



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **254 959 A1**4(51) **C 12 P 1/06**
C 12 P 19/28**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 263 102 2

(22) 17.05.84

(44) 16.03.88

(71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Peißker, Michael, Dipl.-Biol.; Guthke, Reinhard, Dr. rer. nat.; Gira, Georg, Dr.-Ing.; Knorre, Wolfgang A., Doz. Dr. sc., DD

(54) **Verfahren zur zyklischen Fermentation von Streptothricinen, insbesondere Nourseothricin**

(57) Die Erfindung „Verfahren zur zyklischen Fermentation von Streptothricinen, insbesondere Nourseothricin“ ist anwendbar in der mikrobiologischen und pharmazeutischen Industrie für die Produktion von Nourseothricin, das von dem Mikroorganismus *Streptomyces noursei* gebildet wird. Ziel der Erfindung ist die Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute der Nourseothricin-Fermentation. Die durch die Erfindung zu lösende Aufgabe besteht darin, technologisch bedingte unproduktive Zeitabschnitte zu reduzieren. Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, in dem nach einer bekannten Startphase gemäß einem Zeitplan bei abfallender Produktivität oder nach Störungen im Prozeßregime die Fermentation nicht abgebrochen, sondern zyklisch fortgesetzt wird. Ein Zyklus enthält drei aufeinander folgende Arbeitsschritte: teilweise Ernte, Wiederauffüllen mit Substitutionsmedium und Fortsetzung der Kultivierung.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur zyklischen Fermentation von Streptothricinen, insbesondere Nourseothricin, wobei ein Hauptkulturmedium angesetzt wird, aus einer Vorkultur beimpft wird, während der anschließenden Fermentation Zugaben von Nährmedien erfolgen oder unterbleiben, **gekennzeichnet dadurch**, daß sich Zyklen anschließen, die aus drei Arbeitsschritten:
 - teilweise Ernte (3),
 - Wiederauffüllen (4),
 - Fortsetzen der Kultivierung
 bestehen, die Zyklusdauer 8 bis 144 Stunden beträgt, die Menge der teilweisen Ernte 5 bis 90 % des Füllvolumens beträgt, das Wiederauffüllen sofort nach der teilweisen Ernte oder nach einem vorgegebenen Zeitplan bis 90 % des Bruttovolumens beträgt und das Substitutionsmedium mindestens eine komplexe organische Stickstoff-, Phosphat- und Kohlenstoffquelle enthält.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Menge der teilweisen Ernte 20 bis 50 % des Füllvolumens beträgt, daß das Wiederauffüllen im Umfang der teilweisen Ernte erfolgt und daß die Zyklusdauer 24 bis 48 Stunden beträgt.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Substitutionsmedium das mit Sojamehl angereicherte, in bezug auf anorganische Salze reduzierte und Stärke enthaltende Hauptkulturmedium verwendet wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß nach Störungen im Prozeßregime ein neuer Zyklus begonnen wird.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur zyklischen Fermentation von Nourseothricin und ist anwendbar in der mikrobiologischen und pharmazeutischen Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekannt sind eine Reihe von Verfahren, allgemein als diskontinuierliche Kultivierung (batch-Kultivierung) bzw. zugefütterte Kultivierung (fed-batch-Kultivierung) bezeichnet, durch deren Anwendung der Mikroorganismus *Streptomyces noursei* (Bradler, G., Thrum, H. [1963], Z. f. Allg. Mikrobiologie 3, 105–112) zur Produktion des Antibiotikums Nourseothricin eingesetzt wird. Dabei muß grundsätzlich unterschieden werden zwischen Verfahren, bei denen die Gesamtmenge des Nährmediums zu Fermentationsbeginn in das Kulturmedium eingebracht wird DD-WP 223321, allgemein als batch-Kultivierung bezeichnet, und solchen, bei denen Nährmediumskomponenten während des Fermentationsprozesses zugegeben werden DD-WP 247370/7, allgemein als fed-batch-Kultivierung bezeichnet.

