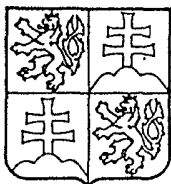


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 664

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.  
C 12 N 1/26<sup>4</sup>

(21) PV 192-87.5  
(22) Přihlášeno 12 01 87

(40) Zveřejněno 13 12 89  
(45) Vydáno 04 06 91

(75) Autor vynálezu

ETTLER PETR ing. CSc.,  
PILÁT PETR ing. CSc.,  
KINDLOVÁ Eva ing.,  
KUČEROVÁ DANA ing.,  
KOZEL VÁCLAV, PRAHA,  
TRÍSKA PETR, ROZTOKY U PRAHY

(54)

Způsob řízení biosyntézy fungicidinu

(57) Navrženým postupem řízení biosyntézy se při přípravě inokulačního materiálu *Streptomyces noursei* odstraní nestandardnost způsobená nepřesným a subjektivním hodnocením růstu kultury. Při zavedení reologického řízení kultivace očkovacích tanků bude možno srovnáním s modelovým průběhem viskozity přesně naplánovat inokulaci produkčního fermentoru podle aktuální dosahované fyziologické zralosti mycelia. Návazně s využíváním exponenciální růstové fáze dojde ke zkrácení kultivace, snížení rizika kontaminací, urychlení startu produkce a celkovému zvýšení tvorby účinné látky o cca 10 %.

Vynález se týká způsobu řízení biosyntézy fungicidinu kultivací *Streptomyces noursei* s využitím znalostí fyziologické aktivity kultury počínaje způsobem přípravy inokulačního materiálu podle tokových vlastností biosuspenze.

Při biosyntetické přípravě fungicidinu se v průmyslovém měřítku suspendují v očkovačích tancích zdroje asimilovatelného uhlíku, dusíku, fosforu, minerální živné sole ve vodě s odpěňovacími prostředky. Aerobní kultivace *Streptomyces noursei* probíhá za stálého intenzivního míchání a vzdušnění. Při přípravě inokula produkčního mikroorganismu je využíván jednostupňový inokulační postup podle schématu:



Po inokulaci očkovačím fermentoru suspenzí spor produkčního mikroorganismu probíhá při kultivační teplotě 28 °C klíčení spor a fáze zrychleného růstu podle běžných zákonitostí kinetiky růstu mycelárních mikroorganismů. Kultivace v očkovačím fermentoru je ukončena po dosažení tzv. dobrého nárůstu, což je podle výrobního reglementu zpravidla za 45 až 60 h. Je-li nárůst delší než 60 h, svědčí to o nevhodnosti použitých konserv. Během růstu inokulačního materiálu dochází k poklesu hodnoty pH z původních 6,8 až 7,0 na hodnoty 6,0 až 6,2, popřípadě i nižší 5,8 až 6,0. Tento pokles pH, mikroskopický obraz a sterilita jsou podle reglementu kritérii určujícími vhodnost použití očkovačím materiálu k inokulaci produkčního fermentoru.

Přípravou inokula a podmínkami, za jakých probíhá kultivace produkčních mikroorganismů v produkčních stupních se zabývá řada autorů. Bylo zjištěno, že způsob vedení procesu, počínaje prvními přípravnými pracemi hraje spolu s historií kultury velmi významnou úlohu při standardizaci biosyntézy v produkčním stupni a ovlivňuje také výši dosahované produkce účinné látky. Propracovali jsme například podmínky kultivace *Streptomyces erythreus* v očkovačím stupni při biosyntéze erythromycinu (J. Páca, P. Etlér, V. Grégr: J.Ferm. Technol., 56, 2, 144, 1978). Japonští autoři používají pro optimalizaci očkovačím stupně modelového mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* (I. Nagamune, I. Endo, I. Inoue: J.of Chem.Eng., 15, 6, 481, 1982). Z těchto literárních citací vyplývá, že kinetika tvorby primárních i sekundárních metabolitů je v inokulačním stupni studována i z chemicko-inženýrského hlediska. Práce Lopatněvy a kol. (Antibiotiki, 20, 1, 31, 1975 a Antibiotiki, 18, 7, 608, 1973) popisují biosyntézu fungicidinu jako náročnou z pohledu zajištění odpovídající dodávky kyslíku k rostoucím buňkám. Přesto však tato hlediska bývají ve výrobních aparaturách přehlížena. Potřeba pojímat celý biosyntetický proces jako interakci mezi danou geometrií míchání a vzdušnění a fyziologií produkčního kmene se začíná prosazovat až v poslední době.

