

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к микробиологическому синтезу глутаминовой кислоты.

Известен способ биосинтеза глутаминовой кислоты (Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов /В.А. Быков, И.Н. Крылов, М.Н. Манак и др. //Биотехнология, 1987. № 6), предусматривающий получение посевного материала, приготовление питательной среды, ее стерилизацию, охлаждение и засев готовым посевным материалом, выращивание продуцента в ферментере до накопления максимального количества глутаминовой кислоты.

Процесс биосинтеза ведут на питательной среде с содержанием мелассы до 20%, мочевины до 2% в течение 48 - 52 ч и при интенсивной аэрации с расходом воздуха 1 объем на 1 объем среды в мин.

Готовая культуральная жидкость содержит до 45 г/дм³ глутаминовой кислоты, выход ее по отношению к потребленным сахарам составляет 45 - 50%.

Наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату является способ биосинтеза L-глутаминовой кислоты (Еникеев Э.Ш. Влияние солей фосфора на биосинтез глутаминовой кислоты. НТИСС ВНИИСЭНТИ "Передовой производственный опыт в медицинской промышленности рекомендованный для внедрения", 1991, вып. 11 - 12, С. 1 - 5), включающий получение посевного материала, приготовление питательной среды, ее стерилизацию, охлаждение и засев готовым посевным материалом, выращивание продуцента и ферментацию с периодической подпиткой источником углерода - 50%-ный раствор мелассы и раствором солей фосфора. Исходная концентрация мелассы в ферментационной среде составляет 20%. В результате применения такого способа биосинтеза глутаминовой кислоты сокращает фазу роста культуры и повышение скорости биосинтеза глутаминовой кислоты.

Причиной, препятствующей дальнейшему повышению продуктивности процесса по глутаминовой кислоте, является ингибирование культуры избытком питательного субстрата в первые 48 часов ферментации, что снижает выход глутаминовой кислоты и экономический коэффициент использования углеводов и удлиняет продолжительность процесса ферментации. Кроме того, высокая концентрация углеводов в среде в сочетании с повышенным содержанием биотина способствует увеличению расхода углеводов на построение клеточной биомассы.

Задачей изобретения является усовершенствование известного способа получения глутаминовой кислоты путем создания оптимальных условий для выращивания культуры *Corynebacterium glutamicum* 3144 и продуцирования ею целевого продукта.

Техническим результатом использования предлагаемого изобретения является повышение биосинтетической активности культуры *Corynebacterium glutamicum* 3144. Потребительские свойства объекта изобретения, связанные с техническим результатом - повышение выхода целевого продукта и снижение его себестоимости за счет уменьшения углеводов на построение бактериальной биомассы.

Достигается технический результат тем, что в известном способе, включающем приготовление посевной среды с использованием мелассы и питательных солей, выращивание посевного материала в инокуляторе и собственно ферментацию в асептических, аэробных условиях с дробным добавлением в ферментер мочевины и источников углерода, стадию выращивания посевного материала совмещают со стадией ферментации и осуществляют в одном аппарате, при этом мелассу, предназначенную для биосинтеза L-глутаминовой кислоты, делят в соотношении 1:5, в меньшую часть мелассы вносят все количество питательных солей, разбавляют водой до концентрации 4 - 6% сухих веществ и используют для выращивания культуры до достижения фазы замедления роста, после чего остальную часть мелассы вводят в ферментер каждые 3 часа в количестве, обеспечивающем содержание сухих веществ в ферментационной среде 4 - 6%.

Предложенный в заявленном техническом решении неизвестный в микробиологии прием - совмещение в одном аппарате стадии выращивания посевного материала и собственно ферментации обеспечивает возможность приготовления посевной среды в объеме 75 - 80% от рабочего объема ферментера, снижения концентрации углеводов на фоне повышенных концентраций аммонийного азота, ведение подпитки при ферментации концентрированным источником углерода и поддержание концентрации сухих веществ в процессе 4 - 6%.

Деление мелассы в соотношении 1:5 дает возможность из одной меньшей части приготовить необходимый объем (75 - 80%) мелассного сусла концентрацией 4 - 6%, а рабочий ввод большей части мелассы позволяет поддерживать указанную концентрацию сухих веществ на протяжении всего процесса биосинтеза глутаминовой кислоты.

Концентрация сусла менее 4 % СВ (2% сахара) лимитирует рост культуры недостатком источника углерода и замедляет процесс накопления бактериальной биомассы, повышение концентрации сусла более 6% СВ ведет к непроизводительным потерям сахара на построение биомассы и поддержание жизнедеятельности культуры.

Концентрация сусла в заявляемых пределах 4 - 6% СВ на стадии выращивания посевного материала и на стадии ферментации является наиболее оптимальной, обеспечивает соотношение углерод-азот в среде 18 - 20 : 1, при котором культура находится в состоянии разобщенного роста и поддерживается высокая скорость катаболических реакций синтеза глутаминовой кислоты.

Использование предложенных микробиологических и технологических приемов и параметров в сочетании с известными позволяет создать оптимальные условия жизнедеятельности продуцента целевого продукта и за счет этого повысить биосинтетическую активность культуры.