Nachteil dieser Verfahren ist, daß die Produktivität nach einer bestimmten Zeit, erfahrungsgemäß nach etwa 100 bis 200 Stunden, absinkt. Deshalb müssen die entsprechend diesen Verfahren durchgeführten Nourseothricin-Fermentationen nach dieser Zeitdauer abgebrochen werden. Der Neustart einer Fermentation, verbunden mit der Sterilisation des Fermentors und des Nährmediums, der Hydrolyse des Nährmediums, der Vorkultur des Impfmateri als sowie nach erfolgter Beimpfung mit einer Wachstumsphase, in der kein oder nur wenig Produkt gebildet wird, bedeutet einen festen Aufwand an Zeit und Material, der nicht unmittelbar in einen Zuwachs von Produkt eingeht.

Weiterhin sind Verfahren bekannt, bei denen am Ende einer bestimmten Fermentationszeit nur eine bestimmte Menge des Kulturmediums, vorrangig 15 bis 40 %, abgelassen und der Aufarbeitung zugeführt wird und wieder durch frisches Nährmedium ersetzt wird. Solche Verfahren werden im Unterschied zu diskontinuierlichen Verfahren als semikontinuierliche oder zyklische fed-batch- oder repeated-fed-batch-Kultivierung bezeichnet. Obwohl solche Verfahren bereits seit langem bekannt sind, zum Beispiel für Butanol und Aceton GB 176284 (1921), ist es schwierig, ein solches Verfahren für Sekundärmetabolitproduktionen zu entwickeln. Bisher ist es gelungen, für die Antibiotika Penicillin, Cephalosporin, Erythromycin und Oxytetracyclin, die zu den Gruppen der β -Lactam-, Makrolid- bzw. Tetracyclin-Antibiotika gehören, solche Verfahren zu erfinden US 2442141, US 2584009, US 2609327, jedoch tritt bei diesen Antibiotika-Fermentationen am Beginn eines jeden Zyklus eine ausgeprägte Verzögerung der Produktbildung auf (Humphrey, A. E. [1980], Advances in Biotechnology Vol. I, 203–210), (Bošnjak, M., Topolovec, V., Johanides, V. [1980], Contin. Cultiv. Microorg., Proc. 7th Symp. Prague, July 10–14. 1978; 723–727). Das bedingt eine Verringerung der Gesamtproduktivität dieser Verfahren. Semikontinuierliche zyklische Antibiotikafermentationen, die diesen Nachteil nicht aufweisen, sind bisher nicht bekannt geworden.

Weiterhin wurde für Produkte aus der Gruppe der Streptothricine, zu denen das Nourseothricin gehört, bisher kein Verfahren zur zyklischen fed-batch-Kultivierung gefunden, das eine höhere Produktivität gegenüber der fed-batch-Kultivierung ermöglicht.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung beinhaltet das Ziel, mit hoher Raum-Zeit-Ausbeute Streptothricine, insbesondere Nourseothricine, herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dem die Ausbeute pro Zeiteinheit der Fermentation von Streptothricinen erhöht werden kann.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, bei dem durch wiederholtes teilweises Ernten der Hauptkultur und Wiederauffüllen mit frischem Nährmedium technologisch bedingte unproduktive Zeitabschnitte reduziert werden.

Das Verfahren zur zyklischen Fermentation von Streptothricinen, insbesondere von Nourseothricin, wird folgendermaßen durchgeführt. In einem oder mehreren Fermentoren wird ein Hauptkulturmedium angesetzt und aus einer Vorkultur beimpft, wobei während der anschließenden Fermentation Zugaben von Nährmedien erfolgen oder unterbleiben. Dieser Startphase schließen sich erfindungsgemäß Zyklen an, die aus den drei Arbeitsschritten:

- teilweise Ernte,
- Wiederauffüllen,
- Fortsetzen der Kultivierung

bestehen. Unter teilweiser Ernte wird ein Ablassen von Kulturmedium von 5 bis 90% des Nettovolumens (Füllvolumen) verstanden, vorrangig von 20 bis 50%. Das Wiederauffüllen — darunter wird das vollständige oder teilweise Ersetzen der bei der teilweisen Ernte abgelassenen Menge verstanden — erfolgt sofort nach der teilweisen Ernte oder nach einem vorgegebenen Zeitplan mit Substitutionsmedium bis 90% des Bruttovolumens, vorrangig gleich der Menge der teilweisen Ernte. Das Fortsetzen der Kultivierung nach dem Wiederauffüllen erfolgt ohne oder mit Zugaben von Nährmedien. Die Zyklusdauer zwischen zwei teilweisen Ernten beträgt 8 bis 144 Stunden, vorrangig 24 bis 48 Stunden.

