



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 266 367

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 7680-84
(22) Přihlášeno 10 10 84
(30) Právo přednosti od 25 10 83 DD
C 12 P/255945

(40) Zveřejněno 12 02 87
(45) Vydáno 29 05 92
(89) 281949, 25 10 83 DD

(11)

(13) U1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 19/28

(75)
Autor vynálezu

MENNER MICHAEL dr., BORMANN ERNST-JOACHIM dr.,
HILLIGER MATHIAS dr., MÜLLER PETER-JÜRGEN dr.,
ROTH MARTIN dr., BOCKER HARALD dr.,
GROSSE HANS-HELMUT dr., BERGTER FRIEDRICH prof. dr.,
HESS WERNER, KÖDEL JULIANE, HELLER INGEBORG dr.,
PLONKA GUNTER dr., JENA (DD)

(54)

Způsob fermentační výroby nourseothricinu

(57) Je popsán fermentační způsob výroby nourseothricinu, jehož pomocí se s využitím hexozamu chudých živných půd obsahujících dimerní, oligomerní nebo polymerní zdroje sacharidů a odpovídajících kmenů, v průběhu průměrně stočtyřiceti hodinové fermentace při regulování kyselosti získávají vysoké koncentrace nourseothricinu.

НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ НОУРЗЕОТРИЦИНА

Область применения изобретения

Изобретение относится к способу ферментативного получения антибиотика ноурзеотрицин. Этот антибиотик имеет эрготропное действие, а в то же время и важное экономическое значение для сельского хозяйства и фармацевтической промышленности.

Характеристика известных технических решений

Ноурзеотрицин представляет собой выделенный из культуры штамма *Streptomyces noursei* JA 3890b антибиотик, который активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также микобактерий, но обладает также противовирусными свойствами (Bradler, G. und Thrum, H., 1963: Nourseothricin A und B, zwei neue antibakterielle Antibiotica einer *Streptomyces-noursei*-Variante. Z. Allg. Mikrobiol., 3, 105 - 112). Ноурзеотрицин - смесь из стрептогрицинов Г и D (Gräfe, U., Bocker, H., Reinhard, G. und Thrum, H., 1974: Regulative Beeinflussung der Nourseothricinbiosynthese durch o-Aminobenzoessäure in Kulturen des *Streptomyces noursei* JA 3890b. Z. Allg. Mikrobiol., 14, 659 - 673).

Уже предложен способ (WP A 61 K/223 321), согласно которому при помощи этого штамма в аэробных условиях глубинного культивирования продуцируется ноурзеотрицин. Недостатком этого способа является использование ингибиторов дыхательной цепи типа щелочных азидов, бренткатехина и/или амиталя, а также веществ, ингибирующих перенос аминокислот.

В примере осуществления другого патента указывается ферментативный способ получения ноурзеотрицина, при котором за счет периодического питания обеспечивается постоянное наличие глюкозы в культуральной жидкости. Недостатком этого способа является то, что для этого требуются большие количества глюкозы, которую приходится получить из сырья, содержащего полимерные углеводы.

В публикации (Gräfe, U., Bocker, H., Reinhard, G. und Thrum, H., 1974: Regulative Beeinflussung der Nourseothricinbiosynthese durch o-Aminobenzoessäure in Kulturen des *Streptomyces noursei* JA 3890b. Z. Allg. Mikrobiol., 14, 659 - 673) описывается питательная среда, в которой кукурузный крахмал используется в качестве источника углерода. В этом процессе с использованием исходного штамма *Streptomyces noursei* JA 3890b тоже с прибавлением ингибиторов вышеуказанных типов и ингибиторов, описываемых в описании к патенту WP A 61 K/223 321, достигается настолько незначительный выход ноурзеотрицина, что экономическое производство оказывается невозможным.

Цель изобретения

Изобретение имеет целью получение ноурзеотрицина достаточно эффективным способом на малогексозных, в частности, малоглюкозных питательных средах.

