

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) FV 7687-84.H
(22) Přihlášeno 10 10 84
(30) Právo přednosti od 25 10 83 DD
WP C 12 N/255944

(40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 30.10.90
(89) 229854, 25 10 83, DD

(11) 264022

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20

(75)
Autor vynálezu

GROSSE HANS-HELMUT dr., JENA, MENZEL KLAUS-DIETER dr.,
APOLDA, MENNER MICHAEL dr., MÜLLER PETER-JÜRGEN dr.,
JENA-AMMERBACH, POHLE HANS-DIETER dr., BOCKER HARALD dr.,
EFFENBERGER VILFRID dr., PLONKA GUNTER dr.,
HESS WERNER, JENA, (DD)

Způsob fermentační výroby sekundárních metabolitů

(54)

(57) Řešení se týká získávání vedlejších metabolitů fermentací. Získávání vedlejších metabolitů se děje bezlimitním vedením fermentace. Způsob se provádí za nepřetržitě sledovaných a regulovaných společných parametrů procesu, jako hodnoty pH, rychlosti dávkování roztoku louhu, hodnoty pO₂, reakčního tepla a složení odcházejících plynů. Pro řízení dávkování substrátů se používá jako měřítko fyziologicky aktivního množství fosfátu aktuální rychlost dávkování alkaliického roztoku. Jako roztok se používá zejména hydroxid amonný.

Название изобретения

Способ ферментативного получения вторичных метаболитов

Область применения изобретения

Изобретение относится к способу ферментативного получения вторичных метаболитов, предпочтительно антибиотиков, на характеристику образования которых можно воздействовать путем управления обменом веществ микроорганизмов-продуцентов способом прямого или/и косвенного прибавления различных, например, фосфатсодержащих веществ во время ферментации. Таким образом, изобретение имеет значение для микробиологической промышленности.

Характеристика известных технических решений

Было уже предложено, чтобы, наряду с установкой, в частности уменьшением, концентрации доступного фосфата в начальной питательной среде для ферментаций, с целью получения вторичных метаболитов периодически прибавлять фосфатсодержащие вещества в начале ферментации и/или во время дальнейшего протекания ферментации с избежанием дальнейших лимитаций, чтобы повлиять на регулируемые взаимодействия биологической системы с целью повышения скорости образования продукта.

Что касается применения вышеназванного изобретения в так называемых ферментациях с управлением в реальном масштабе времени, то трудность его осуществления заключается в том, что приходится пользоваться установившимися в ферментационной технике, непрерывно измеряемыми общими параметрами процесса, как значение pH, значение pO_2 , скорость дозирования, состав отходящего газа (образования CO_2), образование тепла и т.д., в качестве первичных регулируемых параметров процесса вместо концентраций субстрата, которые следует дополнительно определить только при помощи трудоемкого химического анализа. Эта необходимость вытекает из существующего уровня автоматизированной измерительной техники в области биотехнологии (Sukatsch, D.A., Nesselmann, G.: Automatische Parametererfassung bei industriellen Fermentationen. Chemie-Technik 6 (1977), 2617).

Цель изобретения

Целью изобретения является проведение без лимитаций ферментационных процессов получения вторичных метаболитов.

Изложение сущности изобретения

В основу изобретения положена задача описывать способ получения вторичных метаболитов, который включает в себя технологически удобное решение управления в реальном масштабе времени промышленными / процессами ферментации с прямым или/и косвенным дозированием субстрата, в частности фосфата, источников углерода, источников азота, микроэлементов и веществ с эффекторным действием. При этом управление дозированием субстратов должно основываться на непрерывно учитываемых и регулируемых общих параметрах процесса, как значение pO_2 , значение pH, образование тепла и CO_2 , в частности на скоростях дозирования для регулирования pH и соответственно скоростях образования тепла и CO_2 , и обеспечивать осуществление эффективной скорости образования продукта в течение длительного периода времени ферментации.

Неожиданно было найдено, что временная характеристика скорости дозирования щелочного раствора при регулировании заданного значения pH отражает временную характеристику концентрации фосфата, физиологически активного для превращения источников углерода, источников азота, микроэлементов и веществ с эффекторным действием, пока не будет лимитаций в отношении этих субстратов и содержания растворенного кислорода. Имеется в виду, что скорость дозирования щелочного раствора, который должен прибавляться для сохранения выбранного нижнего порога регулирования pH, пропорциональна физиологически активной концентрации фосфата. Масштаб отображения, следовательно, зависит от установленного нижнего предела регулирования значения pH, начало дозирования щелочного раствора определяется буфером начальной питательной среды.

В дальнейшем осуществлении изобретения в качестве дозируемого щелочного раствора для управления дозированием вышеуказанных субстратов используют гидроокись аммония.

Способ осуществляют следующим образом:

На устройстве для регулирования значений pH устанавливают нижний регулируемый порог pH-значений, например, pH 6,2. Таким образом в процессе ферментации эквивалентная скорость дозирования гидроокиси аммония находится в зависимости от времени. Описанная функциональная взаимосвязь между этой скоростью дозирования и концентрацией физиологически активного фосфата и является мерой активности метаболизма ферментации. Потребляемые источники углерода, источники азота, микроэлементы и вещества с эффекторным действием, находящиеся в соответствии с этой активностью метаболизма, компенсируются дозированием субстратов.