Das Substitutionsmedium enthält mindestens eine komplexe organische Stickstoff-, Phosphat- und Kohlenstoffquelle. Es wird vorrangig das mit Sojamehl angereicherte, in bezug auf anorganische Salze reduzierte und Stärke enthaltende Hauptkulturmedium verwendet.

Im weiteren Ausbau des Verfahrens wird nach Störungen im Prozeßregime, die die Fermentation in einen Zustand geringerer Produktivität gesetzt haben, ein Zyklus begonnen, der das Verfahren in den hochproduktiven Zustand zurückführt.

Ausführungsbeispiele

An zwei Ausführungsbeispielen soll die Erfindung näher erläutert werden. Es zeigen die

Fig. 1: den zeitlichen Ablauf der Verfahrensschritte zur zyklischen Fermentation von Nourseothricin (NTC) und

Fig. 2: den zeitlichen Ablauf des Verfahrens zur zyklischen Fermentation von Nourseothricin (NTC) mit Störung im Sauerstoffeintrag von der 88. bis 93. Stunde.

In den Fig. 1 und 2 bedeuten

- 1 Beimpfen
- 2 Zugabe von Sojamehl
- 3 teilweise Ernte
- 4 Wiederauffüllen
- 5 Zugabe von Glucose/Ammoniumsulfatlösung.

1. Eine lyophilisierte, an Glucose-Gelatine getrocknete Mycelkonserve des Stammes *Streptomyces noursei* JA 3890 b/BF 32-14 (hinterlegt in der Stammsammlung der ZIMET, Jena) wird mit 4 ml sterilem aqua dest. aufgeschwemmt und davon wird 0,5 ml zur Beimpfung einer Vorkultur verwendet. Die Vorkultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 28,5 bis 29°C in 2,5l-Steilbrustflaschen bei einem Füllvolumen von 400 ml mit einem folgenden Vorkulturmedium:

Komponente	Konzentration (g/l)	Standard
Glucose	15	2. AB der DDR
Sojamehl	15	TGL 80-22 791
NaCl	5	techn.
CaCO ₃	1	TGL 2789
KH ₂ PO ₄	0,3	TGL 20 870/15

Das Vorkulturmedium wird im Autoklaven bei 120°C 35 Minuten lang sterilisiert, nachdem mit Hilfe von NaOH bzw. HCl ein pH-Wert von 6,2 bis 6,5 eingestellt wurde.

250 ml der Vorkultur mit einer Biomassekonzentration von 1 g/l dienen als Impfmateriel für die Hauptkultur. Für die Hauptkultur kommt der Laborfermentor LF 2 (VEB Mytron, DDR) mit einem Bruttovolumen von 3 l und einem Füllvolumen von 2,8 l zum Einsatz. Für die Hauptkultur wird folgendes Hauptkulturmedium verwendet:

Komponente	Konzentration (g/l)	Standard
Kartoffelstärke	32	TGL 3069
Glucose	60	2. AB der DDR
Sojamehl	20	TGL 80-22791
(NH ₄) ₂ SO ₄	15	TGL 20 823
MgSO ₄	2	TGL 6442
NaCl	1	techn.
CaCO ₃	6	TGL 2789
ZnSO ₄	0,5	TGL 14567
Antaphron	0,5	Werknorm VEB Jenapharm

Der mit dem Hauptkulturmedium gefüllte Fermentor wird im Autoklaven bei 120°C 45 Minuten lang sterilisiert, wobei jedoch die Glucose separat sterilisiert und erst nach erfolgter Sterilisation dem Hauptkulturmedium zugesetzt wird.

