

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

71872

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 08.10.1970 (P. 143 822)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 10.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 26.10.1974

Kl. 30h, 6

MKP C12d 9/22

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Miejscu: _____

Twórca wynalazku: Kazimierz Bronikowski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne "Polfa",
Kutno (Polska)

Ciągły sposób prowadzenia biosyntezy nizyny

Przedmiotem wynalazku jest ciągły sposób prowadzenia biosyntezy nizyny na drodze fermentacji za pomocą mikroorganizmów ze szczepu nizynotwórczego *Streptococcus lactis* na podłożu z mleka lub jego wytworów, w tym również serwatki oraz serwatki wzbogacanej substancjami azotowymi i węglowodanami.

Nizyna stanowi mieszaninę różnych polipeptydów i jest inhibitorem wzrostu różnego rodzaju drobnoustrojów, a dzięki temu stosowana jest w przemyśle artykułów spożywczych jako środek konserwujący.

Według dotychczas znanych sposobów biosyntezy nizyny przeprowadza się na drodze fermentacji okresowej przez zaszczepienie w fermentorze uprzednio wyjałowionej pożywki trójprocentową ilością kultury bakteryjnej wyhodowanej w propagatorze, będącej w stadium logarytmicznego rozwoju. Proces prowadzi się w ciągu 15–22 godzin w temperaturze 25–30°C, utrzymując w czasie fermentacji wartość pH = 5,5–6,8. Powstający w wyniku fermentacji kwas mlekowy neutralizuje się za pomocą wodnego roztworu wodorotlenku lub węgla metalu alkalicznego.

Wiadomo, że gromadzący się w podłożu fermentacyjnym mleczan jest jednym z hamulców biosyntezy nizyny i jeżeli w początkowym stadium fermentacji zawartość soli kwasu mlekowego przekroczy jeden procent, to wtedy następuje szybkie wyrodzenie fermentacji przejawiające się utratą zdolności mikroorganizmów do wytwarzania nizyny. Wzrost zawartości mleczanu w logarytmicznej fazie wzrostu bakterii jest mniej szkodliwy i w praktyce jego ujemny wpływ ujawnia się po przekroczeniu zawartości pięciu procent. Wadą okresowej metody fermentacji jest konieczność dokonywania wstępnych czynności, poprzedzających właściwą biosyntezę, jak mycie i dezynfekcja urządzeń i instalacji, napełnianie pożywką, sterylizacja, chłodzenie, rozruch biosyntezy. Po zakończonym procesie biosyntezy konieczne jest opróżnianie fermentora i napełnianie substratów do następnej szarży itp. Z tym się wiąże konieczność uwzględniania dodatkowych pojemności fermentorów, nierytmiczność dozowania brzezki pofermentacyjnej do dalszej obróbki, a co za tym idzie – koszty wytwarzania produktu muszą być wysokie.

Wynalazek ma na celu ograniczenie czasów nieprodukcyjnych do minimum i przeprowadzanie biosyntezy nizyny w sposób ciągły.

Stwierdzono, że cel ten można osiągnąć na drodze zastosowania przepływu całości pożywki w sposób ciągły przez propagator, który stanowi wstępną fazę fermentacji. W propagatorze szczep osiąga stadium

logarytmicznego rozwoju i następnie przepływa do jedno- lub kilkuczęłowego fermentora, w którym następuje właściwe stadium biosyntezy nizyny, po czym brzeczkę kieruje się z ostatniego członu fermentora do dalszego przerobu.

