



(19) **UA** (11) **59 862** (13) **A**
(51)МПК ⁷ **С 12С 1/00, 13/06**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ДЕКЛАРАЦИОННОМУ ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 20021210628, 26.12.2002

(24) Дата начала действия патента: 15.09.2003

(46) Дата публикации: 15.09.2003

(72) Изобретатель:

Осейко Николай Иванович, UA,
Веренко Валентин Дмитриевич, UA,
Украинец Анатолий Иванович, UA

(73) Патентовладелец:

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ, UA

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Способ получения биологически-активных веществ включает подготовку питательной среды, подготовку культуры для выращивания, процесс биосинтеза и выделения целевых веществ. При этом биосинтез выполняют с использованием питательной среды, отделенной от биомассы клеток бактериологической мембраной.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2003, N 9, 15.09.2003. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **59 862** (13) **A**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12C 1/00, 13/06**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) DESCRIPTION OF DECLARATIVE PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION

(21), (22) Application: 20021210628, 26.12.2002

(24) Effective date for property rights: 15.09.2003

(46) Publication date: 15.09.2003

(72) Inventor:

Oseiko Mykola Ivanovych, UA,
Verenko Valentyn Dmytrovych, UA,
Ukrainets Anatolii Ivanovych, UA

(73) Proprietor:

NATIONAL UNIVERSITY OF FOOD
TECHNOLOGIES, UA

(54) METHOD FOR PRODUCING BIO-ACTIVE SUBSTANCES

(57) Abstract:

Method for producing bioactive substances includes preparing nutrient medium, preparing the culture for cultivation, process of biosynthesis and separation of target substances. At that, biosynthesis is carried out with application of nutrient medium; this is separated from the

biomass of the cells with bacteriologic membrane.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2003, N 9, 15.09.2003. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **59 862** (13) **A**
(51)МПК ⁷ **С 12С 1/00, 13/06**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
20021210628, 26.12.2002

(24) Дата набуття чинності: 15.09.2003

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.09.2003

(72) Винахідник(и):

Осейко Микола Іванович, UA,
Веренко Валентин Дмитрович, UA,
Українець Анатолій Іванович, UA

(73) Власник(и):

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ, UA

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Спосіб отримання біологічно-активних речовин
включає підготовку живильного середовища,
підготовку культури для вирощування, процес

біосинтезу і виділення цільових речовин. При
цьому біосинтез виконують з використанням
живильного середовища, яке відокремлене від
біомаси клітин бактеріологічною мембраною.

Опис винаходу

Винахід відноситься до харчової, мікробіологічної та фармацевтичної промисловості і призначається для одержання біологічно-активних речовин, продуктів функціонального призначення, лікарських засобів тощо з використанням системи КТІОЛ (Система КТІОЛ для виробництва якісної і конкурентоспроможної продукції /Наукові праці УДУХТ, №10 (спецвипуск), 4.2, Матеріали 7-ї Міжнародної науково-технічної конференції "Пріоритетні напрями впровадження у харчову промисловість сучасних технологій, обладнання і нових видів продуктів оздоровчого та спеціального призначення", Київ, УДУХТ 23-25 жовтня 2001. - С.65-66).

Відомі способи отримання біологічно-активних речовин, які включають підготовку поживного середовища, підготовку культури для вирощування, процес біосинтезу і виділення цільових речовин з використанням відомих прийомів розділення фаз, їх концентрування тощо (Управляемый микробный синтез /Межиня Г.Р., Цедере Э.В. //Рига, Зинатне, 1973, С.85-92; Основу культивирования микроорганизмов и клеток / Перт Дж.//М.: Мир, 1977 тощо).

В відомих біотехнологічних процесах на стадії отримання і виділення цільового продукту припадає значна частина експлуатаційних витрат. Так наприклад співвідношення витрат на обробку продукту до витрат на його біосинтез становить при отриманні ферментів - 2:1, при отриманні антибіотиків (пеніциліну) 1:1 тощо. Тому актуальним є створення нових способів біосинтезу, які дозволять розробити нові біотехнології отримання цільових продуктів при зменшенні загальних витрат на їх виробництво.

Найбільш близьким до заявленого винаходу за спільністю технічних ознак, вибраний як прототип, є спосіб отримання біологічно-активного продукту у модульному апараті. (Біосинтез лізину у модульному апараті, ХіПП, 7/2001, с.17). Згідно способу отримання біологічно-активних речовин виконується шляхом підготовки поживного середовища, підготовки культури для вирощування, процес біосинтезу та виділення лізину.

До недоліків способу слід віднести значні витрати стерильного повітря на виконання процесу аерації поживного середовища (1:1), періодичність процесу біосинтезу та пов'язані з цим додаткові експлуатаційні і загальні витрати.

В основу винаходу поставлена задача створення способу отримання біологічно-активних речовин шляхом введення нових умов процесу біосинтезу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі отримання біологічно-активних речовин, який включає підготовку поживного середовища, підготовку культури для вирощування, процес біосинтезу і виділення цільових речовин, біосинтез виконують з використанням поживного середовища, яке відокремлене від біомаси клітин бактеріологічною мембраною, із споживанням мікроорганізмами кисню із газової суміші.