Die Bedingungen für die Hauptkultur sind charakterisiert durch folgende Parameter: Temperatur 29°C ± 0,5°C, Belüftungsrate 4 l/min, Überdruck im Fermentor 0,02 bis 0,03 MPa, Rührerdrehzahl 1200 U/min. Der pH-Wert wird, ausgehend von 7,8 bis 8,0 durch NH₄OH-Zugaben auf pH 5,5 nach unten beschränkt. Der Hauptkultur werden Nährmedien zugeführt, die 600 g/l Glucose, 50 g/l (NH₄)₂SO₄ und 125 g/l Sojamehl enthalten und deren Komponenten 45 Minuten bei 120°C im Autoklaven separat sterilisiert wurden. Außerdem wird zur Hauptkultur ein Substitutionsmedium zugeführt, das sterilisiert wurde wie für das Hauptkulturmedium angegeben und folgende Zusammensetzung hat:

Komponente	Konzentration (g/l)	Standard
Kartoffelstärke	32	TGL 3069
Glucose	60	2. AB der DDR
Sojamehl	40	TGL 80-22791
MgSO ₄	2	TGL 6442
NaCl	1	techn.
ZnSO ₄	0,5	TGL 14567

Im folgenden wird anhand Fig. 1 das Verfahren zur zyklischen Fermentation im zeitlichen Ablauf erläutert. Die Hauptkultur wird zur nullten Stunde mit dem Beimpfen 1 aus der Vorkultur gestartet. Zur 32. und 72. Stunde erfolgt die Zugabe 2 von 25 g Sojamehl als eines der Nährmedien. Zur 120. Stunde, das heißt zum Abschluß der Startphase, und nachfolgend im Abstand von 48 Stunden (Zyklusdauer) erfolgt die teilweise Ernte der Hauptkultur sowie das Wiederauffüllen 3 mit dem Substitutionsmedium in gleicher Menge, die mit 25% des Füllvolumens bemessen wird. Während der Startphase und der Zyklen erfolgen Zugaben 4 von Glucose/Ammoniumsulfatlösung als ein weiteres der Nährmedien in der Weise, daß die Glucose-Konzentration in der Hauptkultur den Wert 10 g/l nicht unterschreitet.

2. Das Hauptkulturmedium wurde mit 250 ml einer Vorkultur beimpft, deren Biomassekonzentration 7 g/l betrug. Die Rührerdrehzahl wurde während der 88. bis 93. Stunde von 1200 U/min auf Null herabgesetzt.

Alle anderen Bedingungen sind wie beim 1. Ausführungsbeispiel beschrieben. In Fig. 2 ist ersichtlich, daß die Produktbildung während dieser Störung des Sauerstoffeintrags und auch darüber hinaus aussetzt. Nach Beginn eines Zyklus zur 120. Stunde setzt die Produktbildung wieder mit hoher Produktivität ein.

Die Erfindung beinhaltet eine Vielzahl von Vorteilen. Überraschenderweise wurde gefunden, daß

- zu Beginn eines jeden Zyklus die Produktbildung ohne erkennbare Verzögerung beginnt,
- die Produktivität während der Zyklen höher als diejenige während der Startphase ist,
- nach Störungen im Prozeßregime (z. B. Störung des Sauerstoffeintrags oder der pH-Regelung), die zum Aussetzen der Produktbildung führen, durch den genannten Start eines neuen Zyklus die Produktbildung wieder mit maximal möglicher Produktivität fortgesetzt werden kann.

Der Zuwachs von Produkt Nourseothricin pro Zeiteinheit liegt, über die gesamte Fermentationsdauer gemittelt, 10 bis 40% über den Werten, die ohne teilweise Substitution der Hauptkultur durch frisches Substitutionsmedium erreicht werden. Mit der Wahl der Prozeßparameter Menge der teilweisen Ernte, wiederaufgefüllte Menge, Zyklusdauer und Zusammensetzung des Substitutionsmediums kann eine für die Aufarbeitung optimale Konzentration des Produkts Nourseothricin in der Hauptkultur am Ende eines jeden Zyklus eingestellt werden. Gegenüber den diskontinuierlichen Verfahren erfolgt bei diesem Hauptkultur zur zyklischen Fermentation eine semikontinuierliche Bereitstellung der aufzuarbeitenden Kulturlösung. Dadurch ist ein technologisch günstiger Anschluß an die Bedingungen der Aufarbeitung gegeben. Dabei kann die Zyklusdauer den betrieblichen Erfordernissen innerhalb der angegebenen Grenzen angeglichen werden.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht im geringen Kontaminationsrisiko, da nach durchlaufener Startphase stets eine hohe Antibiotikumkonzentration während der anschließenden Zyklen aufrechterhalten wird. Das Verfahren zur zyklischen Fermentation von Nourseothricin bietet zusätzliche Möglichkeiten der Prozeßkontrolle, insbesondere Einflußnahme auf die Viskosität der Hauptkultur, die Sauerstoffverbrauchsrate und die Erhaltung des chemischen Milieus durch geeignete Wahl der Prozeßparameter: Zusammensetzung des Substitutionsmediums, Menge der teilweisen Ernte, wiederaufgefüllte Menge und Zyklusdauer.

