

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

ВОССОЮЗНАЯ
ПАТЕНТНО-ПРАВОВАЯ
СЛУЖБА МБА

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

(11) 767191

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву —

(22) Заявлено 11.11.77 (21) 2542093/28-13

(51) М. Кл.³

с присоединением заявки № —

С 12 В 1/00

(23) Приоритет —

Опубликовано 30.09.80. Бюллетень № 36

(53) УДК 663.18
(088.8)

Дата опубликования описания 30.09.80

(72) Авторы
изобретения

С.С.Рылкин, А.В.Шульга, А.Н.Шкидченко и В.С.Орлова

(71) Заявитель

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР

(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способу культивирования микроорганизмов.

Известен способ культивирования микроорганизмов на жидких питательных средах, содержащих источники углерода, азота, фосфора и минеральные соли, предусматривающий подсев в ферментер из инокулятора той же культуры [1].

Недостатками известного способа являются сравнительно высокие значения выхода целевых продуктов и производительности ферментеров.

Целью изобретения является повышение выхода целевых продуктов и увеличение производительности ферментеров.

Указанная цель достигается тем, что по предлагаемому способу подсев ведут культурой, адаптированной к одному или нескольким углеродосодержащим компонентам культуральной среды.

В зависимости от конечной цели культивирования адаптацию осуществляют различными способами: путем выращивания культуры в инокуляторе на исходной питательной среде в

периодическом режиме до состояния, в котором она переходит к утилизации продуктов метаболизма; путем выращивания культуры в инокуляторе на питательной среде, содержащей в качестве основного источника углерода один или несколько продуктов метаболизма; путем выращивания культуры в инокуляторе на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода один из смеси источников углерода питательной среды, используемой в ферментере.

15 Подсев в ферментер культуры, адаптированной к одному или нескольким углеродосодержащим компонентам культуральной среды, приводит к тому, что в ферментере одновременно развиваются две или несколько фракций одной и той же культуры, различных по своему отношению к субстратам питательной среды. Это приводит к более полной утилизации углеродосодержащих компонентов среды, а следовательно, к повышению экономического коэффициента или выхода целевых продуктов.

Предлагаемый способ поясняется 30 следующими примерами.

Пример 1. Культуру дрожжей *Candida tropicalis* ИБФМ-303 засевают в ферментер АК-10 на 6 л модифицированной среды Ридера следующего состава, (г/л):

Глюкоза	20
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	8,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	8,0
KCl	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0006
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0008
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,00008
Дрожжевая вода	20 мл

Выращивание проводят в периодическом режиме. Через 12 ч глюкозу в среде не обнаруживают. Выход культивирования биомассы 8,5 г/л. В течение последующих 6 ч концентрация биомассы существенно не изменяется. Экономический коэффициент 44%.

По предлагаемому способу культуру дрожжей в инокуляторе выращивают на указанной выше среде 36 ч в периодическом режиме. За это время культура переходит к потреблению продуктов метаболизма. В основном ферментере АК-10 ведут выращивание культуры в том же режиме. Через 12 ч в этот ферментер подсевают культуру из инокулятора в количестве 600 мл (10% от объема культуральной среды). Через 6 ч концентрация биомассы в основном ферментере 11,5 г/л (за вычетом подсеянной биомассы), а экономический коэффициент 57,5%.

Пример 2. Культуру бактерий *Aerobacter aerogenes* выращивают с целью получения ацетона со скоростью протока 0,2 ч⁻¹ в ферментере АК-10 на 5 л среды следующего состава, г/л: глюкоза 10,0, пептон Дифко 5,0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2,0, KH_2PO_4 2,0, CaCl_2 0,2, Na_2SiO_3 0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ по 0,0005. Режим выращивания: pH 6,0, температура 37°C, аэрация 5 л/ч, скорость мешалки 800 об/мин. На выходе из ферментера культуральная жидкость содержит $20,4 \cdot 10^6$ бактериальных клеток /мл. Выход ацетона 0,2 г/л.

С целью повышения выхода ацетона используют систему двух последовательно соединенных инокуляторов, каждый из которых соединен с основным ферментером. Рабочий объем первого инокулятора 1 л, второго 1,5 л. В обоих инокуляторах ведут выращивание культуры *Aerobacter aerogenes* в периодическом режиме в течение 12 ч на вышеуказанной среде за исключением того, что во втором инокуляторе в качестве источника углерода используют 2% этилового спирта.

Через 12 ч включают проток из первого инокулятора в основной ферментер со скоростью 0,2 ч⁻¹ и в течение 5 ч засевают его. Одновременно в первый инокулятор с той же скоростью подают свежую питательную среду. Затем проток из первого инокулятора переключают во второй инокулятор, из которого начинают непрерывный подсев адаптированной культуры к этиловому спирту в основной ферментер. Туда же подают свежую питательную среду со скоростью 0,2 ч⁻¹. На выходе из ферментера культуральная жидкость содержит $24,3 \cdot 10^7$ бактериальных клеток/мл. Выход ацетона 1,3 г/л.

