

О.Г.Севрук, В.А.Унянян, Е.Н.Шербакова

**К ВОПРОСУ ОБ ОТДЕЛЕНИИ БИОМАССЫ ОТ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ
ЖИДКОСТИ ПРИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ ПОЛУЧЕНИИ ЛИЗИНА**

Использование монообменного метода выделения лизина при микробиологическом способе его получения требует обязательно-го удаления взвешенной фазы из культуральной жидкости перед подачей её на смолы. В состав взвешенной фазы культуральной жидкости после ферментации лизина входят: биомасса (клетки культуры-продуцента) и продукты ее распада, различные белковые компоненты, соли, пигменты и другие органические соединения, часть из которых находится в грубодисперсной фазе, а другая - в коллоидном состоянии. Из-за близости удельных весов взвешенных частиц в культуральной жидкости, даже после длительного её отстаивания не образуется плотного осадка, что вызывает большие потери культуральной жидкости при сепарировании, а также требует применения сепараторов с высоким значением фактора разделения. С другой стороны, присутствие коллоидных частиц снижает эффект использования фильтрации, так как при этом забиваются поры фильтрующего материала. Отделение взвешенной фазы от культуральной жидкости является поэтому самым трудоёмким и длительным процессом при микробиологическом способе получения лизина.

По технологическому регламенту ИАЗ им.Курчатова, положенному в основу технологии строящегося завода в Армянской ССР по производству кристаллического лизина, предлагается осаждение биомассы и других взвешенных в культуральной жидкости веществ проводить с помощью негашеной извести с 3-часовой выдержкой при 90-95° при непрерывном перемешивании и с последующей фильтрацией образовавшегося осадка. В связи с тем, что в полученном фильтрате содержится много катионов при высоком значении pH/свыше 11/ необходима предварительная его нейтрализация. Нейтрализация обычно осуществляется раствором углекислоты или орто-фосфорной кислоты, после чего проводится фильтрация вторично образовавшегося осадка, в основном со -

стоящего из кальциевых солей. Поскольку длительность и трудоемкость этого метода безусловно будет осложнять процесс получения лизина в производственных условиях, в лаборатории биосинтеза лизина Института Микробиологии АН Арм.ССР отработывались и другие методы отделения биомассы от культуральной жидкости с целью упрощения и рационализации этого процесса. При этом были испытаны 2 метода осаждения:

1. Подкисление культуральной жидкости серной кислотой с последующим центрифугированием полученного осадка.

2. Осаждение биомассы при одновременном внесении в культуральную жидкость негашеной извести (CaO) и орто-фосфорной кислоты, с последующей однократной фильтрацией полученного осадка.

Методика исследований

Отделение биомассы проводилось из культуральной жидкости, полученной при ферментации трех штаммов *M. glutamicus* штаммы 95, 28 и 8 в 20-литровых ферментерах с мешалкой до 400 об/мин, при 28–30° в течение 72 часов, на следующих средах (в %).

Среда № 1

Меласса - 15,0
Кукурузный экстракт - 2,0
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,5

Среда № 3

Сахароза - 10,0
Кукурузный экстракт - 4,0
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0
 MgSO_4 - 0,02
 K_2HPO_4 - 0,2

Среда № 2

Меласса - 30,0
Кукурузный экстракт - 4,0
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3,0

Среда № 4

Меласса - 15,0
Кукурузный экстракт - 0,5
Гидролизат обезжиренного творога - 15,0
 NH_4Cl - 0,5

1. Осаждение биомассы из культуральной жидкости путём подкисления ее концентрированной H_2SO_4 было проведено при 2-х значениях pH - 1,0 - 2,0 с выдержкой после подкисления в течение 1–2–3 часов при 80° и поставлены следующие варианты опы-

тов:

1. Культуральная жидкость подкислялась, нагревалась до 80° и сразу же центрифугировалась на проточной центрифуге с 30 тыс. об/минуту.
2. Культуральная жидкость нагревалась до 80° и выдерживалась 1 час при 80° с последующим центрифугированием.
3. Подкисленная культуральная жидкость выдерживалась в течение 2-х часов при 80° .
4. Подкисленная культуральная жидкость выдерживалась в течение 3-х часов при 80° .

