кислорода при более длинном времени реакции. Это короткое время реакции имеет недостаток, поскольку может привести к неполному созреванию клеток. Различия в биологическом общем ходе реакции синтеза клеточного вещества при использовании предлагаемого способа имеют чрезвычайно сложную природу.

В целом из этого различия вытекают результирующие преимущества, что при синтезе клеточного вещества из более длинных цельных *n*-парафиновых цепочек из клетки отдается мало энергии и продуктов обмена веществ, и что при найденном более высоком оптимуме времени реакции возможно наилучшее созревание клеток, например, в клетках с более высоким коэффициентом созревания более выгодное отношение клеточной плазмы к ядру клетки, так что в клеточном ядре относительно уменьшаются связанные неусваиваемые азотные соединения.

Очевидно, что расходуется меньше кислорода, углерода и азота для продуктов обмена веществ и неусваиваемых азотных соединений, причем более высокая степень поглощения при удлинённой продолжительности реакции, благодаря получающимся преимуществам, более чем компенсируется или по меньшей мере компенсируется.

Таким образом возможно достижение оптимального коэффициента созревания клеток микроорганизмов для получения протеина при выгодных экономических условиях.

Преимущество при применении более высокого среза получается в таком виде, что при ферментации с поглощением кислорода естественные потери углеводов при испарении уменьшаются почти наполовину.

Если рассматривать предлагаемый способ в связи с переработкой продукции из минеральных масел или на нефтеперерабатывающем или нефтехимическом комбинате, то можно получить ряд преимуществ относительно экономного использования составных частей тяжелых нефтяных фракций для получения протеинов и также в таком виде, что легкие до сих пор используемые составные части могут найти экономичное или выгодное для народного хозяйства применение.

Представлены два варианта способа при использовании в качестве производительной культуры *Candida guilliermondii*.

Использование *Candida guilliermondii* следует принимать как пример, а не как ограничение.

Принципиальные тенденции имеют доказанную термодинамическим способом силу для всех микроорганизмов, которые для синтеза клеточного вещества могут использовать преимущественно *n*-парафины.

Пример 1. В экспериментальном ферментере с котлом с мешалкой емкостью 500 л, который оснащен всеми используемыми для непрерывного выращивания микроорганизмов с поглощением кислорода устройствами и необходимой измерительной техникой, выращена *Candida guilliermondii* на очищенных *n*-парафинах при следующих условиях:

Начало кипения <i>n</i> -парафиновой фракции, °C	300
Конец кипения <i>n</i> -парафиновой фракции, °C	380
Среднее число <i>C</i> <i>n</i> -парафина	19
Ферментационная смесь в ферментере, кг	200
Продолжительность реакции ферментационной смеси, ч	8
Подача <i>n</i> -парафинов, кг/ч	1,05
Температура, °C	34
Значение pH	4,2

Концентрация питательных и микроэлементов в ферментационной смеси благодаря непрерывной дозировке при соответствующем питательном растворе поддерживалась, мг/л:

NH_4^+	100–155
PO_4^{3-}	200–300
SO_4^{2-}	50–100
K^+	60–90
Ca^{++}	10–15
Mg^{++}	20–30
Zn^{++}	3–6

Mn^{++}	3–6
Cu^+	0,02
Fe^{++}	5–7

Удельная степень обдува 70 л воздух/кг ферментационной смеси, удельное питание мощности 10 Вт/кг ферментационной смеси через мешалку (нетто).

Опыт продолжался приблизительно 10 дней, причем биомасса взята очищена и высушена для анализа и отдела для соответствующего опыта, вследствие чего достигнуты следующие результаты (столбец 2).

В табл. 1 даны для сравнения результаты обычной ферментации со смесью *n*-парафинов при уровне кипения 200–380°C и обычной продолжительностью реакции 4 ч.

Пример 2. На опытной станции, согласно примеру 1 непрерывно выращена *Candida guilliermondii*.

Степень обдува 70 л воздух/кг ферментационной смеси, удельное питание мощности через мешалку 8 Вт/кг ферментационной смеси. Концентрация питательных и микроэлементов поддерживалась аналогично примеру 1.

Температура, °C	33
Значение pH	4,2
Продолжительность реакции, ч	7

Использован выделенный из нефти газойль при уровне кипения 295–370°, который содержит 20,1 вес.% *n*-парафинов со средним числом *C* – C_{18} в диапазоне C_{15} – C_{23} . Концентрация газойля в ферментационной среде составляет 26,5%. Опыт проводят 8 дней. После ферментации неизрасходованный газойль отделен посредством непрерывно работающего дискового сепаратора. В высокой степени освобожденная от газойля дрожжевая суспензия была высушена, затем отдельными порциями экстрагирована с органической смесью растворителя (бензин-изопропанол), высушена и соответствующим образом анализируется.

Получены следующие результаты (столбец 2)

В столбце 1 даны для сравнения результаты известного способа с выделением газойля при уровне кипения 230–350°C (табл. 2). Продолжительность реакции составляет 4 ч. Концентрация газойля 14% при содержании *n*-парафинов в выделенном газойле 19,8%. Среднее число *C* в выделенном газойле, содержащем *n*-парафины, составляет C_{15} в диапазоне C_9 – C_{22} .

Т а б л и ц а 1

Показатели	1	2
Концентрация биомассы, г/кг	17,0	40,5
Выход биомассы, кг/ч	0,85	1,01
Удельный расход кислорода, кг O ₂ /кг высокотемпературной суспензии (ВТС)	2,5	2,1
Удельный расход <i>n</i> -парафина, кг <i>n</i> -парафина/кг ВТС	1,23	1,04
Содержание сырого протеина, %	58,0	64,0
Чистый протеин, %	47,0	56,0
Содержание израсходованного азота в чистом протеине, %	81,0	87,5

Т а б л и ц а 2

Показатели	1	2
Концентрация биомассы, г/кг	14,2	28,1
Выход биомассы, кг/ч	0,71	0,804
Удельный расход кислорода, кг O ₂ /кг ВТС	2,4	2,12
Удельный расход <i>n</i> -парафинов, кг <i>n</i> -парафинов/кг ВТС	1,13	1,0
Содержание сырого протеина, %	63,0	67,0
Содержание чистого протеина, %	51,7	57,5
Содержание азота в чистом протеине, %	82,0	86,0

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ культивирования микроорганизмов на прямоцепных углеводородах для получения протеина одноклеточных организмов улучшенным вызреванием клеток микроорганизмов, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что примененная *n*-парафиновая или фракция, содержащая *n*-парафины, по сравнению с до сих пор применяемыми

50 фракциями, с температурой начала кипения 200–380°С имеет на 60–120°С, особенно 80–100°С, высшую температуру начала кипения и тем самым высшее среднее число атомов угле- рода *n*-парафинов (не менее 17), причем диа- пазон числа атомов углерода ограничивается так, что по крайней мере 70% применяемых прямоцепных углеводородов имеет больше 15 атомов углерода и длительность выдержи

ферментационной смеси, состоящей из микроорганизмов, источника углерода, водной питательной среды, в ферментере составляет не менее 5 ч.

Признано изобретением по результатам экспертизы, осуществленной ведомством по изобретательству Германской Демократической Республики.

Редактор Н. Рогулич

Составитель М. Ларина
Техред Т. Маточка

Корректор Г. Огар

Заказ 5260/34

Тираж 505

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4