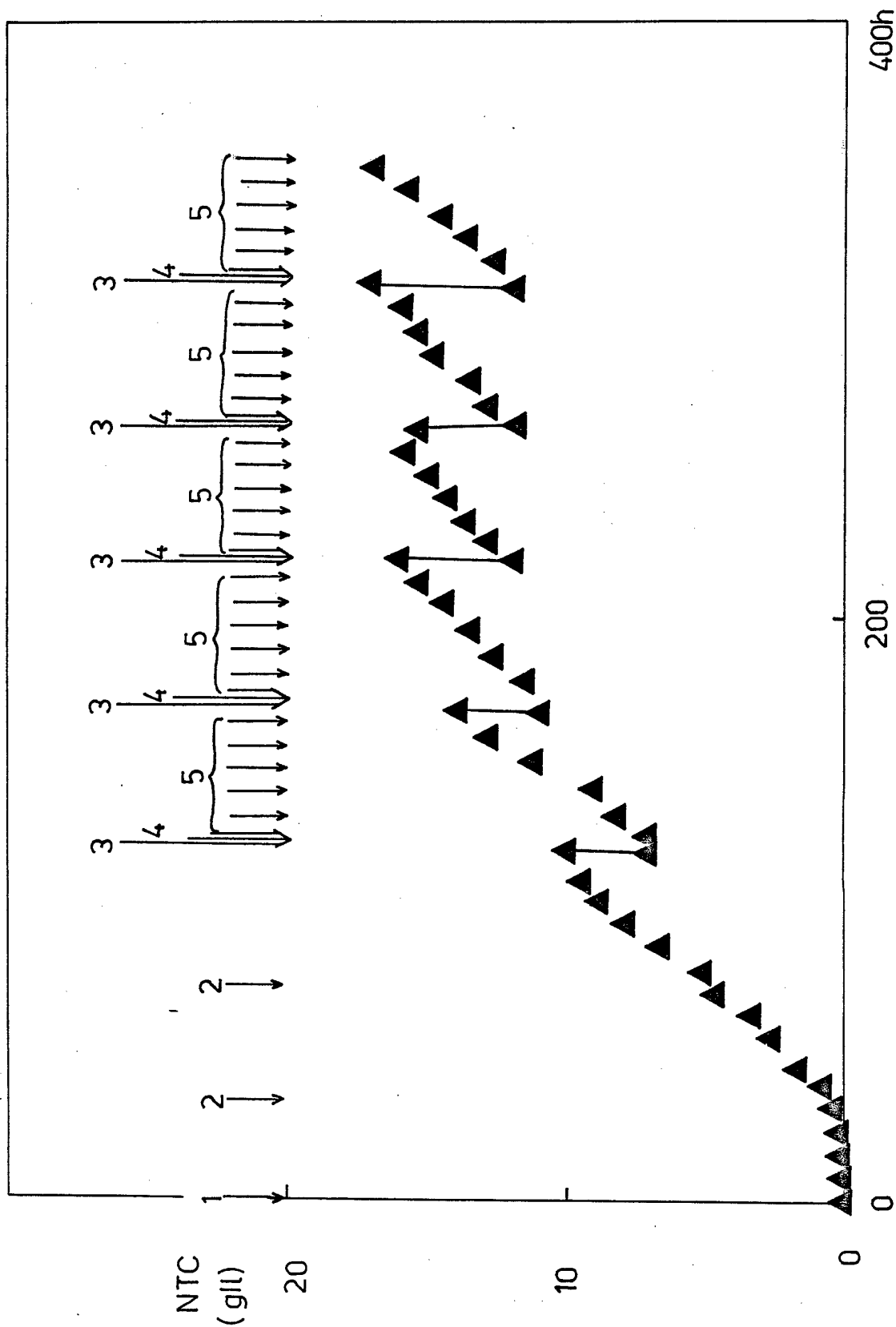


Fig.1

