



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

237777

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 25/00

(22) Přihlášeno 11 09 81
(21) (PV 6727-81)

(89) 908 092, SU

(40) Zveřejněno 19 11 84

(45) Vydáno 15 09 86

(75)
Autor vynálezu

KUKANOVA ANNA JAKOVLEVNA, ŽDANOV VIKTOR GRIGORJEVIČ, STĚPANOV
ANATOLIJ IVANOVICH, PANOVA VALENTINA ALEXANDROVNA, MOSKVA (SSSR)

(54) Způsob výroby riboflavinu

Uvedený způsob výroby riboflavinu je založen na využití produkčních mikroorganismů kmene *Bacillus subtilis* VNII genetika 304 nebo VNII genetika 304a získaných z rodového kmene dosahujícího nejvyšší syntézy riboflavinu. Maximální výtěžek riboflavinu v předloženém způsobu je 1 000 mg/l za 48 hodin růstu. Ve srovnání s metodou přípravy riboflavinu kulturou hub *Eremothecium ashbyii*, dovoluje předložený způsob až dvojnásobně zkrátit dobu fermentace, přičemž se využije jednodušší a dostupnější surovina pro živnou půdu a zmenší se možnost znečištění kultury infikující mikroflorou. Ve srovnání s prototypem (pat. USA 3,900.368), kde je využívána kultura *Bacillus subtilis* umožňuje předložený způsob zvýšení výtěžku riboflavinu o 40 % a dovoluje využití jednoduchých syntetických nebo komplexních živných půd, neobsahujících drahé nebo deficitní komponenty.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способу получения рибофлавина (B_2).

Витамин B_2 широко используется в сельском хозяйстве, в основном, в качестве кормовых добавок сельскохозяйственным животным, а кристаллический рибофлавин применяется в пищевой и фармацевтической промышленности. Рибофлавин получают химическим способом, а также путем микробиологического синтеза.

Известен способ микробиологического производства рибофлавина путем использования культуры гриба *Ermothescium ashbyii* на соевой ферментационной среде, содержащей гидрол и кукурузный экстракт (I). За 96 час процесса ферментации накапливается до 2000 мг/л B_2 . К недостаткам такого способа следует отнести длительный период роста культуры, вследствие чего увеличивается продолжительность ферментации, и повышенную чувствительность к загрязнению посторонней микрофлорой.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому эффекту является способ получения рибофлавина-витамина B_2 путем культивирования его продуцентов-микроорганизмов вида *Bacillus subtilis* на питательной среде, содержащей 8% глюкозы в качестве источника углерода, минеральные соли и источники ростовых веществ: дрожевой

237777

экстракт, пептон, глутаминовую кислоту, препараты РНК, пурины и аналоги пуринов (2). За 44 часа процесса ферментации накапливалось до 560 мг/л рибофлавина.

К достоинствам данного способа производства витамина относится высокая скорость роста бактерий и, следовательно, сокращение времени ферментации.

Недостатками способа является сравнительно низкий уровень активности, достигаемый культурой *Bacillus subtilis* и необходимость в дорогостоящих и дефицитных компонентах ферментационной и ростовой сред.

Целью настоящего изобретения является повышение выхода рибофлавина.

Поставленная цель достигается тем, что в способе получения рибофлавина, предусматривающем глубинное культивирование продуцирующих его микроорганизмов вида *Bacillus subtilis* в условиях аэрации на питательной среде, содержащий источник углерода, азота, необходимые минеральные соли в присутствии источников ростовых веществ, в качестве продуцирующих рибофлавин микроорганизмов из вида *Bacillus subtilis* используют штамм *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-304 или ВНИИгенетика-304а.

При этом культивирование ведут на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода сахар-сырец или мелассу, а в качестве источников ростовых факторов используют белково-витаминный концентрат или его гидролизат или автолизат, или пищевые дрожжи, или дрожжевой экстракт.

Используемые штаммы-сверхсинтетики сконструированы генетическим методом из независимо полученных мутаций, каждая из которых приводит к сверхсинтезу витамина: *ros^r-rib c-AGR* (устойчивость к розеофлавинозу *ros^r* мутация в гене-регуляторе *rib c* устойчивость в 8-азагуанину). Затем проводилась мутагенная обработка нитрозогуанидином, нитрозометилмочевинной, облучение ультрафиолетом и селекция активных вариантов на ферментационной среде.

237777

Штамм ВНИИгенетика-304-прототроф, штамм ВНИИгенетика-304а - ауксотроф с неидентифицированной ростовой потребностью. Оба штамма олигоспорогенные, на всех средах количество спор по сравнению с исходным штаммом снижено на 3-4 порядка.