Способ можно осуществить и таким образом, что наиболее эффективную для продуктообразования временную характеристику концентрации фосфата обеспечивают прямым дозированием фосфата за счет установки наиболее благоприятной для хода процесса скорости дозирования гидроокиси аммония. Что касается прямого дозирования фосфата путем добавления фосфатсодержащих веществ из внешней емкости, а также косвенного дозирования фосфата путем предоставления фосфатных соединений ферментативными или гидролитическим расщеплением комплексных компонентов питательной среды, как крахмал, соевой шрот, кукурузный экстракт и др., то было найдено, что величина скорости дозирования гидроокиси аммония своим достоверным нарастанием или падением указывает на переходы между

прямым и косвенным методами дозирования фосфата. Величина изменения определяется притоком фосфата.

Прямое дозирование фосфата определяется также достижением содержания растворенного кислорода, минимально необходимого по причинам физиологического регулирования.

Кроме того способ пользуется фактом, что временная характеристика тепла реакции, возникающего в ферментаторе вследствие активности микроорганизмов, а также образования CO_2 , соответствует временным характеристикам скорости дозирования гидроокиси аммония и концентрации физиологически активного фосфата. По этой причине актуальное тепло реакции и актуальное образование CO_2 , а в то же время и относящиеся к этим величинам скорости образования тоже являются величинами управления дозированием фосфата и других субстратов.

1-й пример осуществления

Изобретение поясняется при помощи примеров осуществления на основании диаграмм.

Лиофилизированный на глюкозо-желатине консервированный мицелий (общий вес консервного содержимого около 300 мг) селектанта BF 32 ноурзеотрицинообразующего штамма IMET JA 3890b суспендируют 3 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия, 0,5 мл этой суспензии служит в качестве инокулюма для 400 мл среды первого пассажа.

Среда первого пассажа содержит следующие вещества из расчета на один литр водопроводной воды: глюкозы - 40 г, обезмасленной соевой муки - 15 г, KH_2PO_4 - 0,3 г, NaCl - 5 г, CaCO_3 - 3 г. Кислотность устанавливает перед стерилизацией на pH 6,5. По 400 мл этой среды заливают в широкогорлые колбы емкостью 2500 мл, закрываемые ватной пробкой. Стерилизацию производят в течение 35 минут при нагревании до 121°C в автоклаве.

Охлажденные до комнатной температуры и засеянные культуры инкубируют в течение 48 часов на качалке (180 мин^{-1}) при 29°C . При помощи 800 мл получаемой таким образом культуральной жидкости первого пассажа засевают на втором пассаже наполненный 180 л термостерилизованной среды (60 минут при 121°C) того же состава, что и первого пассажа, и оснащенный устройствами для аэрации стерильным воздухом и перемешивающим устройством ферментатор из высококачественной стали (общий объем 250 л). Культивирование продолжается в течение 42 часов (pH 5,2) при 27°C - 29°C , при числе оборотов перемешивающего устройства 240 мин^{-1} и скорости аэрации 1 литр воздуха на литр культуральной жидкости в минуту. Ранее приведенные данные касаются необходимых подготовительных работ.

Для основной культуры предназначается оснащенный устройствами для аэрации стерильным воздухом и центрально расположенным перемешивающим устройством ферментатор из высококачественной стали (общий объем 4200 л), наполненный 2500 л питательной среды следующего состава из расчета на 1 литр водопроводной воды: картофельного крахмала - 32 г, глюкозы - 60 г, обезмасленной соевой муки - 11 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 11 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2 г, NaCl - 1 г, CaCO_3 - 6 г, ZnSO_4 - 0,5 г. На литр культуральной жидкости прибавляют по 0,5 г пеногасителя на силиконовой основе. Кислотность устанавливают перед стерилизацией на pH 6,2. Стерилизацию питательной среды (без гликозного компонента) производят *in situ* путем подогрева паром рубашки до 75°C и затем нагревом при помощи острого пара до 120°C в течение 15 минут. После охлаждения до 29°C прибавляют в асептических условиях глюкозу, отдельно стерилизованную в форме

50%-ного водного раствора 30-минутным нагревом до 120°C. Перед засевом начальную кислотность устанавливают серной кислотой таким образом, чтобы начальное значение pH после засева составляло 7,4. Ферментационную среду основной культуры, засеянную 4% инокулята второго пассажа, культивируют в течение 120 часов при 29°C, скорости аэрации 1250 литров в минуту (0-й + 12-й часы) или 2500 литров в минуту (12-й + 120-й часы), избыточном давлении 0,03 МПа при перемешивании с числом оборотов 180 мин⁻¹.

Полученные временные характеристики показывают:

Диаграмма 1 - Временные характеристики продуцированного антибиотика ноурзеотрицин и сухого веса биомассы

Диаграмма 2 - Временные характеристики pH-значения, концентрации глюкозы и аммонийного азота

Диаграмма 3 - Временную характеристику скорости дозирования гидроокиси аммония, концентрации фосфата и содержания растворенного кислорода

Диаграмма 4 - Временные характеристики состава отходящих газов из кислорода и двуокиси углерода, а также тепла реакции

Диаграмма 5 - Временные характеристики специфической скорости образования продукта и специфической скорости роста

Что касается управляющего вмешательства в процесс, то ферментацию ведут путем прямого дозирования фосфата и дозирования глюкозы в зависимости от условий скорости дозирования гидроокиси аммония.

Заданный предел pH составляет 6,2±0,05, а нижний предел pH 6,15 достигается через 38 часов ферментации.

Для прямого дозирования фосфата используют стерильный водный раствор дигидрофосфата калия. Этот раствор добавляют от 2-го до 32-го часа таким образом, что для возбуждения активности обмена веществ на один литр культуральной жидкости используют в целом 42 мг фосфора в форме фосфата.

