



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 332 A1**

4(51) C 12 N 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 282 418 4	(22)	04.11.85	(44)	08.10.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Pohl, Hans-Dieter, Dr.-Ing.; Große, Hans-Helmut, Dr. rer. nat.; Menner, Michael, Dr. rer. nat.; Menzel, Klaus-Dieter, DD

(54)	Sterilisationsverfahren für die Antibiotikumherstellung
------	---

(57) Die Erfindung betrifft eine geführte Hitzesterilisation mit unterschiedlichen Temperatur-Zeit-Profilen gleicher Wirkung für die Einstellung reproduzierbarer Hauptsubstratkonzentrationen als günstige Startbedingung für die Fermentation.

Erfindungsanspruch:

1. Sterilisationsverfahren für die Antibiotikumherstellung, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein Nährboden bestehend aus Stärke, Sojamehl und ausreichend Nährsalzen mit einem Temperatur-Zeitprofil sterilisiert wird, bei dem die thermische Belastung
 - durch Aufheizen ab etwa 100°C mit einer Geschwindigkeit von 2–3K/min und
 - Halten eines Temperaturplateaus von
 - 115°C über 60 min oder
 - 117°C über 38 min oder
 - 119°C über 21 min oder
 - 120°C über 17 min oder
 - 121°C über 14 minunter Einhaltung der Temperaturwerte mit einer Toleranz von $\pm 0,5$ K und einer Toleranz der Zeitwerte von ± 2 min und
 - Abkühlen auf 100°C mit einer minimalen Abkühlgeschwindigkeit von 0,5–0,7 K/min erzielt wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung von Sterilisationen, bevorzugt angewendet in der Sekundärmetabolitproduktion.

Die Erfindung ist für die mikrobielle Industrie bei Verfahren, die eine thermische Sterilisation des Nährmediums erfordern, von Bedeutung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Aus der Literatur (Banks, G. T., Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnologie, 4, 1979) ist bekannt, daß zur quantitativen Beurteilung von Sterilisationstemperaturprofilen ein Sterilisationsfaktor herangezogen werden kann, der ein Maß für die Effektivität der Abtötung lebender Mikroorganismen im Verlauf der Sterilisation darstellt.

Da die thermische Abtötung lebender Mikroorganismen in Konkurrenz zur thermischen Zerstörung essentieller Nährbodenbestandteile stehen kann, kommt es in Abstimmung zu den eingesetzten Substratkonzentrationen (C-, N-, Salze, Spurenelemente, Zuschlagstoffe) zur Gewährleistung reproduzierbarer Startkonzentrationen der essentiellen Bestandteile des Nährbodens für die Fermentation darauf an, den vorgebbaren Sterilisationsfaktor und die daraus ableitbaren Temperatur-Zeit-Profile möglichst genau einzuhalten. Die bekannten Sterilisationsverfahren führen zu hohen Produktionsverlusten, wenn diese Bedingung nicht eingehalten wird.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung beinhaltet das Ziel, durch geführte Hitzesterilisation reproduzierbare Startbedingungen bezüglich der Hauptsubstratkonzentrationen für die nachfolgende Fermentation bei einem vorgegebenem Kontaminationsrisiko zu erhalten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine technisch günstige Lösung zur Realisierung reproduzierbarer Fermentationsstartbedingungen bezüglich der Hauptsubstratkonzentrationen durch Hitzesterilisation unter Berücksichtigung eines vorgegebenen Kontaminationsrisikos und des Fermentormaßstabs anzugeben, um dadurch günstige Startbedingungen für die nachfolgende Fermentation einzustellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die Einstellung der Hauptsubstratkonzentration unter der Voraussetzung gleicher Einsatzstoffe im Ausgangsnährboden durch unterschiedliche Sterilisations-Temperatur-Zeit-Profile mit gleicher Wirkung reproduzierbar gelingt. Zur Kennzeichnung von Sterilisations-Temperatur-Zeit-Profilen gleicher Wirkung dienen in bekannter Weise die Aufheizphase mit dem Parameter Aufheizgeschwindigkeit \dot{T}_H , die Temperaturhaltephase und den Parametern Haltetemperatur T_H und Haltezeit Δt_H , die Abkühlphase mit dem Parameter Abkühlgeschwindigkeit \dot{T}_K . Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Sterilisations-Temperatur-Zeit-Profile gekennzeichnet durch $\dot{T}_H = 2-3$ K/min über

100°C, und $T_H = 115^\circ\text{C}$ und $\Delta t_H = 60\text{ min}$,
 oder $T_H = 117^\circ\text{C}$ und $\Delta t_H = 38\text{ min}$,
 oder $T_H = 119^\circ\text{C}$ und $\Delta t_H = 21\text{ min}$,
 oder $T_H = 120^\circ\text{C}$ und $\Delta t_H = 17\text{ min}$,
 oder $T_H = 121^\circ\text{C}$ und $\Delta t_H = 14\text{ min}$,

bei Einhaltung der Temperaturwerte mit einer Toleranz von $\pm 0,5\text{ K}$ und einer Toleranz der Zeitwerte von $\pm 2\text{ min}$ und Abkühlen auf 100°C mit einer minimalen Abkühlgeschwindigkeit von $0,5\text{--}0,7\text{ K/min}$ als physiologisch gleich zu betrachtenden Haupts substratkonzentrationen (Glukose, Ammoniumstickstoff, säurelöslichem Phosphat-Phosphor) führen. Als Wärmeträger wurde gespannter Dampf verwendet.

