

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12N 1/36

C12N 1/26 C02F 3/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95192297.1

[43]公开日 1997年3月5日

[11] 公开号 CN 1144535A

[22]申请日 95.3.1

[30]优先权

[32]94.3.2 [33]DE[31]P4406843.3

[32]95.3.1 [33]DE[31]19507103.4

[86]国际申请 PCT/EP95/00752 95.3.1

[87]国际公布 WO95/23845 德 95.9.8

[85]进入国家阶段日期 96.9.26

[71]申请人 比托普生物技术优化有限公司

地址 联邦德国维滕

[72]发明人 P·巴索尔姆斯 M·卡夫曼

T·施瓦尔兹

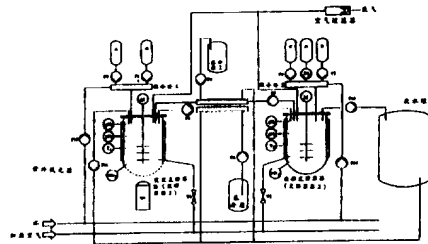
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 培养微生物的方法

[57]摘要

本发明涉及一种快速培养用于分解有害物质的微生物的方法。为实现此目的，依照本发明对微生物的培养、突变处理和稳定化同时在一含有富于营养物质的基介质（基介质 1）的突变发酵容器内进行；在选择发酵容器内进行选择，该发酵容器内含有贫营养物质并富集有害物质的基介质（基介质 2）；从突变发酵容器中连续提取由富于营养物质的基介质（基介质 1）中分离出的少量生物物质并输送到选择发酵容器中；从选择发酵容器中提取由贫营养物质的基介质（基介质 2）分离出的少量生物物质并输送到突变发酵容器中，整个过程以重复循环方式连续地在选择和突变段交替进行，并且突变发酵容器和选择发酵容器以计算机控制的回路连接，采用此控制回路可以相互不受影响地调节两个发酵容器中的发酵参数。



(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1.培养微生物的方法，该微生物适用于分解特定的有害物质，其中在一种促进生长的营养液中对已有的微生物进行培养，接受化学和/或物理突变作用的影响，在一种促进生长的条件下进行稳定化并在有害物质作用下在限制生长的条件下被选择出，其中选出的微生物返回到过程初始段，其特征在于：培养、突变处理和稳定化同时在一突变发酵容器（发酵容器1）内进行，该发酵容器含有富于营养物质的基介质（基介质1），

选择在选择发酵容器（发酵容器2）内进行，该发酵容器含有贫营养物质的、富集了有害物质的基介质（基介质2），

连续地从突变发酵容器（发酵容器1）中提取出由富于营养物质的突变发酵容器（发酵容器1）的基介质（基介质1）分离出来的少量生物物质并输送到选择发酵容器（发酵容器2）中，

连续地从选择发酵容器（发酵容器2）中提取出由选择发酵容器（发酵容器2）的贫营养物质的基介质分离出来的少量生物物质并输送到突变发酵容器（发酵容器1）中，

整个工艺过程以重复的循环过程的方式连续地在选择和突变段交替进行，

其中一方面突变发酵容器（发酵容器1）和另一方面选择发酵容器（发酵容器2）配备有计算机控制的调节回路，采用此调节回路可以相互不受影响地调节两个发酵容器中的发酵参数。

2.依照权利要求1的方法，其特征在于：选择反应器工作时的毒素恒定。

3.依照权利要求1的方法，其特征在于：选择反应器工作时的浊度恒定。

4.依照权利要求1、2或3的方法，其特征在于：在生物物质由一发酵容器输送给另一发酵容器时生物料的基介质被更换。

5.依照权利要求4的方法，其特征在于：基介质的更换在设置于发酵容器间的渗析段进行。

6.依照上述权利要求中一项或多项的方法，其特征在于：突变发酵

容器（发酵容器1）的基介质（基介质1）内含有待分解的有害物质。

7.依照权利要求6的方法，其特征在于：突变发酵容器（发酵容器1）工作时的毒素恒定。

8.依照权利要求6的方法，其特征在于：突变发酵容器（发酵容器1）工作时的浊度恒定。

说 明 书

培养微生物的方法

本发明涉及一种培养微生物的方法，该微生物适用于分解特定的有害物质，其中对已有的微生物在一种促进生长的营养液中进行培养，接受化学和/或物理突变作用的影响，在促进生长的条件下被稳定化并在有害物质作用下在限制生长的条件下被选择出，其中选择出的微生物返回到过程初始段。