С учетом выбранного интервала заданного pH-значения, буферного состояния питательной среды и концентрации щелочного раствора дозирование гидроокиси аммония (25%-ный) начинают с 38-го часа. Наблюдаемое уменьшение нарастания скорости дозирования гидроокиси аммония вызывает дальнейшее прямое дозирование фосфата в количестве по 8,5 мг фосфатного фосфора на литр культуральной жидкости в пределах между 47-м и 48-м часами и соответственно 53-м и 54-м часами.

За счет этого скорость дозирования достигает своего максимального значения к 62-му часу и затем снижается в соответствии с переходом от прямого к косвенному дозированию фосфата. Таким образом процесс ферментации примерно в течение 20 часов протекает почти с благоприятной специфической скоростью дозирования порядка 230 мл 25%-ного раствора гидроокиси аммония на кубический метр культуральной жидкости в час.

Прибавляемого раствора гидроокиси аммония достаточно для того, чтобы концентрацию азота держать в физиологически благоприятных пределах.

Поэтому дальнейших источников азота не прибавляют. Что касается источника углерода, то усиленное после второго дозирования фосфата уменьшение нараста-

ния скорости дозирования гидроокиси аммония служит поводом к прибавлению 48 г глюкозы на литр культуральной жидкости к 56-му часу.

Показание к переходу к косвенному дозированию фосфата путем легкого увеличения скорости дозирования гидроокиси аммония на 95-м часу служит критерием пуска второго дозирования глюкозы в количестве 18 г на литр культуральной жидкости.

Что касается прямого дозирования фосфата, то в отношении содержания растворенного кислорода лимитирований не имеется.

Тепло реакции и образование CO_2 имеют характеристику ферментационных фаз по аналогии со скоростью дозирования гидроокиси аммония и служат для предотвращения лимитаций субстратов.

Конечное значение ноурзеотрицина порядка 10,5 г на литр культуральной жидкости достигается тем, что эффективная специфическая скорость образования продукта в течение 45 часов составляет $7 \cdot 10^{-3}$ в час + $8 \cdot 10^{-3}$ в час. Кроме того имеет место полная ферментация глюкозы, а заданный технологией очистки лимит по биомассе не превышает.

2-й пример осуществления

Консервированные споры (спорулированное просо) селектанта DG1 штамма *Penicillium chrysogenum* служат в качестве посевного материала для выращивания посевной культуры для двух процессов ферментации бензилпенициллина на основной культуре, переводя споровую суспензию с общим числом около $4 \cdot 10^9$ спор в посевную культуру, выращиваемую в течение 42,5 часа. Посевной ферментер (ферментер из высококачественной стали и стекла с перемешивающим устройством, имеющий общий объем 4,5 л), наполненный 2,5 л питательной среды, стерилизуют в автоклаве в течение 60 минут при 121°C .

Питательная среда содержит следующие компоненты из расчета на один литр среды:

Глюкозы - 25 г, мелассы - 5 г, кукурузного экстракта (сухого вещества) - 5 г, соевой муки - 20 г, CaCO_3 - 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5 г, NaNO_3 - 3 г, KH_2PO_4 - 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 г, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,007 г, подсолнечного масла - 5 г, полипропиленгликоля - 0,2 мл. Перед стерилизацией значение pH устанавливают при помощи водного раствора едкого натра на 6,5, а после стерилизации значение pH в среде, охлажденной до 25°C (температура процесса ферментации посевной и основной культур), составляет 6,25.

В процессе выращивания посевной культуры непрерывно измеряемое и регулируемое значение pO_2 постоянно держат на уровне выше 60% концентрации насыщенности путем регулирования числа оборотов перемешивающего устройства. Значение pH тоже измеряют и регистрируют непрерывно. Поначалу pH снижается, проходя относительный минимум pH. Затем pH проявляет местное повышение, после чего он достигает фазы своего минимального значения, которому следует быстрое нарастание. При значении pH 7,2 посевная культура достигает степени зрелости, а от нее используют по 500 мл для засева основных культур в ферментерах с общим объемом по 4,5 л. После подачи посевной культуры рабочий объем составляет по 3 литра. Приготовленные среды по 2,5 л содержат компоненты хлопкового масла - 120 г, глюкозы - 45 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 7,5 г, CaCO_3 - 12 г, подсолнечного масла - 15 г, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 24 г, полипропиленгликоля - 0,6 г и стерилизуются в автоклаве в течение 60 мин при 121°C после их внесения в ферментер без предварительной установки значения pH. После стерилизации значение pH составляет 7,2.

На регуляторе pH нижний порог регулирования устанавливают на 6,6. Для целей регулирования pH используют в качестве щелочного раствора гидроокись аммония (приемник 200 мл, стерильная фильтрация). В качестве дальнейших дозируемых субстратов запасаются для каждого ферментера 10%-ной фенилуксусной кислотой (pH установлено на 7,0 при помощи водного раствора едкого кали, объем 350 мл) и 70%-ным раствором глюкозы (1000 мл). Эти растворы стерилизуют одновременно с ферментерами, так как сосуды с запасными растворами уже подключены перед автоклавированием. Один ферментер имеет еще один дополнительный сосуд дозирования с 400 мл фосфатного раствора, содержащего всего 2,63 г K_2HPO_4 .