Культурально-морфологическая характеристика штаммов-продуцентов рибофлавина *Vac. subtilis* ВНИИгенетика-304 и ВНИИгенетика-304а.

	Штамм ВНИИгенетика 304	Штамм ВНИИгенетика 304а
I	2	3
Морфология под микроскопом	Спорообразующая граммположительная палочка длиной 2-3 μ	
Морфология на разных средах		
Мясо-пептонный агар (МПА)	На 1-2 сутки роста при 28-37°C образует колонии с неровным краем, звездчатые, диаметром 3-4 мм, поверхность гладкая, блестящая, цвет желтоватый.	
Мясо-пептонный бульон (МПБ)	Рост без качания на поверхности бульона в виде пленки.	
Минимальная среда Спицайзена с глюкозой	На 2 сутки роста образует колонии диаметром 2-3 мм, ярко-желтого цвета, флуорисцируют в Уф-лучах желтым цветом, колонии круглые с гладким краем, блестящие	Не растет на минимальной среде
Физиологические свойства	Растет при 20-42°C, оптимум 37°C pH 5,0-9,0, оптимум 7,0-8,0. Углеводы: хорошо утилизируют глюкозу, сахарозу, крахмал. Спирты: утилизируют этанол, сорбитол. Источники азота: хорошо усваивает аммоний, мочевины, нитраты. Желатину разжижает.	

Способ осуществляют следующим образом: культуру ВНИИгенетика-304 или ВНИИгенетика-304а выращивают на агаризованной среде Хоттингера или мясо-пептонном агаре (МПА) в течение 1-2 суток при температуре 28-37°C. Затем суспензию клеток передают в колбы с посевной средой, содержащей мелассу, белково-витаминный концентрат (БВК), и минеральные соли, либо в картофельную посевную среду, либо в МПБ. Посевной материал выращивают в течение 17-24 часов на качалке 200 об/мин. Затем посевной материал передают в количестве 5-10% в основную ферментационную среду. Процесс ферментации осуществляют в колбах Эрленмейера на качалке, либо в ферментере при интенсивном перемешивании и аэрации в течение 46-50 часов при температуре 37°C, pH 6,5-7,5 (в начале ферментации) на питательной среде, содержащей источники углерода, например глюкозу, сахарозу, сахар-сырец, мелассу, крахмал; источники минерального азота, например соли аммония, мочевины, нитраты; соли фосфора, например фосфата калия, аммония и другие соли; соли Mn^{++} ($MnCl_2$, $MnSO_4$), а также источники ростовых факторов, например биомассу кормового дрожжевого белка (БВК), гидролизаты и автолизаты БВК, пищевые дрожжи, дрожжевой экстракт, кукурузную и соевую муку, кукурузный экстракт, гидролизат казеина, пептон. Через 46-50 часов ферментации в культуральной жидкости накапливается 700-1000 мг/л рибофлавина.

Способ иллюстрируется примерами:

Пример I.

Односуточную культуру *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-304, выращенную на косяках МПА, пересевают на жидкую посевную среду, содержащую 6% мелассы, 1% БВК, и минеральные соли. Посевная среда готовится разведением пополам стерильной водой ферментационной среды, состав которой приведен ниже. Выращивание посевного материала проводят в колбах Эрленмейера, объемом 750 мл (объем среды 25-100 мл), на качалке 200 об/мин при 37°C

23777

в течение 17 часов и передают в количестве 10% в ферментационную среду следующего состава:

меласса	12%
БВК	2%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2%
K_2HPO_4	1,4%
KH_2PO_4	0,6%
MgSO_4	0,01%
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (цитрат натрия)	0,1% pH 7,0-7,2.

Ферментацию осуществляют в колбах Эрленмейера, объемом 750 мл (объем среды 25 мл) на качалке 200 об/мин при 37°C. Через 48 часов ферментации культуральная жидкость содержит 700-1000 мг/л рибофлавина.

Пример 2.

Аналогичен примеру 1, только используют штамм *Bacillus subtilis* -304a.

Пример 3.

В качестве продуцента также используют штаммы ВНИИгенетика-304. Ферментационная среда и условия ферментации как указано в примере 1. Отличием является состав посевной среды, которая готовится следующим образом: картофель очищают от кожуры, режут на куски и заливают небольшим количеством воды, после чего стерилизуют при 0,8-1 атм. Посевную среду засевают с косяков МПА, культура растет в колбах на 750 мл (объем среды 50-100 мл) на качалке при 37°C в течение 24 часов. Ферментационную среду засевают 10% посевного материала, ферментацию проводят как в примере 1.

Через 48 часов ферментации культуральная жидкость содержит 700-1000 мг/л рибофлавина.

