



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

240342

(11)

(B1)

[51] Int. Cl.⁴
C 12 P 19/44

(22) Prihlásené 29 09 84

(21) [FV 7389-84]

(40) Zverejnené 13 06 85

(45) Vydané 15 06 87

(75)
Autor vynálezu

BUČKO MICHAL ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA; HENZL ŠTĚPÁN ing.,
KOUŘIM; HOFBAUER HENRICH ing.; BULLA JÁN ing.; HANO ALEXANDER,
BANSKÁ BYSTRICA; KŘIŠŤAN VLADIMÍR ing., KOUŘIM; MIKLÁŠ EMIL
ing.; REVALLOVÁ VIERA ing.; SOMORA DUŠAN ing., BANSKÁ
BYSTRICA; SOUHRADA JOSEF RNDr., PRAHA; ŠEVČÍK BOHUMIL prof.
MVDr. DrSc., JÍLOVÉ u Prahy

(54) Spôsob fermentačnej výroby tylozínu

1

2

Riešenie sa týka nového spôsobu riadenia fermentačnej výroby tylozínu podľa reologických charakteristík fermentačnej pôdy pri aeróbnej kultivácii vysokoprodukčného mikroorganismu *Streptomyces fradiae*, za intenzívneho miešania v živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného dusíka, uhlíka a fosforu a za kontinuálneho alebo semikontinuálneho dávkovania živín a zriedovacieho roztoku. V produkčnej fáze sa kontinuálne alebo semikontinuálne pridávajú NH_4^+ a NO_3^- ióny v takom množstve, aby sa udržala koncentrácia amoniakálneho dusíka v rozmedzí 0,02—0,3 % a za účelom udržania optimálnej viskozity sa pridáva kontinuálne alebo semikontinuálne sterilná voda a v priebehu celej kultivácie sa udržuje pH v rozmedzí 6,7—7,1.

Vynález sa týka spôsobu riadenia výroby tylozínu podľa reologických charakteristík fermentačnej pôdy pri aeróbnej kultivácii vysokoprodukčného mikroorganizmu *Streptomyces fradiae*, za intenzívneho miešania v živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného dusíka, uhlíka a fosforu, minerálnych či živných solí, za kontinuálneho alebo semikontinuálneho dávkovania živín a zriedovacieho roztoku v produkčnej fáze fermentácie.

Zvýšenie priemyselnej výroby tylozínu je možné dosiahnuť zvýšením výrobných kapacít, alebo zvyšovaním produkcie pri jeho biosyntéze. Druhý spôsob nevyžaduje na rozdiel od prvého veľké investičné náklady. Je založený na lepšej produkčnej schopnosti kmeňa používaného pre biosyntézu, alebo na lepších fermentačných podmienkach, ktoré sa zabezpečujú dokonalejším riadením fermentácie. Z týchto dôvodov sa pomocou mutagénov získavajú nové mutanty mikroorganizmu *Streptomyces fradiae* a vypracovávajú sa nové spôsoby biosyntézy tylozínu. K základným podmienkam pre vysokoprodukčnú fermentáciu patria — množstvo a vzájomný pomer živín vo fermentačnej pôde, udržiavanie niektorých fyzikálnych, chemických a biochemických veličín na optimálnej úrovni, vzdušenie a miešanie fermentačného média a pod. V praxi sa často stáva, že z technických alebo iných dôvodov nie je možné zmeniť niektoré podmienky pre optimálny priebeh biosyntézy. Takým nemenným faktorom môže byť napríklad intenzita miešania fermentačnej pôdy.

V poslednom období v dôsledku energetickej krízy je snaha predlžovať dobu kultivácie, aby sa znížil počet nasadzovaných fermentácií, čím sa ušetrí na energiách a surovinách pri biosyntéze a pri chemickej izolácii do finálneho produktu. Z tohto dôvodu pri vývoji dlhodobej fermentácie sledujúcej zvyšovanie výťažnosti smeroval vývoj ku stále vyššej koncentrácii hlavných zložiek pôdy. Zvyšovanie koncentrácie živín je však limitované tým, že nadmerný nárast biomasy spôsobuje porušenie optima látkovej výmeny. V takom prípade dochádza v dôsledku nedostatočného miešania k limitácii kyslíkom. Limitujúcim faktorom môže byť v niektorých prípadoch aj nepriaznivý vplyv zvýšeného osmotického tlaku.

Zvyšovaním koncentrácie živín môže dôjsť k prekročeniu hraničnej koncentrácie škodlivých faktorov u jednej alebo viacerých zložiek živného prostredia. Táto skutočnosť bola dokázaná aj u biosyntézy tylozínu, a to inhibíciou produkcie antibiotika —NH_4^+ iónmi pri rýchlej spotrebe dusíkatých zdrojov (S. Omura: Control of ammonium ion level in antibiotic fermentation, Fifth International Symposium on Actinomycetes Biology, Oaxtepec, Morelos, Mexico, August 16—19, 1982, Abstracts pp. 71 až 72).

Ak na začiatku kultivácie bola zvýšená koncentrácia —NH_4^+ iónov, dochádzalo pri

fermentácii tylozínu kmeňom *Streptomyces fradiae* k nadmernému rastu biomasy v produkčnej fáze a tým k limitácii kyslíkom. Zároveň sa znížila produkcia tylozínu v živnom médiu.