По ходу опыта определялось содержание сухих веществ рефрактометрически, мутность — нефелометрически до и после фильтрации, а также процент отстоя. Контролем служила культуральная жидкость без осаждения биомассы.

II. Осаждение биомассы при совместном внесении в культуральную жидкость CaO и H_3PO_4 с дальнейшей однократной фильтрацией. При испытании методов совместного осаждения биомассы из культуральной жидкости и одноступенчатой фильтрации отрабатывались следующие вопросы:

1. Температура осаждения.
2. Количество CaO и H_3PO_4 , приводящее практически к полному осаждению биомассы при оптимальной температуре.
3. Динамика изменения pH раствора после его выдержки от 1 до 5 часов при 20° и оптимальной температуре осаждения биомассы.
4. Зависимость скорости фильтрации раствора от состава среды, на которой проводилась ферментация, и используемого штамма-продуцента лизина.

По ходу опыта определялись следующие показатели: исходный pH культуральной жидкости после нейтрализации и после фильтрации, содержание сухих веществ — рефрактометрически, мутность — нефелометрически до и после фильтрации осадка, процент отстоя. Определялся химический состав осадка, полученного при одновременном внесении в культуральную жидкость CaO и H_3PO_4 .

Для сравнения в работе приводится химический состав сухой биомассы, полученной после отделения ее от культуральной жидкости путем добавления негашеной извести (согласно регламента), а также состав ее гидролизатов (гидролиз проводился 3N HCl в течение 6 часов при давлении 1 атм).

О составе биомассы, полученной путем совместного внесения CaO и H_3PO_4 в культуральную жидкость, и биомассы, осаждаемой только внесением CaO , судили по следующим показателям:

1. Содержание сухих веществ (абс. сухой вес).
2. Общий и белковый азот (микрометод Кьельдаля).
3. Аминный азот (метод Хардинга и Мак-Лина).
4. Жир (метод Сокслета).
5. Сахара (метод Шорли).
6. Фосфор (модификация Беренблума и Чейка).
7. Аминокислотный состав (после гидролиза) - методом бумажной хроматографии в системе растворителей бутанол-уксусная кислота - вода (4:1:5).

Согласно регламенту осаждение биомассы проводится двух-ступенчато: сначала в культуральную жидкость, нагретую до 100°C , вносится CaO и выдерживается в течение 3-х часов, после чего культуральная жидкость фильтруется с образованием первичного осадка, затем фильтрат нейтрализуется H_3PO_4 и вновь отфильтровывается вторичный осадок. Как уже указывалось выше, процесс отделения биомассы от культуральной жидкости этим методом трудоёмок и длителен. Нами был проверен вариант отделения биомассы от к.ж. путем одновременного внесения CaO и H_3PO_4 .

Результаты исследований и их обсуждение

В таблице I приведены данные по осаждению биомассы из культуральной жидкости при разных режимах. Для сравнения указаны показатели контрольного варианта опыта без искусственного осаждения биомассы.

Как видно из таблицы, предлагаемый нами вариант осаждения биомассы из к.ж. более рационален. Основанием для такого