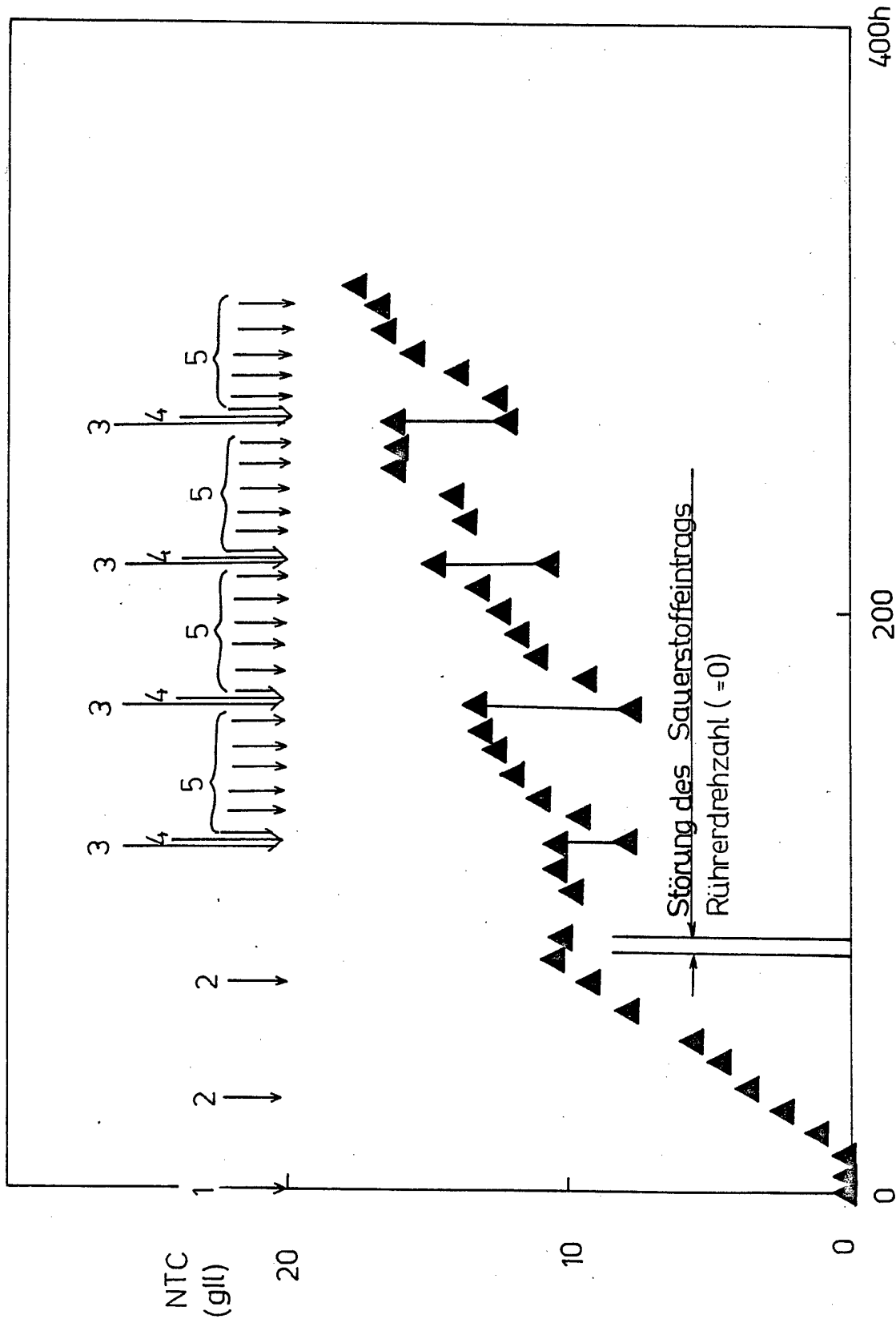


Fig. 2

10121014 * 11291014