Według wynalazku biosyntezę nizyny prowadzi się metodą ciągłą w instalacji, która składa się z propagatora i jedno- lub kilkuczęłowego fermentora. Propagator, jak i poszczególne człony fermentora stanowią pojemniki fermentacyjne, zbudowane z tworzywa odpornego na kwas mlekowy, wyposażone w mieszałko, elementy regulacji temperatury i wartości pH, przystosowane do prowadzenia fermentacji względnie beztlenowej, izolowanej od otoczenia przez utrzymywanie nadciśnienia za pomocą obojętnego i wyjałowionego gazu lub powietrza, wprowadzonego do wolnej przestrzeni zbiorników od góry. Przystosowanie pojemników do warunków ciągłej fermentacji polega na zastosowaniu dopływu w dnach pojemników i odpływu na poziomie pojemności roboczej. W propagatorze zamontowuje się dodatkowo kilka króćców odpływowych umieszczonych na różnych poziomach w celu umożliwienia regulacji pojemności roboczej. Można także w króćcu, umieszczonym na górnej pokrywie propagatora, zamontować rurę zbierającą, zamocowaną szczelnie na króćcu wylotowym ale w taki sposób, aby umożliwiał wsuwanie lub wysuwanie rury ze zbiornika.

Propagator napełnia się wysterylizowaną i ochłodzoną w znany sposób pożywką o temperaturze 25–30°C i zaszczenia 1–3 procentową kulturą bakteryjną. Rozpoczyna się biosynteza nizyny, uwidaczniająca się spadkiem wartości pH środowiska reakcji. Jeżeli wykładnik jonów wodorowych osiągnie wartość 6,2–5,0 a najlepiej 5,7, to wtedy rozpoczyna się ciągłe dozowanie sterylnej pożywki o temperaturze 25–30°C przez króciec wlewowy propagatora. Jednocześnie otwiera się zawór na króćcu odpływowym, odbierając brzeczkę z wybranego poziomu i uruchamia mieszałko. Wielkość przepływu winna być tak dobrana, aby została zachowana wybrana stała wartość pH z zakresu 6,2–5,0, korzystnie 5,6–5,8, która nie może się wahać w dół lub w górę więcej, niż 0,1. Wielkość przepływu można regulować przez zmianę wielkości pojemności roboczej propagatora. Stwierdzono również, że objętościowa szybkość przepływu na godzinę jest zależna od właściwości szczepu użytego do biosyntezy i kształtuje się w granicach wartości z zakresu 0,5–1,3 objętości roboczej propagatora, a najczęściej wynosi 0,8 objętości roboczej propagatora. Wypływająca z propagatora breczka przepływa do fermentora, stanowiącego znany zbiornik lub kilka zbiorników fermentacyjnych zaopatrzonych w króćce przepływowe. Łączna pojemność wszystkich zbiorników fermentora winna być 15–23, najkorzystniej 20 razy większa od założonej objętościowej szybkości przepływu na godzinę.

Biosyntezę w fermentorze prowadzi się w znany sposób w czasie teoretycznie nieograniczonym, odbierając ciągle wypływającą na wylocie ostatniego członu fermentora brzeczkę pofermentacyjną, z której w znany sposób wydobywa się nizynę. W praktyce wydajność biosyntezy po pewnym czasie spada. Można wtedy skierować pożywkę przez ciąg rezerwowy z przygotowanym uprzednio do rozpoczęcia fermentacji rezerwowym propagatorem. W ciągu rezerwowym tylko propagator i pierwszy człon fermentora winny być zapasowe. Pozostałe człony fermentora mogą być wspólne dla obu ciągów.

Zaletą sposobu według wynalazku jest zwiększenie wydajności biosyntezy o 10–15 procent, miniaturyzacja urządzeń i instalacji, znaczne oszczędności na robociznie bezpośredniej i likwidacja szarż produkcyjnych o zerowej wydajności itp.

Niżej podany przykład wykonania wynalazku wyjaśnia bliżej jego istotę, nie ograniczając zakresu wynalazku.