Таблица I

Осаждение биомассы из культуральной жидкости
при разных режимах

Варианты	Количество биомассы, г/л	Выделение по- сле внесения CaO, час	Температура выделения, °C	pH после CaO	Каличество CaO	Выделение после внесения H ₂ PO ₄ мл/л	Выделение после внесения H ₂ PO ₄ мл/л	pH до фильтра- ции	pH после фильтра- ции	Сухие ве- щества, % экстинция				Скорость осе- дентации, см			Скорость фильтрации л/мин
										до филь- тра- ции	после фильтра- ции	до филь- тра- ции	после фильтра- ции	10	30	60	
Контроль (без осаж- дения)	-	-	100	-	-	-	-	6,9	-	13,5	-	0,17	-	-	-	-	не опре- деле- на
	15	3	100	10,8	-	-	-	10,8	11,2	13,9	11,2	0,21	0,03	0,3	2,5	3,5	13
Двухста- пичное осажде- ние	-	-	-	-	6,0	30	30	6,9	8,1	11,3	10,0	0,03	0,01	0,8	2,5	3,6	3,3
	15	0,5	80	11,1	9,0	10	10	6,8	8,3	12,8	11,1	0,19	0,01	1,9	3,6	4,4	8,1
Осаждение при сов- местном внесении	10	0,5	80	10,3	5,5	15	15	6,4	7,9	12,9	11,6	0,17	0,01	1,5	3,0	4,2	7,0

■ По регламенту (см.методы)

заклучения могут служить следующие полученные нами показатели: нагревание к.ж. производится до 80° вместо 100° , выдержка раствора с 3-х часов сокращается до 0,5 часа, скорость фильтрации осадка увеличивается почти в 2 раза при полном отделении осадка от к.ж., отпадает двойная фильтрация, что значительно сокращает длительность всего процесса, значительно снижается расход осаждающих агентов — CaO с 15 г/л до 10 г/л с соответствующим сокращением расхода H_3PO_4 с 9 мл/л до 5,5 мл/л.

В таблице 2 представлены данные по динамике изменения pH культуральной жидкости сразу по окончании процесса ферментации, после осаждения биомассы с помощью CaO и нейтрализации H_3PO_4 , во время выдержки нейтрализованной к.ж. с выпавшим в ней осадком и после фильтрации. Как видно из данных таблицы, независимо от температуры выдержки (80 или 20°) нейтрализованной к.ж. в процессе ее стояния от 1 до 5 часов, уровень pH несколько увеличивался после фильтрации, приблизительно в пределах 0,6–1,0. В такой же мере изменялся pH к.ж. и в вариантах, где фильтрация проводилась сразу после нейтрализации.

Мы не получили разницы в характере изменения уровня pH в зависимости от состава сред, использованных во время ферментации, и от способа осаждения осадка. При двухступенчатом отделении осадка от к.ж. сдвиги в динамике изменения pH в общем совпадали.

Зависимость скорости фильтрации от состава среды и штамма-продуцента лизина, использованных в ферментации, представлена в таблице 3.

Как показывают данные таблицы, скорость фильтрации зависит от состава использованной для ферментации среды. Так, с увеличением концентрации мелассы в среде с 15% до 30% скорость фильтрации 1 литра к.ж. соответственно уменьшалась с 8 до 20 минут. Несколько увеличивалось время фильтрации к.ж., компонентом среды которой во время ферментации была сахароза вместо мелассы. Резко сокращалось время фильтрации к.ж. с использованием гидролизатов молочных отходов.

Что касается продуцентов лизина, использованных в фермен-

Таблица 2

Динамика изменения рН культуральной жидкости до и после фильтрации

[illegible]

Таблица 3

Зависимость скорости фильтрации культуральной жидкости от состава ферментационной среды

Состав среды, %	Выдержка к.ж. после нейтрализации, час	Температура выдержки, °С	Мутность, экстинция		Скорость седиментации, см/мин			Скорость фильтрации л/мин
			до фильтрации	после фильтрации	10 мин	30 мин	60 мин	
Меласса-15,0	0,6	80	0,18	0,01	1,5	3,4	4,1	7,0
КЭ - 2,0	5,0	80	0,21	0,01	1,0	2,1	3,6	8,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1,5								
Меласса-30,0	0,6	80	0,36	0,05	нет	0,3	0,5	20,7
КЭ - 4,0	5,0	80	0,33	0,02	нет	0,3	0,5	18,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -3,0								
Сахароза-10,0	0,6	80	0,16	0,00	2,5	3,8	4,5	11,5
КЭ - 4,0	5,0	80	0,19	0,00	2,5	3,2	3,4	7,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -2,0	5,0	20	0,20	0,01	0,1	0,4	0,7	8,0
MgSO_4 -0,02								
KH_2PO_4 -0,2								
Меласса-15,0	0,6	80	0,22	0,01	0,5	1,5	2,3	6,7
КЭ - 0,5	5,0	80	0,24	0,01	1,3	3,0	3,5	4,0
Гидролизат обезжиренного творога-15,0	5,0	20	0,24	0,01	нет	0,2	-	5,0
NH_4Cl -0,5								