Изложение сущности изобретения

В основу изобретения положена задача представить удобный в техническом отношении способ, который позволял бы осуществить промышленное производство ноурзеотрицина посредством малогексозного, димер-, олигомер- или полимерсодержащего источника углерода в питательной среде.

Было найдено, что определенные ноурзеотрицинопродуцирующие штаммы, отличающиеся достаточной амилолитической активностью, с использованием крахмала в качестве первичного малогексозного полимерного источника углеводов накапливают в питательной среде большие количества ноурзеотрицина. Неожиданно было при этом установлено, что эти штаммы накапливают ноурзеотрицин в таких больших количествах также без прибавления ингибиторов дыхательной цепи и соответственно переноса аминокислот. Такие результаты были получены, например, на

ноурзеотрицинопродуцирующих штаммах, депонированных в коллекции института ZIMET под номером ZIMET 43 700, ZIMET 43 701 и ZIMET 43 708.

Исходя из полученных результатов способ согласно изобретению осуществляют следующим образом:

Вегетативный посевной материал используемого ноурзеотрицинообразующего штамма, который был получен собственно известным путем выращивания через несколько стадий из консервированного мицелия, служит для засева ферментационных питательных сред, имеющих следующий основной состав:

- крахмал, в частности, кукурузный крахмал, в качестве основного источника углеводов в количестве 50 - 150 г на литр
- комплексные источники азота в виде арахисового шрота или соевого шрота в количестве 5 - 25 г на литр и/или кукурузный экстракт в количестве 1 - 10 г на литр
- неорганический источник азота, например, сульфат аммония, в количестве 5 - 15 г на литр
- карбонат кальция, например, в виде мела, в количестве 4 - 20 г на литр
- пеногаситель, например, пеногаситель на силиконовой или полиэтиленгликолевой основе или/и растительные жиры.

В течение 72- - 196-часовой ферментации при температурах 28 - 30°C с дополнительным прибавлением и без него охиженных концентрированных полимерных источников углеводов с использованием ферментных препаратов с амилолитической активностью, например, пивоваренного фермента, собственно известным образом, а также при поддержании кислотности культуральной жидкости прибавлением 25% -ного раствора гидроокиси аммония на уровне pH 5,0 - 8,0, предпочтительно при pH 5,5 - 6,5, достигается высокая концентрация ноурзеотрицина в культуральной жидкости.

Переработку ноурзеотрицина проводят собственно известным образом.

Примеры осуществления

Изобретение более подробно поясняется на основании примеров:

Пример No.1

Из консервированного мицелия штамма *Streptomyces noursei* ZIMET 43 700 выращивают предварительные культуры. Они содержат в широкогорлых колбах емкостью 500 мл по 100 мл и соответственно в колбах Эрленмейера емкостью 2,5 л по 400 мл питательной среды следующего состава: на 1 литр водопроводной воды приходится арахисового шрота - 15 г, кукурузного экстракта (100 % сухого вещества) - 10 г, мальтозы - 40 г, сульфата аммония - 5 г, карбоната кальция - 6 г. Значение pH устанавливают перед стерилизацией на 6,5 - 6,8. Стерилизацию проводят в течение 35 минут при 121 °C.

Первый пассив культурыруют в течение 48 часов при 29 - 30 °C на круговой качалке. После получения достаточного количества мицелия по 20 мл раствора предварительной культуры переносят в качестве посевного материала на культуру второго пассажа, которую выращивают в течение 24 часов в одинаковых условиях.

Для засева 10 л питательной жидкости в 15-литровом ферментаторе используют содержимое двух колб второго пассажа культивирования. Состав питательной среды: на литр водопроводной воды приходится кукурузного крахмала - 80г, арахисового шрота - 25 г, кукурузного экстракта - 10 г, сульфата аммония - 10 г, подсолнечного масла - 3 г, мела острова Рюген - 5 г. Значение pH устанавливают перед стерилизацией на 6,8 - 7,0. Стерилизацию проводят в течение 30 минут при 121 °C. Во время ферментации дважды прибавляют по 300 г крахмала (после обработки известным образом пивоваренным ферментом). Кислотность ферментационного раствора поддерживают постоянной на уровне pH 6,2 при помощи гидроокиси аммония. По окончании 144-часовой ферментации с числом оборотов 360 об/мин и скоростью аэрации 0,75 об/об/мин определили 7,2 г ноурзеотрицина на литр культуральной жидкости.