P r z y k ł a d. Do wysterylizowanej próbówki z zawartością 15 ml wyjałowionego mleka odtłuszczonego wprowadza się sterylnie 0,8 ml ożywionej w znany sposób kultury bakteryjnej nizynotwórczej o wydajności określonej w warunkach fermentacji okresowej, równej 4000 jednostek/ml, wstrząsa, zamyka korkiem z jałowej waty i wstawia do ciepłarki o temperaturze 30°C na przeciąg 16 godzin, po czym zawartość próbówki wylewa się sterylnie do propagatora, napełnionego jałowym mlekiem odtłuszczonym w ilości 300 ml, a następnie propagator z zawartością wstawia się do termostatu o temperaturze 30°C. Następuje wówczas spadek wartości pH mleka, która po upływie 4–5 godzin dochodzi do wartości 5,7. Od tego czasu rozpoczyna się dozowanie pasteryzowanego lub sterylizowanego i ochłodzonego do temperatury 30°C mleka odtłuszczonego z szybkością 200 ml/godzinę przez króciec dopływowy od dołu propagatora, włącza mieszałko i otwiera króciec odpływowy. Jeżeli zachodzi dalszy spadek wartości pH, to wtedy zwiększa się stopniowo szybkość przepływu mleka przez propagator. Natomiast w przypadku wzrostu wartości pH koniecznym się staje obniżenie szybkości przepływu do około 150 ml/godzinę, a następnie w miarę spadku wartości pH stopniowo podnosi się szybkość przepływu mleka w taki sposób, aby utrzymywać można było w breczce propagatora możliwie stałą wartość pH, równą 5,7 z ewentualnym odchyleniem w dół lub w górę o 0,1. Po ustaleniu się szybkości przepływu mleka przy wartości pH = 5,7 oblicza się prawidłową objętość propagatora przy założeniu wymaganego przepływu bruczki, która w tym przypadku wynosi 240 ml/godzinę. W tym celu uzyskaną w praktyce szybkość przepływu bruczki, równą 260 ml/godzinę dzieli się przez objętość roboczą propagatora wynoszącą 315 ml uzyskując współczynnik

równy 0,825. Następnie wymaganą szybkość przepływu brzezki 240 ml/godzinę dzieli się przez uzyskany współczynnik 0,825. Uzyskana liczba 291 stanowi objętość roboczą propagatora dla szybkości równej 240 ml/godzinę. W dalszym toku postępowania ustala się poziom odpływu pożywki z propagatora na poziomie jego objętości roboczej, wynoszącej 291 ml i jednocześnie reguluje przepływ brzezki na wymaganą wielkość 240 ml/godzinę. Ewentualne wahania w dalszym toku fermentacji rekompensuje się przez zwiększenie lub zmniejszenie pojemności roboczej propagatora, zachowując możliwie stałą wartość przepływu. Brzezka z propagatora przelewa się samorzutnie hermetycznym rurociągiem do niżej ustawionego fermentora jednoczęłowego, w którym następuje właściwe stadium biosyntezy, w temperaturze 30°C, przy czym co godzinę reguluje się wartość pH za pomocą 10-procentowego wodnego roztworu wodorotlenku sodu. Objętość robocza fermentora jest równa 4800 ml. Uzyskuje się wydajność biosyntezy nizyny w wysokości 4500 jednostek/ml, trwającą w okresie jednego miesiąca.

Zastrzeżenia patentowe

1. Ciągły sposób prowadzenia biosyntezy nizyny na drodze fermentacji za pomocą mikroorganizmów ze szczepu nizynotwórczego *Streptococcus lactis* na podłożu z mleka lub jego wytworów, w tym również serwatki oraz serwatki wzbogacanej związkami azotu i węglowodanami, **znamienny tym**, że stosuje się ciągły przepływ pożywki fermentacyjnej przez środowisko fermentacji wstępnej, przebiegającej w propagatorze, skąd odbiera się brzezkę ze szczepem bakteryjnym w stadium logarytmicznego rozwoju, mierzoną wartością mieszczącą się w przedziale wartości 6,2–5,0, korzystnie w przedziale 5,6–5,8, którą wprowadza się do środowiska fermentacji właściwej, przebiegającej w jedno- lub kilkuczęłowym fermentorze, z którego brzezkę pofermentacyjną odbiera się do dalszej obróbki w kierunku wyodrębnienia produktu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wartość pH środowiska fermentacji wstępnej utrzymuje się na poziomie, zapewniającym stałe uzyskiwanie szczepu bakteryjnego w stadium logarytmicznego rozwoju na drodze regulacji szybkości przepływu pożywki przez propagator.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że szybkość przepływu pożywki przez propagator reguluje się przez zmianę jego pojemności roboczej.