Для пеногашения запасаются стерильным полипропиленгликолем в количествах по 20 мл. Из них в стартовой фазе выращивания основных культур в ферментеры добавляют по 5 мл для подавления склонности к пенообразованию. Наступает быстрое снижение значения pH, порог регулирования достигается через полчаса. Здесь начинается дозирование NH_4OH ; данная скорость дозирования раствора регистрируется каждый час. На диаграмме 6 представлены временные характеристики скорости дозирования NH_4OH и на основе этого скорости дозирования $\text{PO}_4\text{-P}$ и глюкозы на один из ферментеров с основной культурой. Скорость дозирования щелочного раствора быстро снижается (в соответствии со снижением количества растворимого $\text{PO}_4\text{-P}$ за счет растущей культуры). Такой тенденции к снижению противодействуют способом внешнего дозирования фосфата, начиная со 2-го часа процесса. При этом дозирование $\text{PO}_4\text{-P}$ увеличивают только до такой меры, чтобы скорость подачи NH_4OH продолжала монотонно снижаться. В таких условиях ее нулевая точка, наступающая с 6-го часа, показывает, что дозируемый $\text{PO}_4\text{-P}$ удовлетворяет потребности не полностью после того, как стартовое количество $\text{PO}_4\text{-P}$ (87 мг/л свободной стерилизации) израсходовано. Эту частичную лимитацию по $\text{PO}_4\text{-P}$ используют для направленного формирования внеклеточной активности фосфатазы, т.е. косвенное дозирование $\text{PO}_4\text{-P}$ путем ферментативной эксплуатации комплексных субстратов устанавливается на реологическое равновесие.

В момент достижения нулевой точки дозирования NH_4OH начинает действовать дозирование фенилуксусной кислоты в дозе 0,65 мг/л.час. С 11-го часа возобновляется дозирование щелочного раствора, а внешнее дозирование $\text{PO}_4\text{-P}$ сокращается, так как индуцируется внутреннее дозирование $\text{PO}_4\text{-P}$. Через 14,5 часа полностью заканчивается внешнее дозирование $\text{PO}_4\text{-P}$. Через 15 часов нулевая точка скорости дозирования NH_4OH показывает полное израсходование стартовой глюкозы. Эта нулевая точка и является стартовой точкой дозирования глюкозы. Ее доза сначала устанавливается на величину 0,55 г/л.час, а с 15-го часа увеличивается до 1,25 г/л.час, чтобы стабилизировать скорость дозирования NH_4OH на уровне 0,1 мл/л.час. Эти установки вызывают безлимитационность в отношении снабжения углеродом и азотом на протяжении времени ферментации, которая проводится как основной цикл циклической ферментации бензилпенициллина. Ферментер сравнения работает по стандартному способу без использования показателя скорости дозирования NH_4OH для управления дозированием в истинном масштабе времени.

Дозирование фенилуксусной кислоты проводится с 11-го часа в дозе 0,65 мг/л.час, дозирование глюкозы - с 23-го часа в дозе 1,25 г/л.час. Режим внешнего дозирования фосфата не используется. Во время ферментационных процессов значение pO_2 всегда держится на уровне выше 50% путем изменения числа оборотов. Скорости дозирования регулируют по мере увеличения объема.

Временные характеристики выхода продукта во время основного цикла:

Бензилпенициллин (МЕ/мл)		
Время (час)	Ферментер с управлением в истинном масштабе времени	Ферментер без управления в истинном масштабе времени
22	1750	900
35	4000	3450
47	6700	4800
59	8600	6100
71	13800	8200

В конце основного цикла наблюдается повышение выхода продукта на примерно 60%. Выход 8000-9000 МЕ/мл через 70 часов соответствует прежнему состоянию техники.

Формула изобретения

1. Способ управления в истинном масштабе времени ферментативным получением вторичных метаболитов с дозированием субстрата и добавлением количества щелочного раствора, необходимого для сохранения выбранного нижнего порога регулирования значения pH, отличающийся тем, что добавляемое за единицу времени количество щелочного раствора (скорость дозирования щелочного раствора) используют для управления дозированием щелочного раствора) используют для управления дозированием источников углерода, источников азота, микроэлементов и веществ с эффекторным действием, а также устанавливают безлимитационность.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дозирование азота с использованием гидроокиси аммония осуществляется через самый щелочный раствор.
3. Способ по п.п. 1 и 2, отличающийся тем, что скорость дозирования щелочного раствора устанавливается путем добавления фосфатсодержащих веществ.

Аннотация

Изобретение относится к способу ферментативного получения вторичных метаболитов. Оно предназначается для безлимитационного ведения ферментаций для получения вторичных метаболитов.

Способ проводится путем применения непрерывно учитываемых и регулируемых общих параметров процесса, как значение pH, скорость дозирования щелочного раствора, значение pO_2 , тепло реакции, состав отходящих газов. Актуальная скорость дозирования щелочного раствора как мера физиологически активного количества фосфата используется для управления дозированием субстратов. В частности в качестве щелочного раствора используется гидроокись аммония.

Признано изобретением по результатам экспертизы, осуществленной Ведомством по делам изобретений и патентов ГДР.

6 чертежей

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob fermentační výroby sekundárních metabolitů s řízením dávkování substrátu v určitém časovém úseku a přidávání množství alkalického roztoku, potřebného pro udržení a regulaci nižší hodnoty pH, vyznačující se tím, že množství alkalického roztoku, přidávané za časovou jednotku, tedy rychlost dávkování alkalického roztoku, se používá pro řízení dávkování zdrojů uhlíku, zdrojů dusíku, mikroelementů a efektorů a také se seřídí bezlimitní průběh.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že dusíku za použití hydroxidu amonného se provádí přes samotný alkalický roztok.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že rychlost dávkování alkalického roztoku se nastaví přidáním látek obsahujících fosforečnan.