Пример No.2

Две колбы на качалке (2,5 л), содержащие 400 мл питательной среды каждая, засевают каждую 0,5 мл суспензии консервированного мицелия штамма *Streptomyces noursei* ZIMET 43 701 и культивируют в течение 48 часов при 29°C на круговой качалке.

Состав питательной среды: на литр водопроводной воды приходится кукурузного крахмала - 15 г, соевого шрота - 15 г, дигидрофосфата калия - 0,3 г, хлорида натрия - 5 г, карбоната кальция - 1 г. Значение pH устанавливают перед стерилизацией на 6,5 - 6,8. Стерилизацию проводят в течение 30 минут при 121 °C.

Соединенное содержимое первых предварительных культур служит для засева 250-литрового посевного ферментатора, содержащего 150 л питательной среды такого же состава, как у первой предварительной культуры. Культивирование осуществляют в течение 40 часов при 29 °C с числом оборотов 240 об/мин и скоростью аэрации 0,5 об/об/мин, 45 л этой посевной культуры, установленной на pH 6,8 - 7,7, используют в качестве инокулюма для 400 л питательной среды в 720-литровом ферментаторе. Культивирование производят при скорости аэрации 1,0 об/об/мин и числе оборотов 320 об/мин при 29°C. Кислотность культуры автоматически поддерживают постоянной на уровне pH 6,2 добавлением 25%-ного раствора гидроксида аммония.

Питательная среда имеет следующий состав: на литр водопроводной воды приходится кукурузного крахмала - 60 г, арахисового шрота - 10 г, кукурузного экстракта - 2 г, сульфата аммония - 8 г, сульфата цинка - 0,05 г, сульфата марганца - 0,03 г, подсолнечного масла - 0,5 г, мела острова Рюген - 3,75 г. Кислотность питательной среды устанавливают перед стерилизацией на pH 6,8 - 7,0. Стерилизацию производят острым паром при 120°C в течение 30 минут. Во время ферментации, т.е. на 30-м, 45-м, 54-м, 70-м, 100-м, 120-м часах, 6 раз прибавляют к среде по 6 кг кукурузного крахмала, охиженного собственно известным образом с пивоваренным ферментом до концентрированного раствора (около 30%-ного).

После 120-часовой ферментации получена культуральная жидкость в количестве 550 л, которая содержала ноурзеотрицин в концентрации 6,53 г на литр.

Пример No.3

Для выращивания посевного материала лиофилизированный на глюкозожелатине высушенный консервный мицелий (вес брутто содержимого консервного материала - около 300 мг) штамма *Streptomyces noursei* ZIMET 43 708 суспендируют с 3 мл физиологического раствора поваренной соли. 0,5 мл этой суспензии служит в качестве инокулюма для засева 400 мл питательной среды первого пассажа. Питательная среда этого пассажа содержит на один литр водопроводной воды следующие питательные компоненты: глюкозы - 40 г, соевого шрота - 15 г, гидрофосфата калия - 0,3 г, хлорида натрия - 5 г, карбоната кальция - 3 г.