Zistili sme, že nadmernému nárastu biomasy, a tým vysokej viskozite možno zabrániť tak, že po ukončení rastovej fázy sa do živného prostredia kontinuálne alebo semikontinuálne dávkuje sterilná voda. Tým sa udržiava viskozita, pri ktorej nedochádza k limitácii kyslíkom. Zároveň sa vytvárajú podmienky pre kontinuálne alebo semikontinuálne pridávanie —NH_4^+ iónov a —NO_3^- iónov v produkčnej fáze fermentácie. Dávkovaním —NH_4^+ a —NO_3^- iónov, ktoré sa využívajú pri metabolizme a kontinuálnym alebo semikontinuálnym udržiavaním pH v rozmedzí hodnôt 6,8—7,1 sa udržiava dobrý fyziologický stav kultúry.

Udržiavanie optimálnej viskozity a optimálneho pH a dávkovanie —NH_4^+ a —NO_3^- iónov v produkčnej časti fermentácie vedie nielen k vysokej výťažnosti tylozínu, ale aj k potlačeniu tvorby desmykozínu a ďalších rozkladných produktov tylozínu.

Príklad 1

Fermentácia v laboratórnych fermentačných tankoch.

Vegetatívne inokulum bolo pripravené submerzne v 500 ml varných bankách plnených 60 ml inokulačnej pôdy (kukuričný extrakt, kvasničný extrakt, sójová múka, sójový olej a CaCO_3). Živná pôda po vysterilizovaní bola naočkovaná kľučkou spór zo šikmého agaru a inkubovaná na rotačnom trepacom stroji 48 hodín. Takto pripraveným vegetatívnym inokulom bol naočkovaný laboratórny fermentor s vysterilizovanou živnou pôdou rovnakého zloženia, ako bola použitá v 500 ml varných baničkách. Laboratórny fermentor o celkovom objeme 20 l bol plnený 10 l živnej pôdy. Kultivácia prebiehala pri teplote 29 °C, za vzdušenia 6 l sterilného vzduchu/min. Nárast vegetatívneho inokula v laboratórnom fermentore trval 28 hodín.

Pripraveným inokulom bolo naočkované 10 l produkčnej pôdy v laboratórnom fermentore o celkovom obsahu 20 l. Produkčná pôda obsahovala repnú melasu, sójový olej, rybiu múku, kukuričnú múku, kukuričný glutén, anorganické soli a CaCO_3 . Fermentácia prebiehala 9 dní za dodržania kultivačnej teploty 28 °C a s prídavkom vzduchu do 40. hodiny kultivácie 6 l/min. a od 40. hodiny kultivácie 8 l/min.

Za 9 dní sa dosiahla produkcia 5 500 mcg na mililiter.

Príklad 2

Fermentácia v laboratórnych fermentačných tankoch s reguláciou podmienok fermentácie

Vegetatívne inokulum bolo pripravené submerzne v 500 ml varných baničkách plnených 60 ml inokulačnej pôdy (kukuričný extrakt, kvasničný extrakt, sójová múka, sójový olej a CaCO_3). Živná pôda po vysterilizovaní bola naočkovaná kľučkou spór zo šikmého agaru a inkubovaná na rotačnom trepacom stroji 48 hodín. Takto pripraveným vegetatívnym inokulom bol naočkovaný laboratórny fermentor s vysterilizovanou živnou pôdou rovnakého zloženia, ako bola použitá v 500 ml varných baničkách. Laboratórny fermentor o celkovom objeme 20 l bol plnený 10 l živnej pôdy. Kultivácia prebiehala pri teplote 29°C , za vzdušenia 6 l za minútu. Nárast vegetatívneho inokula trval 28 hodín.

Pripraveným inokulom boli naočkované laboratórne fermentory o objeme 20 l plne-

né 10 l živnej pôdy. Živná pôda obsahovala repnú melasu, sójový olej, rybiu múku, kukuričnú múku, kukuričný glutén, anorganické soli a CaCO_3 . Fermentácia prebiehala 9 dní pri kultivačnej teplote 28°C a s prídavkom sterilného vzduchu od 0. do 40. hodiny kultivácie 6 l/min a od 40. h. k. do konca fermentácie 8 l/min.

Od 50. hodiny až do konca kultivácie sa pridávala semikontinuálne sterilná voda a to v množstve 0,1 % za hodinu a od 80. hodiny kultivácie do konca kultivácie sa pridával 25 % roztok NH_4NO_3 a to v množstve 0,01 % za hodinu. V priebehu kultivácie sa udržiavalo pH v rozmedzí 6,8—6,9.

Vo fermentácii prebiehajúcej za uvedených podmienok 9 dní sa dosiahla produkcia 7 500 mcg/ml.

PREDMET VYNALEZU

Spôsob fermentačnej výroby tylozínu pri aeróbnej kultivácii vysokoprodukčných mutantov mikroorganizmu *Streptomyces fradiae* za intenzívneho miešania, v živnej pôde obsahujúcej zdroje asimilovateľného uhlíka, dusíka a fosforu a minerálne živné soli, vyznačujúci sa tým, že v priebehu kultivácie sa kontinuálne alebo semikontinuálne udržiava pH v rozmedzí 6,7—7,1, s výho-

dou 6,8—7,0, v produkčnej fáze sa kontinuálne alebo semikontinuálne pridávajú $-\text{NH}_4^+$ a $-\text{NO}_3^-$ ióny v takom množstve, aby sa udržala koncentrácia amoniakálneho dusíka v rozmedzí 0,02—0,30 % s výhodou 0,03—0,20 % a za účelom udržania optimálnej viskozity sa pridáva kontinuálne alebo semikontinuálne sterilná voda a to od ukončenia rastovej fázy.