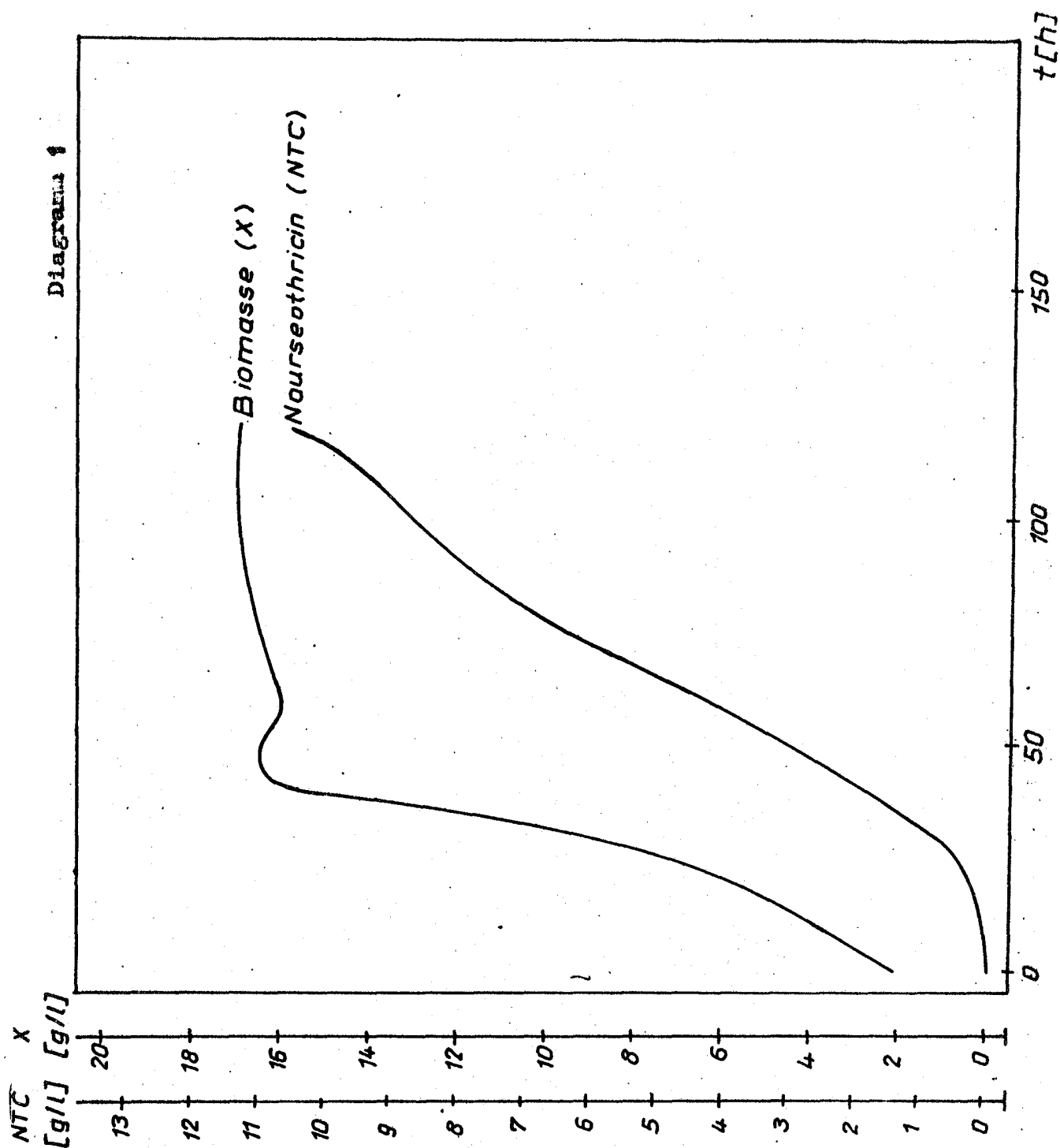


Diagramm 2