Кислотность среды устанавливают перед стерилизацией на pH 6,5. По 400 мл этой среды заливают в закрываемые ватной пробкой широкогорлые колбы емкостью 2,5 л. Стерилизацию проводят в автоклаве при 120 °C в течение 35 минут. Засеянные культуры инкубируют на круговых качалках при 29 °C в течение 48 часов. 800 мл получаемой таким образом культуральной жидкости первого пассажа используют на второй пассаж для засева 180 л паром стерилизованной среды (45 минут при 120 °C) такого же состава, как в первом пассаже, содержащейся в ферментаторе из высококачественной стали (общий объем 250 л). Культивирование осуществляют в течение 40 часов (pH 5,1 - 5,3) при 28 °C, числе оборотов 240 об/мин и скорости аэрации 1,0 об/об/мин. Для основной культуры используют ферментатор из высококачественной стали (общий объем 4200 л), наполненный 2500 л питательной среды следующего состава из расчета на 1 литр водопроводной воды: кукурузного крахмала - 62,5 г, глюкозы - 2,5 г, соевого шрота - 12 г, сульфата аммония - 11 г, сульфата магния - 2 г, хлорида натрия - 1 г, карбоната кальция - 6 г, сульфата цинка 0,5 г, полипропиленгликоля - 0,5 г. Кислотность среды устанавливают перед стерилизацией на pH 6,2. Стерилизацию питательной среды (без глюкозного компонента) проводят *in situ* путем предварительного нагрева паром рубашки до 75 °C и последующего нагрева острым паром до 120 °C в течение 15 минут. После охлаждения до 29 °C прибавляют в асептических условиях глюкозу, раздельно стерилизованную в виде 40%-ного водного раствора нагревом до 120 °C в течение 30 минут. Перед посевом исходную кислотность питательной среды устанавливают серной кислотой на pH 6,8 ± 0,1.

Засеянную 4% инокуляма второго пассажа ферментационную среду основной культуры культивируют в течение 140 часов при 20 °С, скорости аэрации 0,5 об/об/мин (0-й - 20-й часы) или 1,0 об/об/мин (20-й - 140-й часы) при избыточном давлении 0,03 МПа при перемешивании с числом оборотов 180 об/мин. Кислотность культуральной жидкости поддерживают постоянной 25%-ным раствором гидроксида аммония на уровне $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$ после физиологически обусловленного медленного снижения исходного значения pH .

В результате биологического теста в культуральной жидкости определены следующие количества продукта:

Час ферментации (ч)	Ноурзеотрицин (г. л ⁻¹)
68-й	3,9
92-й	5,2
116-й	7,5
140-й	9,7

Пример No.4

Предварительное культивирование производят, как описано в примере No.3, и здесь используют штамм ZIMET 43 708. Для основной культуры используют ферментатор из высококачественной стали (общий объем 720 л), который наполнен 500 л питательной среды следующего состава из расчета на 1 литр водопроводной воды: кукурузного крахмала - 62,5 г, глюкозы - 2,5 г, соевого шрота - 12 г, сульфата аммония - 11 г, сульфата магния - 2 г, хлорида натрия - 1 г, карбоната кальция - 6 г, сульфата железа (III) - 0,1 г, полипропиленгликоля - 0,5 г. Кислотность раствора устанавливают перед стерилизацией на $\text{pH } 6,2$. Стерилизацию питательной среды (без глюкозного компонента) проводят *in situ* предварительным нагревом паром рубашки до 75 °С и последующим нагревом острым паром до 120 °С в течение 15 минут. После охлаждения до 29 °С прибавляют в асептических условиях глюкозу, отдельно стерилизованную в форме 50%-ного водного раствора нагревом до 120 °С в течение 30 минут. Перед засевом при помощи серной кислоты производят установку начальной кислотности питательной среды на $\text{pH } 6,8 \pm 0,1$.

Засеянную 4% инокуляма второго пассажа ферментационную среду основной культуры культивируют в течение 116 часов при 29 °С, скорости аэрации 0,5 об/об/мин (0-й - 20-й часы) или 1,0 об/об/мин (20-й - 116-й часы) при избыточном давлении 0,03 МПа и перемешивании с числом оборотов 320 об/мин. Кислотность культуральной жидкости поддерживают постоянной 25%-ным раствором гидроксида аммония на уровне $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$ после физиологически обусловленного медленного снижения начального значения pH .

В результате биологического теста в культуральной жидкости определены следующие концентрации продукта:

Час ферментации (ч)	Ноурзеотрицин (г . л ⁻¹)
44-й	2,2
68-й	4,0
92-й	5,2
116-й	6,5

Пример No.5

Предварительное культивирование производят, как описано в примере 3; и здесь используют штамм 43 708.