用于生物分解有害物质的微生物主要用于废料清除以及废水和空气的净化，在上述过程中有害物质被微生物分解或被转换成消纳不成问题的其它物质，为对有害物质进行有效的生物分解，相应的微生物除特殊的分解能力外还必须具有最佳的有害物耐受能力和尽可能高的裂殖率及遗传稳定性。

在 DE41 24 900A1 中公开了一种用于培养具有分解有害物质能力的细菌实变种的方法，采用此方法时在非生长限制条件下对细菌加以培养，进行产生突变的紫外线照射并接着在生长限制条件下将突变的细菌与有害物质放在一起。必要时可以将微生物由选择阶段传送给第一反应器，在反应器中对微生物加以稳定化，以便接着在突变阶段重新对其进行紫外线照射。

但经证明，已有技术的方法并不适于培养这种可以分解有机化合物，尤其是复杂的化合物的微生物种群，这是因为一次或两次突变处理不足以在合理的时间内实现对适用于分解复杂的有机化合物的微生物种群的开发。这首先是一个基本统计问题，该统计问题以很大的概率与下述情况相关，即为了分解复杂的有机有害物质需要多次分解反应，该分解反应顺序进行并在反应过程中生成中间产物，该中间产物可能比初始产物对微生物毒素要大。随着时间的推移，选择介质的成份也在不断变化，以致微生物种群在分解能力和耐有害物质能力一直要反复适配。该适配需要一些时间并导致整个过程持续较长并因而不经济的。

由于对微生物种群的培养、突变处理和稳定化在不同的反应器中进行，故采用已有技术公知的方法还需要付出大量的设备代价。此外，微生物在富于营养物质的介质中稳定化后，为对含有有害物质的选择介质接种，被直接输送到选择发酵容器中。这样有可能会出现在接受选择的生物质中尚含有被带入选择发酵容器中的大量的营养物质并且该营养物质将对选择造成不利的影晌，这是因为这些营养物质将被微生物优先作为营养物质源加以利用。只有当被带入的营养物质消耗尽时，才开始进行对分解有害物质的微生物进行选择。这首先导致对不能分解有害物质的微生物的正选择，造成对整个选择过程的附加迟滞。

所以本发明的任务在于，进一步设计本说明书引言中所述方式的方法，一方面可以精确地控制在促进生长的条件下的培养和突变，另一方面可以精确地控制在抑制生长的条件下的选择。并据此用很少的设备代价即可实现对自然演化过程尽可能紧缩和有针对性的引导，以便可以采用此方式尽可能迅速地培养具有所需特性的微生物。

为解决此项任务，本发明以说明书引言部分中所述方式的方法为基础建议，

—培养、突变处理和稳定化同时在一含有富于营养物质的基介质的突变发酵容器中进行，

—选择在选择发酵容器中进行，选择发酵容器含有贫营养物质的并富集有害物质的基介质，

—连续地从突变发酵容器中提取出由富于营养物质的突变发酵容器的基介质分离出来的少量生物质并输送到选择发酵容器中，

—连续地从选择发酵容器中提取出由选择发酵容器的贫营养物质的基介质分离出来的少量生物质并输送到突变容器中，

—整个过程以重复的循环过程的方式连续地在选择和突变段交替进行，

其中一方面突变发酵容器，另一方面选择发酵容器配备有计算机控制的调节回路。采用此调节回路可以相互不受影响地调节两个发酵容器中的发酵参数。

依照本发明的方法以极其有益的方式采用一双发酵容器系统运作，

在该系统中进化的两个原理—选择和突变—可以分别被最佳化。其中微生物在两个在运作中互为接种的发酵容器中连续地在选择和突变段被交替培养。在突变发酵容器中可以通过紫外线照射和/或向培养物中添加突变化学品大大提高微生物的突变率，同时在选择发酵容器中为相应的突变型建立针对分解有害物质相应的条件。通过反复进行突变处理提高了微生物种群的遗传多样性，从而当在选择反应容器中的条件，即分解过程中中间产物量的比例变化时，微生物种群的分解能力和耐有害物质能力可以较为迅速地适配。这样与已有技术各单独的突变或选择相比，通过在一个循环过程进行突变和选择实现的微生物种群的进化速度要快得多。