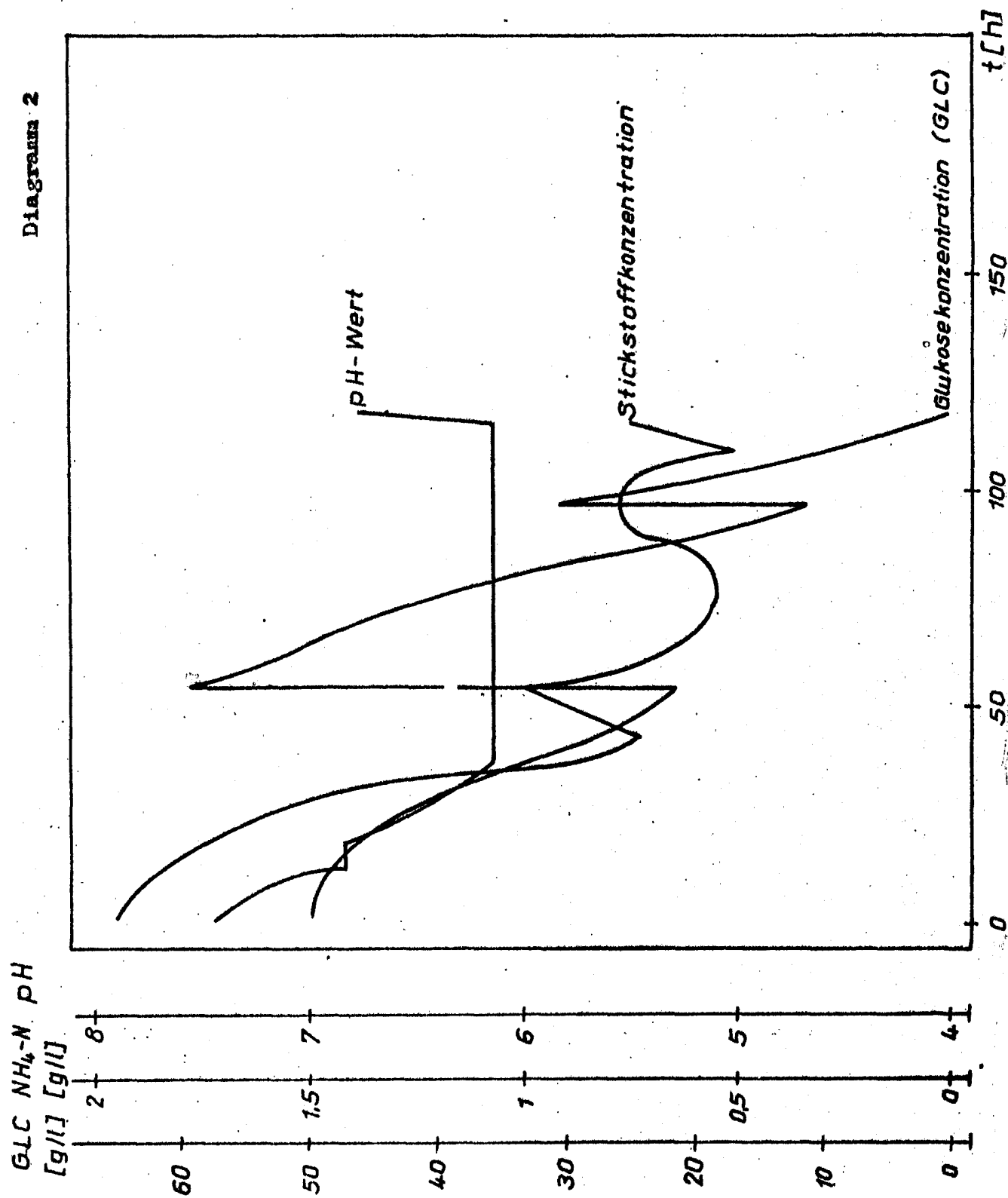
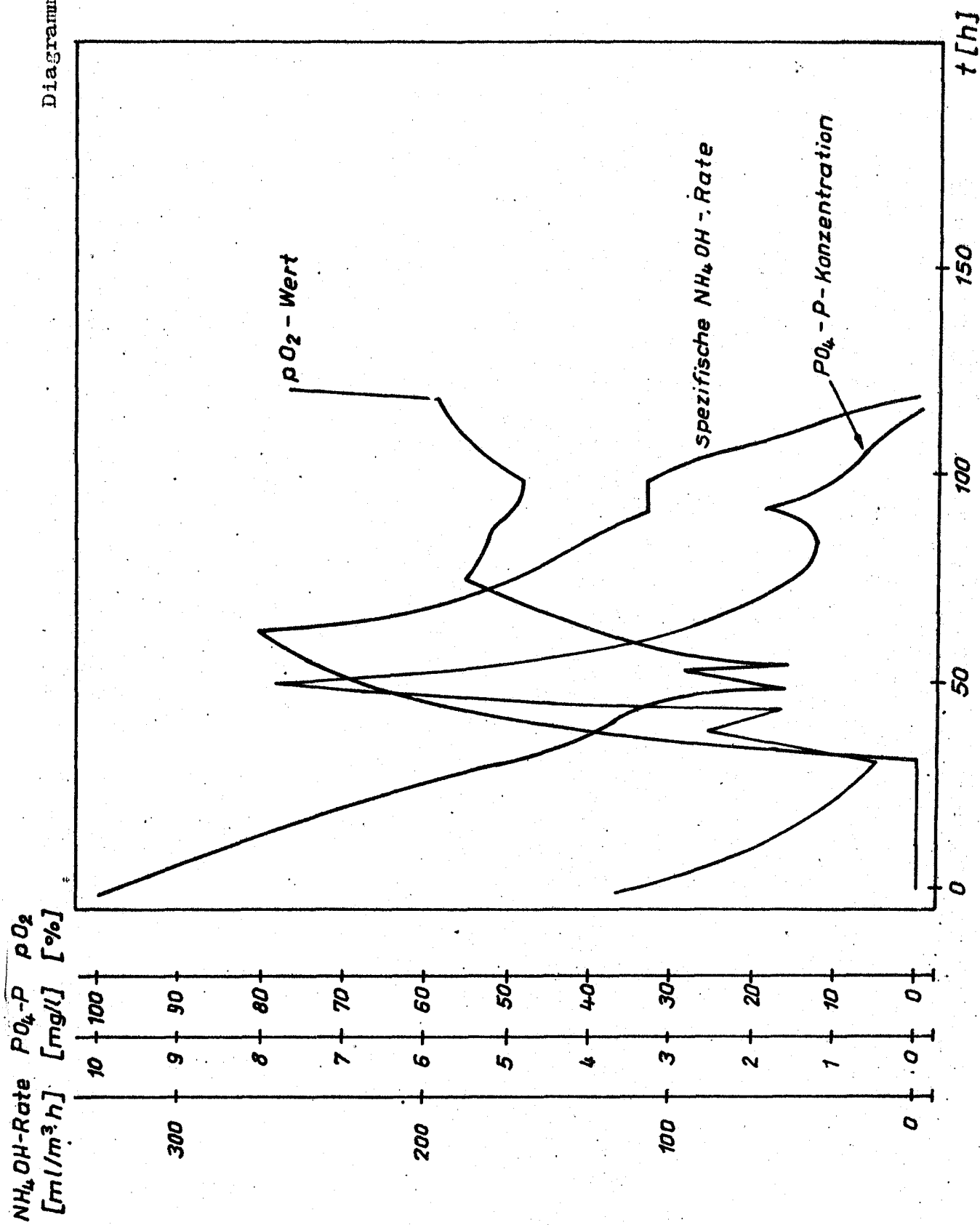