Для основной культуры используют ферментатор из высококачественной стали (общий объем 450 л),

который наполнен 300 л питательной жидкости следующего состава из расчета на 1 литр водопроводной воды: кукурузного крахмала - 120 г, глюкозы - 5 г, соевого шрота - 24 г, сульфата аммония - 11 г, сульфата магния - 2 г, хлорида натрия - 1 г, карбоната кальция - 5 г, сульфата цинка - 0,5 г, полипропиленгликоля - 0,5 г.

Для охижения большой доли полимерного источника углеводов используют собственно известным образом пивоваренный фермент. После энзиматического гидролиза крахмала вливают остаточные компоненты питательной среды. Стерилизацию питательной среды осуществляют нагревом до 120 °C в течение 15 минут. После охлаждения до рабочей температуры перед засевом устанавливают кислотность питательной среды серной кислотой на pH $6,8 \pm 0,1$. Засевную 4% инокулюма второго пассажа культивирования ферментационную культуру культивируют в течение 124 часов при 29 °C, скорости аэрации 0,5 об/об/мин (0-й - 20-й часы) или 1,0 об/об/мин (20-й - 124-й часы) при избыточном давлении 0,03 МПа перемешивании с числом оборотов 400 об/мин.

К 16-му часу ферментации прибавляют $12 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ фосфатного фосфора (как дигидрофосфат калия) в форме стерилизованного водного раствора. Кислотность культуральной жидкости поддерживают постоянной на уровне pH $6,0 \pm 0,2$ при помощи 25%-ного раствора гидроксида аммония после физиологически обусловленного медленного снижения начального значения pH.

В результате биологического теста в культуральной жидкости определены следующие концентрации продукта:

Час ферментации (ч)	Ноурзеотрицин (г · л ⁻¹)
44-й	2,6
68-й	6,3
92-й	9,4
116-й	12,4
124-й	15,1

Пример No.6

Предварительное культивирование проводят, как описано в примере No.3; используют штамм 43 708.

Питательная среда и ее приготовление тоже идентичны тому, что представлено в примере No.3. Используют два ферментатора из высококачественной стали (общий объем 720 л), каждый из которых наполнен 500 л питательной среды.

Количество инокулюма и режим процесса тоже соответствуют условиям, представленным в примере No.3. В ферментационную среду на 12-м часу ферментации добавляют $10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ фосфатного фосфора (как дигидрофосфат калия) в форме стерилизованного водного раствора. Другая ферментационная среда добавок не содержит.

В результате биологического теста в культуральных жидкостях определены концентрации ноурзеотрицина, увеличивающиеся с различной скоростью.

Час ферментации (ч)	Ноурзеотрицин (г · л ⁻¹)	
	без добавки фосфатного фос- фора	с добавкой фосфатного фос- фора
68-й	3,8	4,1
92-й	4,9	5,6
116-й	6,1	7,4
140-й	7,1	7,5

Пример No.7

Предварительное культивирование проводят, как описано в примере No 3; используют штамм ZIMET 43 708.

Для основной культуры используют ферментатор из высококачественной стали (общий объем 720 л), который наполнен 500 л питательной среды следующего состава из расчета на 1 литр водопроводной воды: кукурузного крахмала – 62,5 г, глюкозы – 2,5 г, соевого шрота – 16 г, сульфата аммония – 11 г, сульфата магния – 2 г, хлорида натрия – 1 г, карбоната кальция – 6 г, сульфата-гидрата алюминия – 0,13 г, полипропиленгликоля – 0,5 г. Кислотность раствора устанавливают перед стерилизацией на pH 6,2. Стерилизацию осуществляют нагревом до 120 °C в течение 15 минут. После охлаждения до 29 °C перед засевом устанавливают начальную кислотность питательной среды серной кислотой на pH $6,8 \pm 0,1$. Основную ферментационную среду, засеянную 4% инокулюма второго пассажа культивирования, культивируют в течение 116 часов при температуре до 29 °C, скорости аэрации 0,5 об/об/мин (0-й – 20-й часы) или 1,0 об/об/мин (20-й – 116-й часы) при избыточном давлении 0,03 МПа и перемешивании с числом оборотов 320 об/мин. Кислотность культуральной жидкости поддерживают постоянной 25%-ным раствором гидроксида аммония на уровне pH $6,0 \pm 0,3$ после физиологически обусловленного медленного снижения начального значения pH.