Крім того вирішується також і тим, що процес біосинтезу виконується в біореакторі модульної конструкції, який включає по меншій мірі два модулі.

Крім того вирішується також і тим, що для забезпечення умов біосинтезу вміст поживних речовин у середовищі підтримується за рахунок введення свіжого середовища.

Крім того вирішується також і тим, що вміст цільових продуктів у поживному середовищі підтримується за рахунок постійного оновлення середовища у часі при чому збільшення біомаси культури не контролюється.

Крім того вирішується також і тим, що у якості газової суміші використовують по меншій мірі газову суміш повітря.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає у тому, що вказана сукупність ознак забезпечує можливість отримання біологічно-активних речовин і створює можливість використання біологічно-активних речовин у продуктах функціонального призначення.

Такий результат забезпечується наступним. Відомо, що біологічно-активні речовини отримують шляхом підготовки поживного середовища, підготовки культури для вирощування, проведення процесу біосинтезу і наступного виділення цільових речовин. Але не відомі очевидні закономірності способу біосинтезу і відповідні технологічні прийоми для вирішення поставленої задачі.

Спосіб і технологічні прийоми, що пропонуються, визначені експериментами. В результаті цього встановлено, що отримання біологічно-активних речовин у порівнянні з відовими технологіями забезпечується при веденні процесу біосинтезу з використанням поживного середовища, яке відокремлене від біомаси клітин бактеріологічною мембраною, із споживанням мікроорганізмами (клітинами культури) кисню із газової суміші, яка включає по меншій мірі газову суміш повітря.

Важливим фактором впливу на отримання цільових продуктів є те, що процес біосинтезу виконується в біореакторі модульної конструкції, який включає по меншій мірі два модулі. Для забезпечення умов біосинтезу вміст поживних речовин у середовищі підтримується за рахунок введення свіжого середовища, а вміст цільових продуктів у поживному середовищі підтримується за рахунок постійного оновлення середовища у часі при чому збільшення біомаси культури не контролюється.

Кількість модулів біореактору, що використовуються, визначається задачею, яка поставлена (вилучення цільових продуктів, кількість стадій, оптимізація процесу біосинтезу тощо).

Спосіб здійснюється наступним чином.

У двохмодульному біореакторі модуль 1 використовується для поживного середовища (модуль середовища). Модуль 2 біореактору (модуль вирощування біомаси) відділений від модулю 1 бактеріологічною мембраною. Модулі біореактору попередньо стерилізуються.

У модуль 1 вводиться поживне середовище, яке подається із напірного баку. Склад поживного середовища відповідає виробничому регламенту. Наприклад для культури L-лізину: розчин меляси концентрацією па

редукуючи речовини 8%, кукурудзяний екстракт на сухі речовини 4%, солей мінерального азоту 2%, фосфорних солей (на P_2O_5) 0.1%.

Модуль 1 наповнюється до рівня розміщення бактеріологічної мембрани і її змочування. Після цього в модуль 2 стерильно вводиться суспензія культури (продуценту), що використовується для біосинтезу, із розрахунку наприклад 10% від об'єму поживного середовища. З цього моменту починається процес біосинтезу. Контроль і управління процесом виконуються наступним чином. У пробах, що періодично відбираються, аналізується вміст (рівень накопичення) цільового біологічно-активного продукту у г/л. При досягненні необхідного рівня вмісту (концентрації) цільового продукту вводиться режим потоку середовища у модулі 1 із швидкістю, що забезпечує заданий рівень концентрації продукту. Поживне середовище вводиться із напірної ємкості, а нативний розчин (середовище із цільовим продуктом) збирається в приймальній ємкості. Таким чином біомаса клітин не знаходячись в поживному середовищі через бактеріологічну мембрану виконує біосинтез біологічно-активних речовин.

Процес біосинтезу (по скільки метою є власне цей процес) може бути достатньо тривалим у часі, так як відбувається постійне видалення нативного розчину, що вміщує біологічно-активні речовини (цільовий продукт), в той час як культура (продуцент) накопичує біомасу зовні, тобто не знаходячись у поживному середовищі. При чому збільшення біомаси клітин культури не контролюється. У якості газової суміші, що вміщує кисень, використовують підготовлену газову суміш повітря.

Контроль розвитку популяції клітин (мікроорганізмів) виконується в даному випадку тільки через показник активності біосинтезу. Культура клітин росте в умовах природного (або близького до природного) надходження повітря без примусової аерації.

Управління біосинтезом виконується через:

- швидкість надходження поживного середовища в модуль;
- шляхом періодичної подачі повітря в модуль для перемішування нативного середовища;
- шляхом підтримання оптимальної температури нативного середовища.

Термостатування процесу біосинтезу виконується за рахунок теплообмінних устроїв внутрішнього і/або зовнішнього розміщення. Підтримку температури виконують включенням - виключенням термоелементів у модулі і/або подачею води у рубашку біореактору.