Пример 3. Культуру *Candida tropicalis* ИБФМ-303 выращивают в 5 л модифицированной среды Ридера, содержащей, г/л: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 8,0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 8,0, KCl 0,6, NaCl 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0004, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0004, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0002, дрожжевой воды 20 мл, глюкозы 10,0, мальтозы 10,0 в ферментере АК-10 при скорости протока 0,25 ч⁻¹. Концентрация веществ на выходе из ферментера: глюкоза 0,01%, мальтоза 0,90%, биомасса 6,94 г/л, экономический коэффициент 34,7%.

По предлагаемому способу процесс ведут, используя бактерию из трех инокуляторов (объем каждого 1,5 л), соединенных последовательно. Второй и третий инокуляторы соединены с основным ферментером, объем которого 6 л.

Дрожжи засевают в первый инокулятор и культивируют в периодическом режиме на вышеуказанной среде в течение 12 ч. Затем начинают подачу свежей питательной среды со скоростью протока 0,2 ч⁻¹ и с той же скоростью подают культуральную жидкость из первого инокулятора во второй. Наполнение второго инокулятора происходит за 7,5 ч, после чего культивирование продолжают в периодическом режиме еще 7 ч. Поскольку в первом инокуляторе происходит почти полное потребление глюкозы, источником углерода во втором инокуляторе является главным образом мальтоза. Дрожжи, выходящие из второго инокулятора, адаптированы к мальтозе. Из второго инокулятора культуральную среду подают по 150 мл/ч в основной ферментер и третий инокулятор. В третьем инокуляторе культивирование осуществляют в периодическом режиме 36 ч. При этом происходит адаптация культуры к продуктам метаболизма мальтозы. Затем третий инокулятор подключают к основному ферментеру со скоростью подачи культуральной среды 150 мл/ч.

Таким образом в основной ферментер подсевают смесь исходной и адаптированной к мальтозе культур из второго инокулятора и адаптированной к продуктам метаболизма мальтозы культуры из третьего инокулятора. Кроме того, в основной ферментер подают свежую питательную среду со скоростью потока $0,25 \text{ ч}^{-1}$.

По достижении устойчивого проточного режима работы ферментера на выходе определяют концентрацию веществ: глюкоза $0,03\%$, мальтоза $0,01\%$, биомасса $14,87 \text{ г/л}$. Экономический коэффициент $74,35\%$.

Пример 4, Культуру *Lactobacterium delbrückii* выращивают периодическим способом при аэрации

1 л/л в минуту при 30°C , на ячменном сусле 3°B , начальном значении $\text{pH}=6,7$ и при исходной концентрации биомассы, взятой из экспоненциальной фазы роста, $0,34 \cdot 10^6 \text{ кл/мл}$. Через 12 ч культивирования выход молочной кислоты составляет $49,8\%$. Процесс завершается через 26 ч. Выход молочной кислоты 90% (см. таблицу).

10 По предлагаемому способу выращивание культуры *Lactobacterium delbrückii* ведут в ферментере аналогичным образом 3 ч, после чего проводят посев культуры из инокулятора, в котором культивирование ведут на исходной среде 26 ч. Процесс в основном ферментере заканчивается через 18 ч.

Время культивирования, ч	Потребленный сахар, тМ триоз		Молочная кислота, тМ		Выход молочной кислоты от потреб. сахара, %	
	Без посева	С посевом	Без посева	С посевом	Без посева	С посевом
12	2,77	2,81	1,38	1,97	49,8	70,0
18	2,95	3,12	2,13	2,87	72,2	91,9
26	3,11	-	2,83	-	90,9	-

Предлагаемый способ позволяет значительно повысить производительность ферментеров, увеличить выход целевых продуктов и сократить время культивирования.

Формула изобретения

1. Способ культивирования микроорганизмов на жидких питательных средах, содержащих источники углерода, азота, фосфора и минеральные соли, предусматривающий посев в ферментер из инокулятора той же культуры, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода целевых продуктов, посев ведут культурой, адаптированной к одному или нескольким углеродосодержащим компонентам культуральной среды.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что адаптацию осуществляют путем выращивания культуры

35 в инокуляторе на исходной питательной среде в периодическом режиме до состояния, в котором она переходит к утилизации продуктов метаболизма.

40 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что адаптацию осуществляют путем выращивания культуры в инокуляторе на питательной среде, содержащей в качестве основного источника углерода один из продуктов метаболизма.

45 4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что адаптацию осуществляют путем выращивания культуры в инокуляторе на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода один из смеси источников углерода исходной питательной среды.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

55 1. "Непрерывное культивирование микроорганизмов". Редакторы Э.П.Малек, Э.Фенцель, М., Пищепромиздат, 1968, с. 106.