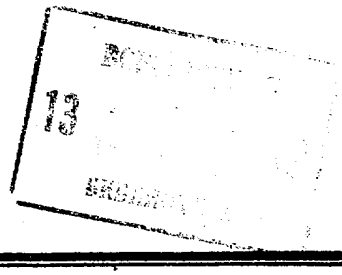
СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 908092 A

3 (51) C 12 P 25/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ



# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 2981423/28-13
(22) 04.09.80
(46) 30.12.84. Бюл. № 48
(72) А.Я. Куканова, В.Г. Жданов, А.И. Степанов и В.А. Панова
(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
(53) 577.16 (088.8)

(56) 1. Авторское свидетельство СССР № 389132, кл. C 12 D 5/04, 1969.
2. Патент США № 3900368, кл. 195-96, опублик. 1976.

(54)(57) 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, о т л и ч а ю щ и й с я 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, о т л и ч а ю щ и й с я 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.

SU (11) 908092 A

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 Eremothecium ashbyii на соевой ферментационной среде, содержащей гидрол и кукурузный экстракт [1]. За 96 ч 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 дрожжевой экстракт, пептон, глутаминовую кислоту, препараты РНК, пурины и аналоги пуринов [2]. За 44 ч процесса ферментации накапливалось до 560 мг/л рибофлавина.

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

Целью 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, содержащей источник углерода, азота, необходимые минеральные соли в присутствии источников ростовых веществ, в качестве продуцирующих рибофлавин микроорганизмов из вида Bacillus subtilis используют штамм Bacbillus 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 генетическими методами из независимо полученных мутаций, каждая из которых приводит к сверхсинтезу витамина: $ros^r$ - ribc - AGR (устойчивость к розеофлавину $ros^{\mu}$, мутация в генерегуляторе ribs, устойчивость к 8-азагуанину AGH). Затем проводилась мутагенная обработка нитрозогуанидином, нитрозометилмочевиной, облучение ультрафиолетом и селекция активных вариантов на ферментационной среде.

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.

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°С. Затем суспензию клеток передают в колбы с посевной средой, содержащей мелассу, БВК и минеральные соли, либо в картофельную посевную среду, либо МПБ. Посевной материал выращивают в течение 17-24 ч 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 ч при температуре 37°С, pH 6,5-7,5 (в начале ферментации) на питательной среде, содержащей источники углерода, например глюкозу, сахаро-

зу, 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.

Пример 1. Односуточную культуру BaciIIus subtiIis ВНИИгенетика-304, выращенную на косяках МПА, пересеивают 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°С в течение 17 часов и передают в количестве 10% в ферментационную среду следующего состава, %:

| | |
|---|---|
| Меласса | 12 |
| БВК | 2 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0,2 |
| $K_2HPO_4$ | 1,4 |
| $KH_2PO_4$ | 0,6 |
| $MgSO_4$ | 0,01 |
| $Na_2C_6H_3O_7$ (цитрат Na) | 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°С. Через 48 ч ферментации культуральная жидкость содержит 700-1000 мг/л рибофлавина.

Пример 2. Аналогичен примеру 1, только используют штамм BaciIIus subtiIis-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°С в течение 24 ч. Ферментационную среду засевают 10% посевного материала, ферментацию проводят, как в примере 1.

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

Пример 4. Так же как в примере 3, только используют штамм BaciIIus subtiIis-304a.

Пример 5. Культура, посевная среда, условия ферментации, как в примерах 1,2 и 3. Отличием является состав ферментационной среды,%:

| | |
|---|---|
| Сахароза (или сахар-сырец) | 12-14 |
| БВК | 3-4 |

Минеральные соли, как в примере 1.

Через 48 ч 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 ч на качалке при 37°С готовится посевной материал. В количестве 10% посевной материал переносится в ферментационную среду, имеющую состав,%:

| | |
|---|---|
| Глюкоза | 8 |
| Дрожжевой экстракт | 0,5 |
| Гидролизат казеина или пептон | 0,02 |
| Минеральные соли | как в примере 1. |

pH 7,1-7,2. Ферментация длится 44-50 ч при 37°С в колбах на качалке 200 об/мин. Через 48 ч ферментации культуральная жидкость содержит 700-1000 мг/л рибофлавина.

Максимальный выход рибофлавина в предлагаемом способе составляет 1000 мг/л за 48 ч 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 действую-

щими в настоящее время производством рибофлавина с помощью аскомицета Eremotheaum ushbyii (базовым способом). Помимо уже упоминавшейся меньшей требовательности к составу питательных сред в предлагаемом способе почти вдвое сокращается время ферментации (48 ч вместо 72-96 ч), 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.

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

| Штамм ВНИИгенетика-304 | Штамм ВНИИгенетика-304а |
|---|---|
| Морфология под микроскопом | Спорообразующая граммположительная палочка длиной 2-3$\mu$ |
| Морфология на разных средах | |
| Мясо-пептонный агар (МПА) | На 1-2 сутки роста при 28-37°С образует колонии с неровным краем, звездчатые, диаметром 3-4 мм, поверхность гладкая, блестящая, цвет желтоватый. Рост по уколу умеренный, в основном на поверхности среды. |
| 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, флоуресцируют в УФ-лучах желтым цветом, колонии круглые с гладким краем, блестящие / Не растет на минимальной среде |
| Физиологические свойства | Растет при 20-42°С, оптимум 37°С pH 5,0-9,0, оптимум 7,0-8,0.<br>Углеводы: хорошо утилизируют глюкозу, сахарозу, крахмал.<br>Спирты: утилизируют этанол, сорбитол<br>Источники азота: хорошо усваивает аммоний, мочевину, нитраты.<br>Желатину разжижает. |

Редактор С. Титова Техред С.Мигунова Корректор А. Ильин

Заказ 9246/4 Тираж 521 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