Приклад 1. Режим стерилізації модулів: температура - 120°C, тиск 12Мпа, тривалість 30 хвилин. Для процесу біосинтезу використано культуру *L-лізину Brevibacterium sp 22*. Режим біосинтезу: температура 30±1°C, тривалість процесу до введення режиму потоку - 72 години, перемішування поживного середовища - періодичне.

У модуль 1 вводиться поживне середовище, яке подається із напірного баку. Склад поживного середовища відповідає виробничому регламенту.

Модуль 1 наповнюється до рівня розміщення бактеріологічної мембрани і її змочування. Після цього в модуль 2 стерильно вводиться суспензія вирощеної культури (продуценту), із розрахунку 10% від об'єму поживного середовища. З цього моменту починається процес біосинтезу. У пробах, що періодично відбираються, аналізується вміст лізину у г/л. При досягненні концентрації лізину через 72 години 30г/л вводиться режим потоку середовища у модулі 1 із швидкістю, що забезпечує заданий рівень концентрації лізину. Поживне середовище вводиться із напірної ємкості, а нативний розчин (середовище з лізином) збирається в приймальній ємкості. Таким чином біомаса клітин не знаходячись в поживному середовищі через бактеріологічну мембрану виконує біосинтез лізину.

Процес біосинтезу може бути достатньо тривалим у часі, так як відбувається постійне видалення нативного розчину, що вміщує лізин, в той час як культура (продуцент) накопичує біомасу зовні, тобто це знаходячись у поживному середовищі. При чому збільшення біомаси клітин культури не контролюється. У якості газової суміші, що вміщує кисень, використовують підготовлену газову суміш повітря.

Контроль розвитку популяції клітин (мікроорганізмів) виконується в даному випадку тільки через показник активності біосинтезу. Культура клітин росте в умовах природного (або близького до природного) надходження повітря без примусової аерації.

Приклад 2 виконували аналогічно описаному. Для процесу біосинтезу використано культуру *Delbruckii - Sh*. Режим біосинтезу: температура 50±1°C, режиму потоку введено при досягненні в поживному (нативному) середовищі концентрації молочної кислоти 17г/л. Процес біосинтезу може бути достатньо тривалим у часі, так як відбувається постійне видалення нативного розчину, що вміщує молочну кислоту, в той час як культура (продуцент) накопичує біомасу зовні, тобто не знаходячись у поживному середовищі. При чому збільшення біомаси клітин культури не контролюється. У якості газової суміші, що вміщує кисень, використовують підготовлену газову суміш повітря.

Приклад 3 виконували аналогічно описаному в прикладі 1. Для процесу біосинтезу використано культуру *Asp.niger* штам Р-1. Режим біосинтезу: температура 30±1°C. Концентрація меласи у поживному середовищі збільшена до 20%. Режим потоку введено при досягненні в поживному (нативному) середовищі концентрації лимонної кислоти 50г/л. Процес біосинтезу може бути достатньо тривалим у часі, так як відбувається постійне видалення нативного розчину, що вміщує лимонну кислоту, в той час як культура (продуцент) накопичує біомасу зовні, тобто не знаходячись у поживному середовищі. При чому збільшення біомаси клітин культури не контролюється. У якості газової суміші, що вміщує кисень, використовують підготовлену газову суміш повітря.

Наведені признаки способу по винаходу дозволяють:

- виконувати процес біосинтезу тривалий час без додаткової підготовки посівного матеріалу (культури - продуценту);

- виконувати процес біосинтезу практично безперервно або безперервно-циклічно;
- зменшити експлуатаційні витрати та знизити собівартість біологічно-активних речовин і відповідно цільових продуктів з їх використанням.

5 Таким чином спосіб по винаходу дозволяє отримувати біологічно-активні речовини з використанням нових технічних і технологічних рішень процесу біосинтезу в біореакторах модульної конструкції.

Використання способу дозволить розширити асортимент біологічно-активних речовин і продуктів харчового і функціонального призначення.

10

Формула винаходу

15

1. Спосіб отримання біологічно-активних речовин, який включає підготовку живильного середовища, підготовку культури для вирощування, процес біосинтезу і виділення цільових речовин, який відрізняється тим, що біосинтез виконують з використанням живильного середовища, яке відокремлене від біомаси клітин бактеріологічною мембраною, з споживанням мікроорганізмами кисню із газової суміші.

2. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що процес біосинтезу виконується в біореакторі модульної конструкції, який включає щонайменше два модулі.

20

3. Спосіб по пп. 1 і 2, який відрізняється тим, що для забезпечення умов біосинтезу вміст живильних речовин у середовищі підтримується за рахунок введення свіжого середовища.

4. Спосіб по пп. 1-3, який відрізняється тим, що вміст цільових продуктів у живильному середовищі підтримується за рахунок постійного оновлення середовища у часі, причому збільшення біомаси клітин культури не контролюється.

5. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як газову суміш використовують повітря.

25

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2003, N 9, 15.09.2003. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

30

35

40

45

50

55

60

65