Dosavadní způsob řízení biosyntézy fungicidinu kultivací *Streptomyces noursei* v očkovačích fermentorech lze považovat za zastaralý z několika pohledů. Nestandardnost dodávek surovin, zvláště komplexních zdrojů (sušené kvasnice, kukufičný výluh ap.) způsobuje, že podmínky pH uváděné ve výrobním reglementu nejsou buď dodržitelné, nebo pokles pH je tak plynulý a nevýrazně rozložen do 20 h intervalu, že umožňuje subjektivní interpretaci pro určení přesného času k inokulaci produkčního stupně. Dále jsme zjistili, že tento údaj není obrazem obsahu biomasy produkčního kmene, natož jeho aktivity. Při hodnocení vitálních nebo fixovaných preparátů produkčního kmene se není možno vystříhat subjektivní z důvodů lidského faktoru. Objektivní hodnocení větvení hyf pomocí automatizovaného systému není k dispozici.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob řízení biosyntézy fungicidinu a přípravy inokulačního materiálu kultury *Streptomyces noursei* podle reologických charakteristik s využitím živného média, obsahujícího snadno asimilovatelné zdroje uhlíku, dusíku, anorganické živné sole a odpěňovací prostředky, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se řízení biosyntézy provádí kontrolou reologických charakteristik fermentační pudy

a přesným definováním tokových podmínek po inokulaci produkčního fermentoru při zdánlivé viskozitě půdy nad 6 m Pas za střekové rychlosti  $698 \text{ s}^{-1}$ . To odpovídá zvýšení obsahu volného sedimentu nad 35 % obj. v období mezi 32 a 40 h kultivace.

Cílem vynálezu bylo nalezení objektivnějšího způsobu hodnocení optimální doby pro inokulaci produkčního fermentoru. Byl proveden komplexní rozbor inokulačního stupně zmapováním průběhu jeho metabolismu s využitím mikrobiologických, biochemických a fyzikálně-chemických metodik. Dále byla ve 4 h intervalech prováděna inokulace produkční půdy v laboratorním měřítku ze sterilních vzorků biosuspenze odebrané z výrobní aparatury. Tímto způsobem bylo možno stanovit maximální produkci účinné látky v daném časovém úseku a korelovat ji s ostatními parametry.

Ukázalo se, že parametrem, který nejvýstižnějším způsobem popisuje průběh kultivace produkčního kmene *Streptomyces noursei* a přitom zahrnuje jak katabolické, tak anabolické metabolické dráhy, úbytek substrátů i přírůstek biomasy, její vitalitu z pohledu rigidity vláken, obsahu vakuol ap. je zjištění reologické charakteristiky vzorku biosuspenze. Pokrok biotechniky nám dosud neumožňuje tato měření provádět in situ, přímo ve fermentoru, při zachování skutečných podmínek míchání, zádrže plynu a ostatních parametrů, které ovlivňují tvar buněk, pevnost hyf a jejich fyziologický stav. Proto je nutno pro optimální řízení celého procesu pomocí zjišťování tokové charakteristiky odebírat ze vsádky reaktoru reprezentativní vzorky a ihned je bez jakékoliv časové prodlevy analyzovat při kultivační teplotě na rotačním viskosimetru. Podle zjištěné závislosti mezi smykovým napětím a stříhovou rychlostí je možno usoudit na jednotlivá stadia růstu kultury. Z reologického pohledu je při kultivaci inokulačního materiálu chování fermentační půdy určeno především morfologií a koncentrací vláken mycelia. Ostatní složky média jak suspensního, tak nesuspensního charakteru se v tomto případě uplatňují z hlediska fyzikálně-chemických vlastností biosuspenze v zanedbatelné míře. Výchozí fermentační půda je kapalinou s tokovým chováním blízkým se newtonskému typu. Po ukončení období klíčení spor se objevují vlákna mycelia, která se intensivně prodlužují a větví. Reologicky se tento jev projevuje vzrůstem viskozity s postupným přechodem k newtonskému chování. U *Streptomyces noursei* byla na daném médiu nalezena dobrá korelace mezi vzrůstem viskozity a hladinou volného sedimentu. Zatímco například při biosyntéze penicilinu informuje sediment v převážné míře o koncentraci buněk a viskozita kromě koncentrace buněk i o jejich morfologii, při biosyntéze fungicidinu je zjišťování obsahu volného sedimentu bez centrifugace podpůrnou metodikou k reologickému měření. V průběhu kultivace očkovacího tanku dochází ke změně newtonského chování na binghamské až pseudoplastické. Podle srovnávacích měření je možno stanovit dostatečnou zralost očkovacího materiálu k inokulaci produkčního fermentoru při zdánlivé viskozitě mezi 6 a 8 m Pas při smykové rychlosti  $D = 698 \text{ s}^{-1}$ . Zdánlivá viskozita výchozího média měřená za stejných podmínek se pohybuje mezi 2 a 3 m Pas. V případě, že není s okamžitou platností k dispozici rotační viskosimetr, byla stanovena pomocná kritéria sledováním průběhu kultivace. Zralost očkovacího materiálu pro inokulaci produkčního stupně je určena těmito hodnotami:

Koncentrace redukujících látek (dle Janíčka) 20 až 30  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  koncentrace amonných iontů (dle Parnas-Wagnera) 0,5 až 0,7  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  obsah volného sedimentu minimálně 35 % na daném médiu. Těchto hodnot je možno dosáhnout za daných vnějších podmínek určených geometrií míchání, velikostí inokulace a složením média za 32 až 40 h.