В результате биологического теста в культуральной жидкости определены следующие концентрации продукта:

Час ферментации (ч)	Ноурзеотрицин (г . л ⁻¹)
44-й	2,5
68-й	4,9
92-й	7,2
116-й	9,3

А Н Н О Т А Ц И Я

Описывается ферментативный способ получения ноурзеотрицина, при помощи которого с использованием маломолекул, содержащих димер-, олигомер- или полимерсодержащие источники углеродов питательных сред и соответствующих штаммов в течение примерно 140-часовой ферментации при регулируемой кислотности накапливаются высокие концентрации ноурзеотрицина.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ферментативного получения ноузеотрицина штаммами *Streptomyces noursei* в жидких аэробных условиях культивирования в среде с источниками углерода и азота, а также минеральными солями при температуре 28-32 °С и поддержании постоянства кислотности культуральной жидкости на установленной предельной величине в пределах pH 5,0-8,0, отличающийся тем, что используют продуктивные мутанты или селектанты штамма *Streptomyces noursei* с амилалитической активностью, а культивирование проводят в течение 72 - 196 часов с использованием малогексозных, в частности малоглюкозных, ди- и/или полимерсодержащих источников углеводов.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование может осуществляться также в условиях присутствия ингибиторов дыхательной цепи или внутриклеточного переноса аминокислот.
3. Способ по п. 1 и 2, отличающийся тем, что из штаммов *Streptomyces noursei* с амилалитической активностью используют штаммы ZIMET 437 00, ZIMET 43 701 или ZIMET 43 708.
4. Способ по п.п. 1 до 3, отличающийся тем, что в качестве малогексозного полимерсодержащего источника углеводов используют крахмал, предпочтительно кукурузный крахмал.
5. Способ по п.п. 1 до 4, отличающийся тем, что крахмал после собственно известным образом проведенной обработки для повышения текучести его водных суспензий добавляют в культуральную жидкость в полном объеме в начале ферментации и/или порциями или непрерывно в процессе ферментации.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob fermentativní výroby nourseotricinu kmeny *Streptomyces noursei* v submerzních aerobních podmínkách kultivace v prostředí se zdroji uhlíku a dusíku a minerálními solemi, při teplotě 28 až 32 °C, při udržování kyselosti kultivační kapaliny na určené hranici v mezích p_H 5,0 až 8,0, vyznačující se tím, že se použijí mutanty producenty nebo selektanty-producenty mikroorganismů kmene *Streptomyces noursei* s amylolytickou aktivitou a kultivování se provádí po dobu 72 až 196 hodin, s použitím hexozami chudých, zejména glukosou chudých dimerů a/nebo oligomerů a/nebo polymerů obsahujících zdroje sacharidů.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kultivace provádí za přítomnosti inhibitorů dýchacího řetězce nebo mikrobuněčného přenosu aminokyselin.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako kmenů *Streptomyces noursei* se použijí kmeny ZIMET 43 700, ZIMET 43 701 nebo ZIMET 43 708.

4. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že jako glukosou chudý polymer obsahující zdroj sacharidů se použije škrob, výhodně kukuřičný škrob.

5. Způsob podle bodů 1, 2 a 3, vyznačující se tím, že po zpracování známým způsobem se pro zvýšení tekutosti vodné suspenze přidává škrob do kultivačního prostředí v celkovém množství na začátku fermentace a/nebo po částech, nebo nepřetržitě v době fermentace.