Пример 4.

То же как в примере 3, только используют штамм *Bacillus subtilis* -304a.

Пример 5.

Культура, посевная среда, условия ферментации как в примерах I, 2 и 3. Отличием является состав ферментационной среды, где: сахароза (или сахар-сырец) 12-14%

БВК 3-4%

минеральные соли как в примере I.

Через 48 часов ферментации культуральная жидкость содержит 700-1000 мг/л рибофлавина.

Пример 6.

Односуточную культуру штамма ВНИИгенетика-304 с косяков МПА переносят в посевную среду МПБ, на которой 8-10 часов на качалке при 37°C готовится посевной материал. В количестве 10% посевной материал переносится в ферментационную среду, имеющую состав:

глюкоза	8%
дрожжевой экстракт	0,5%
гидролизат казеина	0,02%

(можно заменить пептоном)

минеральные соли как в примере I

pH 7,1-7,2

Ферментация длится 44-50 часов при температуре 37°C в колбах на качалке 200 об/мин.

Через 48 часов ферментации культуральная жидкость содержит 700-1000 мг/л рибофлавина.

Максимальный выход рибофлавина в предлагаемом способе составляет 1000 мг/л за 48 часов роста культуры на синтетических или комплексных средах, что на 40% превосходит активность штаммов-продуцентов в прототипе. Кроме того, в отличие от указанного прототипа, используют более простые среды, не содержащие дорогостоящих компонентов.

Получение рибофлавина предлагаемым способом обладает рядом преимуществ по сравнению с действующими в настоящее время производством рибофлавина с помощью

аскомицета *Eremothecium ashbyii* (базовым способом). Помимо уже упоминавшейся меньшей требовательности к составу питательных сред, в предлагаемом способе почти вдвое сокращается время ферментации (48 часов вместо 72-96 часов), а также уменьшается возможность загрязнения культуры посторонней микрофлорой.

По сравнению с прототипом предлагаемый способ характеризуется более высоким уровнем выхода продукта и возможностью использовать простые и доступные по составу среды.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения рибофлавина путем глубинного культивирования продуцирующих его микроорганизмов вида *Bacillus subtilis* в условиях аэрации на питательной среде, содержащей источник углерода, азота, необходимые минеральные соли в присутствии источников ростовых веществ, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода рибофлавина, в качестве продуцирующих рибофлавин микроорганизмов из вида *Bacillus subtilis* используют штамм *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-304 или ВНИИгенетика-304а.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование ведут на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода сахар-сырец или мелассу, а в качестве источников ростовых факторов используют белково-витаминный концентрат или его гидролизат или автолизат, или пищевые дрожжи, или дрожжевой экстракт.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе:

1. Авторское свидетельство СССР № 389132, кл. C12D 5/04, 1969.

2. Патент США № 3900368, кл.195-96, опублик.1976.

АННОТАЦИЯ

Предлагаемый способ получения рибофлавина основан на использовании в качестве продуцирующих его микроорганизмов штаммов *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-304 или ВНИИгенетика-304а, полученных из родительского штамма, не обладающего сверхсинтезом рибофлавина. Максимальный выход рибофлавина в предлагаемом способе составляет 1000 мг/л за 48 часов роста. По сравнению с методом получения рибофлавина на основе культуры гриба *Ernestomyces arbutus*, предлагаемый способ позволяет почти вдвое сократить время ферментации, кроме того, используется более простое и доступное сырье для сред и уменьшается возможность загрязнения культуры посторонней микрофлорой. По сравнению с прототипом (патент США № 3.900.368), где используется культура *Bacillus subtilis*, предлагаемый способ на 40% увеличивает выход рибофлавина и позволяет использовать простые синтетические или комплексные среды, не содержащие дорогостоящих или дефицитных компонентов.

237777

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby riboflavinu hloubkovou kultivací produkčních mikroorganismů druhu *Bacillus subtilis* za aerace na živné půdě obsahující zdroj uhlíku, dusíku, nutné minerální soli v přítomnosti zdrojů růstových látek, vyznačující se tím, že kvůli zvýšení výtěžku riboflavinu se používá jako riboflavin produkujících mikroorganismů kmene *Bacillus subtilis* VNII genetika - 304 nebo genetika 304a.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kultivace provádí na živné půdě, obsahující jako zdroj uhlíku surový cukr nebo melasu a jako zdroj růstových faktorů se použije biomasa krmných kvasnic nebo jejich hydrolyzát nebo autolyzát, pekařské droždí nebo kvasničný extrakt.

Uznáno vynálezem na základě výsledků expertizy, provedené Státním výborem pro vynálezy a objevy SSSR, Moskva, SU.