Предлагаемый способ осуществляет следующим образом. Для ферментера с рабочим объемом 7,5 дм³ и при концентрации сусла 20% СВ берут 2062 г мелассы, делят ее в соотношении 375 и 1687 г. В

первую часть (375г) вносят все ингредиенты питательной среды и растворяют водой до объема 6,0дм³ и концентрации сухих веществ 4 - 6%. Полученное сусло стерилизуют, засевают культурой *Corynebacterium glutamicum* 3144 в количестве 2,5об.% и ведут ее выращивание в течение 14 - 18 часов при аэрации один объем воздуха на один объем среды в минуту. Через 14 - 18 часов, когда наступает стадия замедления роста и начинается активный синтез глутаминовой кислоты вводят оставшуюся часть мелассы порциями, обеспечивающими содержание сухих веществ в среде 4 - 6% с одновременным внесением мочевины в количестве, обеспечивающем рН-стабилизацию процесса.

В ходе ферментации контролируют рН среды, содержание сухих веществ, накопление биомассы и содержание глутаминовой кислоты.

Пример I. В ферментере готовят 6,0дм³ посевной среды со всеми ингредиентами и содержанием сухих веществ 5%. Полученную среду стерилизуют, засевают культурой *Corynebacterium glutamicum* 3144 в количестве 2,5об.% и ведут ее выращивание в течение 18 часов при аэрации один объем воздуха на один объем среды в минуту. Через 18 часов роста начинают вводить оставшуюся часть мелассы порциями по 210г через каждые три часа процесса с одновременным внесением мочевины.

Показатели, характеризующие процесс биосинтеза глутаминовой кислоты по предлагаемому способу приведены в табл. I.

Таблица I

| Время ферментации, ч | Технологические параметры процесса | | Биохимические показатели процесса | | | | |
|----------------------|------------------------------------|----------|-----------------------------------|----------------------|--|--|--------------------------|
| | Добавление, см ³ | | рН | Оптическая плотность | Остаточные углеводы, г/дм ³ | Количество глутаминовой кислоты, г/дм ³ | Коэффициент конверсии, % |
| | мелассы | мочевины | | | | | |
| 0 | - | - | 7,0 | 3,5 | 39 | - | - |
| 18 | 210 | 75 | 7,2 | 8,0 | 27,5 | 2,3 | - |
| 21 | 210 | 60 | 7,0 | 51,0 | 25,0 | 9,7 | - |
| 24 | 210 | - | 7,4 | 55,0 | 26,0 | 15,9 | - |
| 27 | 210 | 30 | 7,2 | 60,0 | 22,0 | 17,0 | - |
| 30 | 210 | 30 | 7,1 | 66,0 | 23,0 | 22,7 | - |
| 33 | 210 | - | 7,2 | 68,0 | 20,0 | 23,9 | - |
| 36 | 210 | 30 | 7,3 | 70,0 | 19,2 | 26,4 | - |
| 39 | 210 | 30 | 7,2 | 70,0 | 13,0 | 40,9 | - |
| 42 | - | 20 | 7,0 | 70,0 | 8,6 | 49,2 | - |
| 45 | - | - | 7,1 | 70,0 | 6,8 | 57,3 | - |
| 48 | - | - | 7,0 | 70,0 | 4,8 | 57,6 | 63,3 |

Показатели, характеризующие кинетику накопления глутаминовой кислоты и ее содержание в культуральной жидкости по известному и предлагаемому способам приведены в таблице 2.

Таблица 2

| №№ пп | Характеристика процесса | По известному способу | По предлагаемому способу |
|-------|--|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Концентрация сусла посевной среды, % | 10 | 5 |
| 2 | Объем посевного материала, % | 2,5 | 75 |
| 3 | Содержание биомассы в посевном материале, г/дм ³ | 11,4 | 11,0 |
| 4 | Содержание сухих веществ в ферментационной среде, % | | |
| | на начало ферментации | 20 | 5,0 |
| | через 24 часа | 18 | 6,0 |
| | через 36 часов | 12 | 6,5 |
| | через 48 часов | 5,5 | 5,5 |
| 5 | Количество глутаминовой кислоты, г/дм ³ | | |
| | через 24 часа ферментации | 2,4 | 12,8 |
| | через 36 часов ферментации | 25,0 | 36,9 |
| | через 48 часов ферментации | 42,8 | 55,0 |
| 6 | Экономический коэффициент использования углеводов на 48 часов, % | 47,0 | 57,8 |
| 7 | Введено углеводов с подпитками, г/дм ³ | 21,4 | 21,4 |
| 8 | Дополнительно получено глутаминовой кислоты, г/дм ³ | 14,4 | 14,0 |
| 9 | Суммарно получено глутаминовой кислоты, г/дм ³ | 61,4 | 71,8 |
| 10 | Продолжительность ферментации, ч | 70 | 62 |
| 11 | Экономический коэффициент использования углеводов на конец | 58 | 65,2 |

| | | | |
|--|----------------|--|--|
| | ферментации, % | | |
|--|----------------|--|--|

Как видно из данных таблицы 2, при одинаковой продолжительности ферментации предлагаемый способ биосинтеза позволяет увеличить выход глутаминовой кислоты на 12,6% и повысить коэффициент использования углеводов на 10,8% на 48 час ферментации и на 7,2% к 62 часу ферментации по сравнению с известным способом, продолжительность которого составила 70 часов.