Ausführungsbeispiel

Am Ausführungsbeispiel soll die Erfindung näher erläutert werden. Vom nourseothricinbildenden Stamm IMET JA 3890b-20 wurden über zwei Schüttelpassagen und eine Passage im gerührten Impftank die Vorkulturen für die Hauptkulturen gezogen. Die Hauptkultivierungen erfolgten im Edelstahlfermentor (720 Liter Bruttovolumen) mit zentral gelagertem Rührwerk (Schaufelrührer) und Vorrichtung zur Sterilbelüftung. Der Fermentor wurde mit 500 Liter Nährmedium folgender Zusammensetzung gefüllt: 32 g Kartoffelstärke, 29 g Glukose, 11 g entöltes Sojamehl, 11 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g NaCl, 6 g CaCO_3 und 0,5 g ZnSO_4 bezogen auf 1 Liter Leitungswasser. Als Entschäumer wurde je Liter Kulturlösung 0,5 g Entschäumer auf Silikonbasis zugesetzt. Die Glukose wurde separat sterilisiert.

Auf dieser Basis wurden 5 Fermentationen durchgeführt (siehe Diagramm 1), bei denen die Sterilisations-Temperatur-Zeit-Profile mittels gespanntem Dampf als Wärmeträger als in situ-Sterilisation wie folgt realisiert wurden.

1. Fermentation $\dot{T}_H = 2\text{ K/min}$ über 100°C ,
 $T_H = 115^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ K}$ mit $\Delta t_H = 60\text{ min}$
 $\dot{T}_K = 0,5\text{ K/min}$ auf 100°C
2. Fermentation $\dot{T}_H = 2,5\text{ K/min}$ über 100°C ,
 $T_H = 117^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ K}$ mit $\Delta t_H = 38\text{ min}$,
 $\dot{T}_K = 0,7\text{ K/min}$ auf 100°C
3. Fermentation $\dot{T}_H = 3\text{ K/min}$ über 100°C , $T_H = 119^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ K}$ mit $\Delta t_H = 21\text{ min}$,
 $\dot{T}_K = 0,5\text{ K/min}$
4. Fermentation $\dot{T}_H = 2\text{ K/min}$ über 100°C ,
 $T_H = 120^\circ\text{C}$ mit $\Delta t_H = 17\text{ min}$,
 $\dot{T}_K = 0,5\text{ K/min}$
5. Fermentation $\dot{T}_H = 2\text{ K/min}$ über 100°C ,
 $T_H = 121^\circ\text{C}$ mit $\Delta t_H = 14\text{ min}$,
 $\dot{T}_K = 0,5\text{ K/min}$

Dabei wurden nach der Sterilisation für den Gehalt an Ammoniumstickstoff $1,8\text{--}2,3\text{ g/l}$ und für den Gehalt an säurelöslichem Phosphat-Phosphor $2\text{--}4\text{ mg/l}$ ausgewiesen. Für Glukose wurden Separatversuche mit den gleichen Sterilisations-Temperatur-Zeit-Profilen im 30 ml-Fermentor durchgeführt, wobei die Einwaagekonzentration 29 g/l vorlag. Dabei wurden nach der Sterilisation Gehalte an Glukose von $26,5\text{--}28\text{ g/l}$ ausgewiesen. Die Fermentation in den 5 Ausführungsbeispielen lieferten unter den angegebenen Sterilisationsbedingungen gleiche Ausbeute.

Temperatur

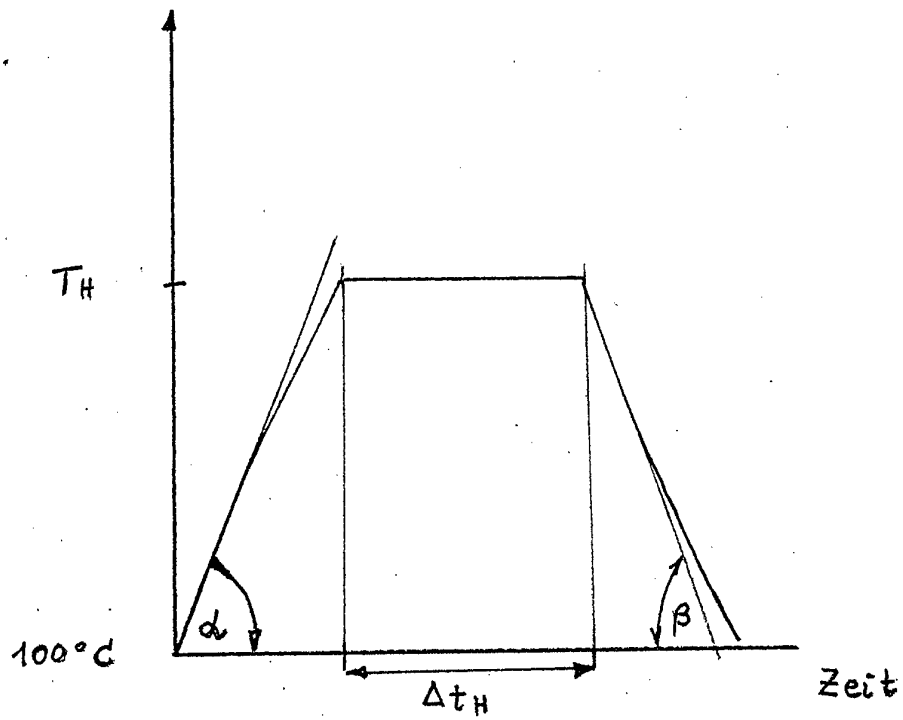


Diagramm 1

$$\dot{T}_H = \tan \alpha$$

$$\dot{T}_K = |\tan \beta|$$