Diagramm 3



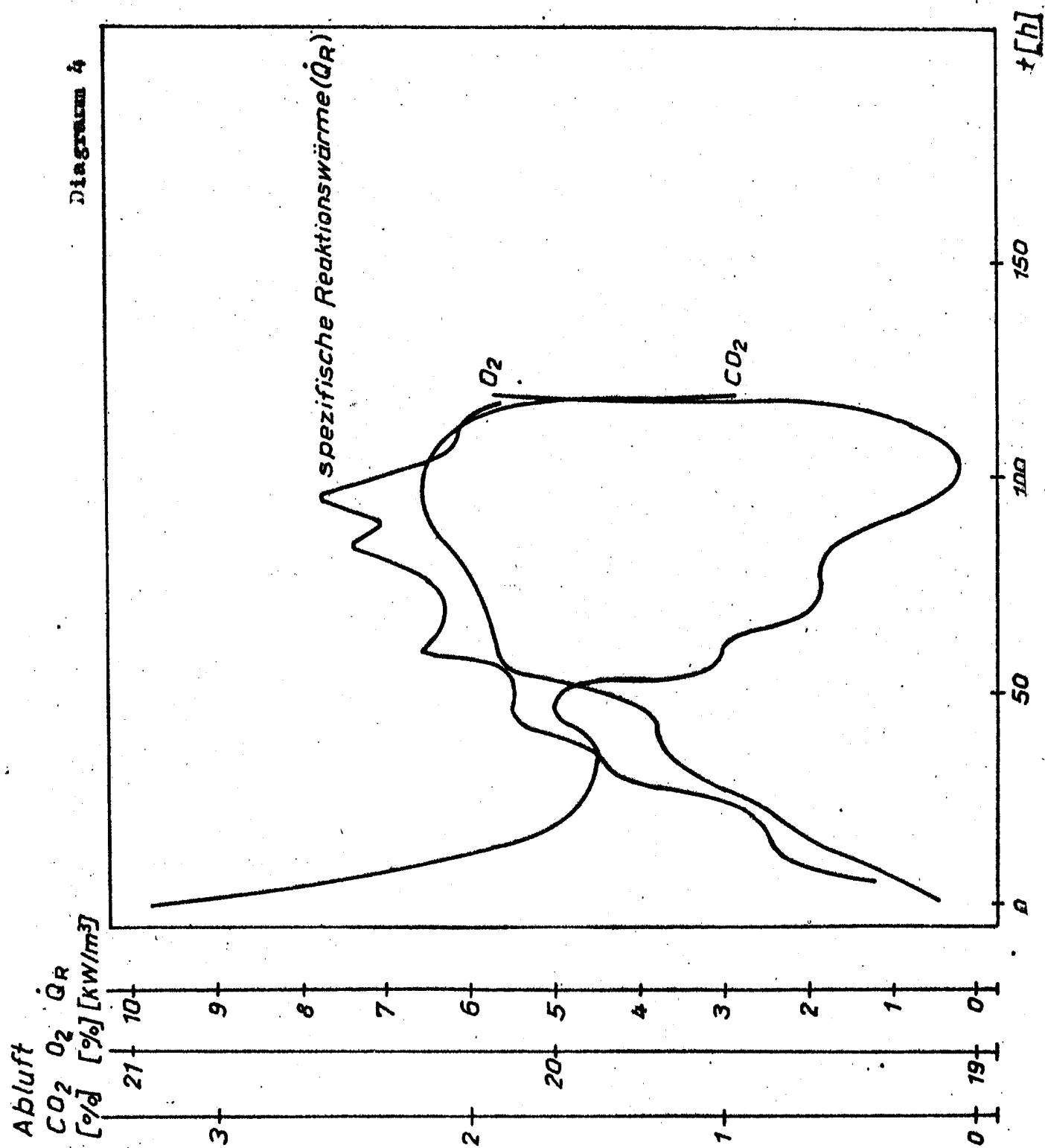
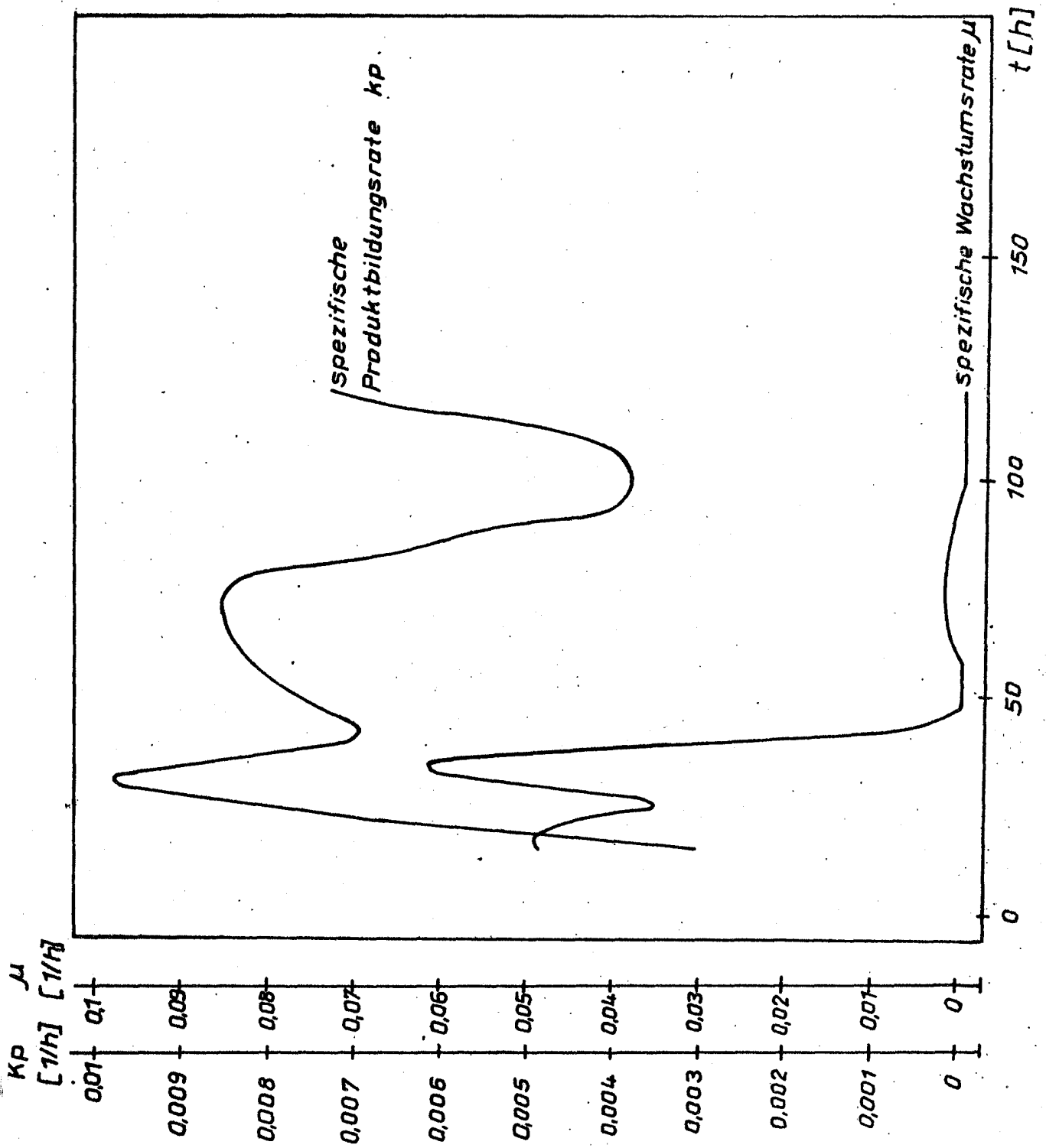