因而本发明的方法可以较为迅速地针对特定的分解能力和/或耐有害物质能力对整个生物群落泛化或特化。本方法的优点在于通过有针对性的控制进化准天然地生成微生物。与遗传操作的微生物相反，它降低了产生无效的回复突变型的风险。采用计算机控制的调节回路实现了可复现调整的特定的化学和工艺条件并且采用此方式对所有单独过程可分别实现最佳条件。

本发明方法的一种特别有益的实施方式在于，选择发酵容器（发酵容器 2）工作时毒素恒定，即在工艺中有害物质浓度保持不变。此点一方面的优点在于，在整个工艺中选择压力保持不变，因而仅那些具有耐有害物质能力的和可以分解有害物质的微生物可以生长，同样另一方面的优点在于，可以较为迅速地调整微生物群落的生物群落平衡。

在本发明的另一优选实施方式中选择发酵容器（发酵容器 2）工作时浊度恒定（turbidostatisch）。此时，选择过程主要通过选择发酵容器中的生物质进行控制。

在将生物质由一个发酵容器输送到另一个发酵容器时最好更换生物质的基介质。该基介质的更换宜在设置在发酵容器间的透折段进行。采用此方式防止了来自一个发酵容器的介质进入另一个发酵容器，防止为微生物提供营养物质，该营养物质将先于有害物质被利用，这将导致对选择过程的迟滞。此外通过在透折段进行的对新介质的适度的适应实现了在每次变换发酵容器时对迟滞期的缩短并从而加速了整个过程。另一

优点在于，通过在选择和突变发酵容器间进行的介质的更换可以去除吸收紫外线的物质，该吸收紫外线的物质包含在选择介质中或在微生物代谢中生成并沉淀在介质中并在进行紫外线照射时作为降低突变效率的诱因。

在本发明方法的优选的实施方式中，突变发酵容器（发酵容器 1）的基介质（基介质 1）含有待分解的有害物质。突变发酵容器工作时宜毒素恒定。

在本发明的另一优选的实施方式中，突变发酵容器（发酵容器 1）工作时，浊度恒定。

下面将对照附图对本发明方法的实施例加以说明，该附图对用于实施本方法的设备结构做了示意表述。

图中所示的设备具有两个其容量为 1 至 2 升的发酵容器，即突变发酵容器（发酵容器 1）和选择发酵容器（发酵容器 2），这两个发酵容器可以连续工作。这两个发酵容器配备有如下标准传感器：测定 pH 值的 pH_1 和 pH_2 、测定氧含量的 PO_1 和 PO_2 、测定温度的 T_1 和 T_2 和测定光密度的 OD_1 和 OD_2 。此外在两个发酵容器或两个发酵容器的旁路中有用于检测当时毒素浓度（“选择基质”）的传感器。发酵容器 2 可以通过泵 P6 和后置的可实现适度介质适应的渗析段用来自发酵容器 1 的微生物连续接种。同样，发酵容器 1 通过泵 P7 和后置的渗析段用来自发酵容器 2 的微生物接种。泵 P8 和 P9 用于对渗析段供应基介质。通过阀门 V_1 和 V_2 对两个发酵容器送入压缩空气并且两个发酵容器配备有可控制搅拌器 M。在渗析段，各传输给另一发酵容器的微生物从来源—发酵容器的基介质中分离出来并被添加入目标—发酵容器的基介质中。

突变发酵容器（发酵容器 1）可进行紫外线照射。光路穿过石英窗。对发酵容器 1 通过混合件 1 及泵 10（水）、P1（介质浓缩物）和 P2（培养基）供给介质。为保持发酵液的体积不变，泵 P11 用于根据液位抽出并泵入废水罐中。

通过混合件 2 及泵 P12（水）、P3（介质浓缩物）、P4（培养基）和 P5（“选择基”）对选择发酵容器（发酵容器 2）送入介质。为保持发酵液的体积不变，泵 P13 用于根据液位抽出并泵入收集罐。

系统为模块结构并可应用不同类型的选择反应器。

所有的泵都是针对持续工作设计的并通过相应的接口由一工艺控制系统调节。废水罐的容量分别为 200 升。由两个发酵容器系统自己，而不是通过工艺控制系统对送风量、搅拌器转速、碱或酸的输送和调温进行调节。

说明书附图