тации, то скорость фильтрации культуральной жидкости не зависела от штамма.

В связи с дальнейшим использованием осадков, получаемых из культуральной жидкости после ферментации в кормовых целях как белковых добавок к рациону птиц, представилось интересным сравнить их химический состав в зависимости от способа получения. Результаты анализов химического состава осадков, полученных обоими способами, совместным внесением CaO и H_3PO_4 в культуральную жидкость и только осаждением CaO представлены в таблице 4.

Судя по представленным в таблице данным состав осадка, полученного при совместном внесении в к.ж. CaO и H_3PO_4 не отличается по составу от осадка, полученного с помощью CaO и, следовательно, так же как и этот осадок может быть рекомендован для определения его кормовой ценности.

В ы в о д ы

1. Наиболее рациональным методом осаждения биомассы из культуральной жидкости в процессе микробиологического получения лизина следует считать осаждение с одновременным использованием в качестве осаждающих агентов CaO и H_3PO_4 с предварительным нагревом к.ж. до 80° с однократной фильтрацией получаемого осадка.

2. Преимуществом предлагаемого метода совместного внесения в к.ж. CaO и H_3PO_4 для осаждения биомассы и других взвешенных частиц является:

- а/ устранение вторичной фильтрации;
- б/ сокращение времени фильтрации;
- г/ уменьшение расхода осаждающих материалов.

Օ.Գ. ՍԵՎՐՈՒԿ, Վ.Ա. ՀՈՒՄԱՆՅԱՆ, Ե.Ն. ՇԳԵՐԱԿՈՎԱ

ԿՈՒՆՏՈՒՐԱԼ ՀԵՂՈՒԿԻՑ ԲԻՈՋԱԵԳՎԱԾԻ ԱԵՋԱՏՈՒՄԸ
ՄԻԿՐՈԲԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՃԱԵՄԱՐԱՀՈՎ ԼԻՋԻՆԻ ՍՏՈՑՄԱՆ
ՃԱՄԱՆԱԿ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Առաջադրված է *M. glutamicus* շտ. 95-ի միջոցով լիգինի ստացման պրոցեսում կուլտուրալ հեղուկից բիոզանգվածի անջատման ավելի ռացիոնալ եղանակ:

Եղանակի էությունը կայանում է կուլտուրալ հեղուկի մեջ չհանգած կրի / CaO / և չեղոթացնող նյութ H_3PO_4 -ի միաժամանակյա մտցումը, որի ժամանակ տեղի է ունենում բիոզանգվածի լրիվ նստեցում և պահանջվում է նստվածքի միանվագ ֆիլտրում:

Առաջադրված եղանակը նշանակալիորեն պարզեցնում և կարճացնում է աշխատատար պրոցեսներից մեկը միկրոբիոլոգիական եղանակով լիգինի ստացման ժամանակ:

O.G. Sevruk, V.A. Hunanian, E.N. Scherbakova

ON THE SEPARATION OF BIOMASS OF CULTURAL
FLUID DURING MICROBIOLOGICAL PRODUCTION
OF LYSINE

S u m m a r y

The proposed method consists in simultaneous addition to the cultural medium of *Micrococcus glutamicus* 95 of CaO and H_3PO_4 with filtration of forming precipitate.