Diagramm 5



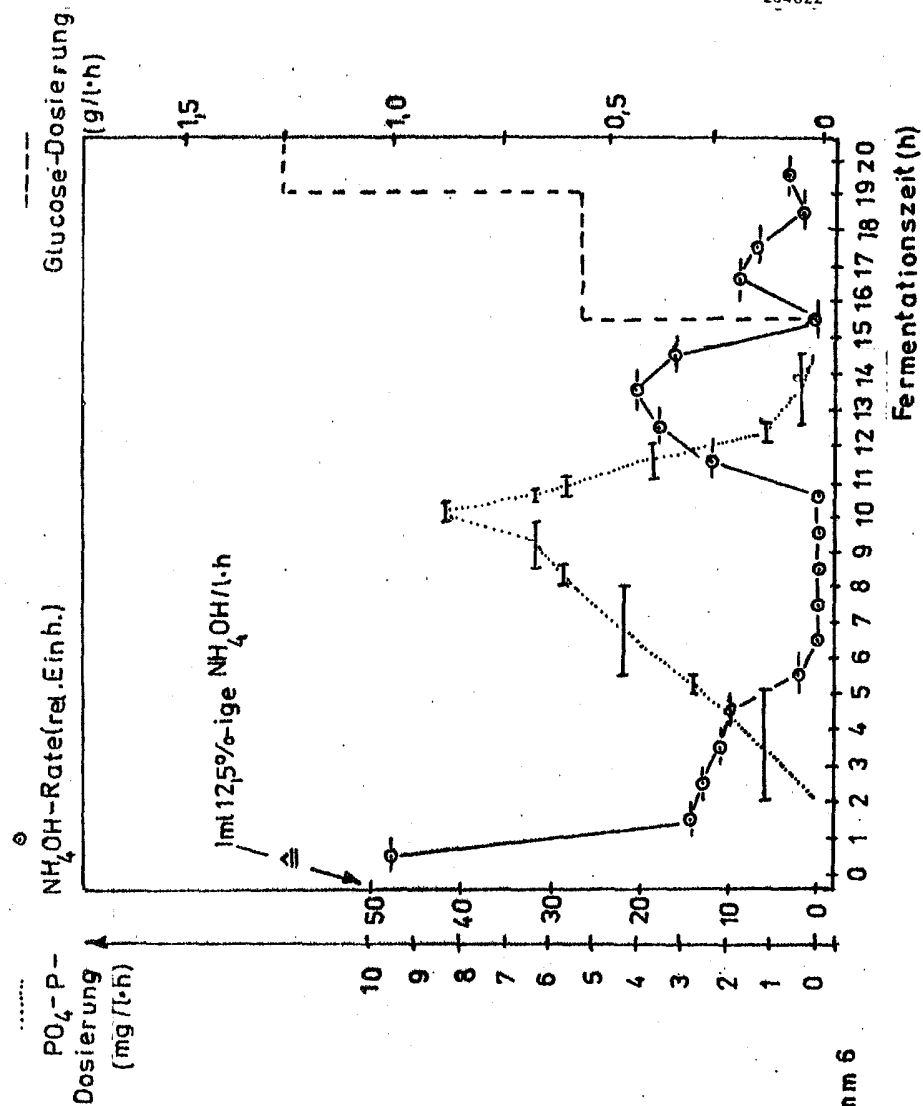


Diagramm 6