Řízení kultivace inokulačního materiálu *Streptomyces noursei* podle reologické charakteristiky podle vynálezu má ve srovnání s dosavadními způsoby vedení procesu řadu významných výhod. Vylučuje subjektivitu posuzování zralosti očkovacího stupně, standardizuje průběh celého fermentačního cyklu, využívá optimální fyziologické zralosti mycelia před jeho částečnou autolýzou, zrychluje start tvorby sekundárního metabolismu v produkčním fermentoru, a tím zvyšuje i celkovou produktivitu způsobu přípravy fungicidinu. Zkrácením doby kultivace očkovacího fermentoru se snižuje i riziko jeho zkontaminování. Pokud se jedná o vlastní měřicí reologickou metodu, poskytuje ve velmi krátkém čase, tj. do 5

minut po odebrání vzorku objektivní informaci o koncentraci a morfologii produkčního kmeny, což u ostatních metod není možné.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezují.

#### Příklad 1

Suroviny pro kultivaci *Streptomyces noursei* jsou suspendovány ve vodě, po úpravě pH a přidavku odpěňovacích prostředků je provedena sterilizace média. Po zchlazení média na 29 °C je fermentor naočkován suspensí spor a vsádka je míchána a vzdušněna po celou dobu kultivace. Pro určení optimální zralosti inokula není využíván údaj o hodnotě pH, jehož pokles je nevýrazný a plynule rozložen do 20 h intervalu. Je vyloučeno také subjektivní posouzení růstu a nahrazeno exaktním řízením kultivace podle reologických vlastností vsádky. Po adaptačním období klíčení spor na počátku kultivace, dochází ke zrychlení metabolismu, zvýšení obsahu volného sedimentu na minimálně 35 % obj., poklesu koncentrace redukujících látek na 20 až 30 mg.ml<sup>-1</sup>, poklesu koncentrace amonných iontů na 0,5 až 0,7 mg.ml<sup>-1</sup> a vzrůstu zdánlivé viskozity na 6 až 8 m Pas při stříkové rychlosti 698 s<sup>-1</sup>. Tento údaj zahrnuje mikrobiologické, biochemické a bioinženýrské vlastnosti vsádky a je užit pro rozhodnutí o optimální době inokulace produkčního fermentoru.

#### Příklad 2

Suroviny pro kultivaci *Streptomyces noursei* jsou suspendovány ve vodě, po úpravě pH a přidavku odpěňovacích prostředků je provedena sterilizace média. Po zchlazení média na 29 °C je fermentor naočkován suspensí spor a vsádka je míchána a vzdušněna po celou dobu kultivace. Pro určení optimální zralosti inokula není využíván údaj o hodnotě pH, jehož pokles je nevýrazný a plynule rozložen do 20 h intervalu. Je vyloučeno také subjektivní posouzení růstu a nahrazeno exaktním řízením kultivace podle reologických vlastností vsádky. Po adaptačním období klíčení spor na počátku kultivace, dochází ke zrychlení metabolismu, zvýšení obsahu volného sedimentu na minimálně 35 % obj., poklesu koncentrace redukujících látek na 20 až 30 mg.ml<sup>-1</sup>, poklesu koncentrace amonných iontů na 0,5 až 0,7 mg.ml<sup>-1</sup> a vzrůstu zdánlivé viskozity na 6 až 8 m Pas při stříkové rychlosti 698 s<sup>-1</sup>. Tento údaj zahrnuje mikrobiologické, biochemické a bioinženýrské vlastnosti vsádky a je užit pro rozhodnutí o optimální době inokulace produkčního fermentoru.

Byl vypracován modelový průběh zdánlivé viskozity, ke kterému jsou porovnávány všechny naměřené výsledky z rotačního viskosimetru z odebraných vzorků biosuspenze. Komparace s nomogramem umožňuje řešiteli provést okamžité rozhodnutí a řídit tak standardním způsobem biosyntézu fungicidinu.

### P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob řízení biosyntézy fungicidinu a přípravy inokulačního materiálu kultury *Streptomyces noursei* podle reologických charakteristik s využitím živného média obsahujícího snadno asimilovatelné zdroje uhlíku, dusíku, anorganické živné sole a odpěňovací prostředky, vyznačující se tím, že řízení biosyntézy se provádí kontrolou reologických charakteristik fermentační pudy a přesným definováním tokových podmínek po inokulaci produkčního fermentoru při zdánlivé viskozitě pudy nad 6 m Pas za stříkové rychlosti 698 s<sup>-1</sup>, odpovídající zvýšení obsahu volného sedimentu nad 35 % obj. v období mezi 32. až 40. h kultivace.