

Studium technologie submersní fermentace

BOHUMIL SIKYTA, MILOŠ HEROLD, JAROMÍR ŠLECHTA, JIŘÍ ZAJÍČEK

Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy

576.097:577.15

Laboratorní tank pro submersní fermentaci

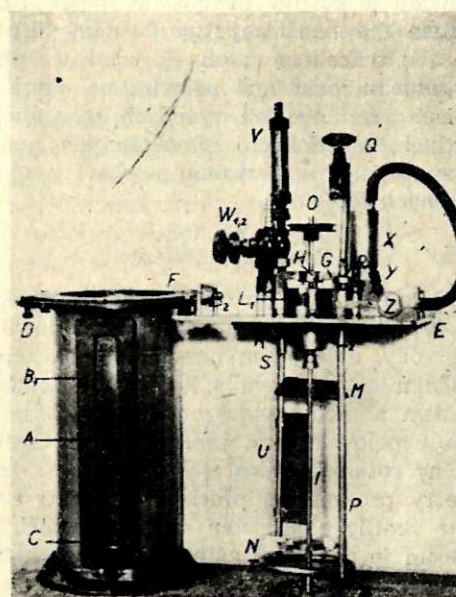
Vývoj podmínek submersní aerobní fermentace začíná řešením základních otázek v laboratorním měřítku v baňkách na třepacích strojích. V nich je možno sledovat velký počet faktorů, určujících optimální podmínky postupu pro laboratorní fermentaci a základní faktory pro fermentaci v tanku. Konečným cílem vývoje je však stanovit nejvýhodnější podmínky fermentace ve velkých výrobních fermentorech. Jde tu tedy o vystižení optimálních kulturních podmínek mikroorganismu ve dvou nádobách, které se liší nejen svým objemem, ale hlavně faktorem u hloubkové kultivace tak stěžejní důležitosti, jako je způsob a intenzita vzdušnění a míchání fermentační pudy. Kromě toho se liší fermentace v baňkách od postupu ve fermentačním tanku i řadou jiných faktorů, jako rozdílným materiálem, z něhož jsou nádoby zhotoveny, různou velikostí poměru plochy nádoby vůči objemu kapaliny, způsobem sterilace pudy, tvorbou pěny a použitím odpěňovacích látek, způsobem prekursorování, inokulace, zachováním aseptických podmínek kultivace, a někdy i složením pudy. Pro převádění podmínek fermentace z laboratorního měřítka do provozního se používá obvykle několika mezistupňů vývoje. Prvním z těchto mezistupňů jsou laboratorní fermentační tanky, v principu zařízení jako velké provozní fermentory. Všechny uvedené rozdíly mezi laboratorním postupem na třepacím stroji a provozním tankem jsou i mezi baňkami a laboratorními tančíky. Malý objem laboratorních tanků zaručuje poměrně hospodárný způsob řešení řady otázek, které by jinak musely být řešeny nákladnějším poloprovozním zařízením.

Laboratorní fermentory obsahují obvykle 5 až 30 l pudy. Jsou popsány a užívány nejrozličnější konstrukce [1, 2, 3, 4, 5]. V podstatě to mohou být fermentory, kde intenzivní vzdušnění nahrazuje míchání [6] nebo obráceně, vysoká intenzita míchání různě upravenými míchadly nevyžaduje zařízení pro přívod vzduchu do kapaliny [7, 8], nebo konečně fermentory kombinované, které mají zařízení pro vzdušnění i pro míchání, tedy obvykle vzdušnicí věnce a míchadla. Protože tohoto druhu fermentoru se nejběžněji používá ve výrobě, je výhodné používat tohoto typu tanků i pro zařízení laboratorní, a je to dokonce nutné, má-li být převod do dalšího stupně řešení na základě konkrétních podkladů [9].

Popis fermentačního tanku

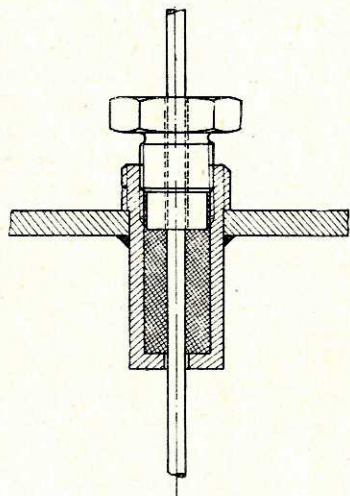
Laboratorní fermentační tanky, popisované v tomto článku, jsou zhotoveny z nerezavějící oceli AKVN. Vlastní tank (obr. 1) je nádoba válcovitého tvaru, celkového obsahu 20 l, plnění obvykle 10 l. Skládá se v podstatě ze dvou částí — z vlastní nádoby a víka.

Vlastní nádoba má mírně vydaté dno se zorným sklem A probíhajícím téměř po celé výšce tanku. Sklo je upevněno přírubou B₁ a těsněním z kvalitní elastické gumy bez textilní vložky. Uvnitř tanku na dně je vyměnitelné patní ložisko hřídele míchadla C, zhotovené z nerezové oceli nebo texgumoidu. Nahoře je nádoba zakončena přírubou B₂, již procházejí šrouby D, připevňující víko. Víko tanku E je zhotoveno z rovné desky z nerezové oceli a je připevněno na přírubu vlastní nádoby šesti šrouby D a těsným gumovým kruhem F. Armatura je připevněna na víku tanku a skládá se z těchto částí: ve středu víka je uložen kozlík G s texgumoidovým ložiskem H. Hřídel míchadla I je upevněn jednak v tomto ložisku, jednak při smontování tanku je konec hřídele, který prochází víkem, veden patním ložiskem C. Konec hřídele J je rovněž výměnný. Hřídel míchadla prochází víkem a je těsněn ucpávkovou komorou K. Ucpávková komora (obr. 2) je chráněna proti vnikání kontaminace z vnějšku horkým olejem v duplikátorové misce L₁, vytápěné parou. Těsnění proti vnitřnímu přetlaku je zlepšeno druhou miskou L₂ s olejem, umístěnou na hřídeli uvnitř tanku pod ucpávkou tak, že spodní část ucpávkového tělesa je ponořena do oleje. Na hřídeli pod miskou L₂ je namontováno mechanické odpěňvadlo M jako dvojice protilehlých sbíhavých plošek, mezi nimiž se při otáčení pěna stlačuje a ztekucuje. Na spodní části hřídele je upevněno vyměnitelné lopátkové míchadlo N, z jehož čtyř lopatek jsou dvě umístěny kolmo na směr otáčení, takže kapalinu vrhají ke stěně tanku, a dvě šikmo v úhlu 30°



Obr. 1 — 20 l nerezový laboratorní fermentační tank

na rovinu otáčení, takže kapalinu vrhají šikmo vzhůru. Na horním konci hřídele je řemenice O. Víkem prochází vzorkovací trubice P sahající ke dnu tanku, nad víkem zahnutá v ostrém úhlu a zakončená uzavíracím ventilem Q. Vrchní část trubice nad víkem je odnímatelná a k víku tanku je připevněna maticí R. Ústí vzorkovací trubice je opatřeno závitem k montáži odnímatelného potrubí, spojujícího navzájem jednotlivé tanky. Víkem dále prochází trubice pro přívod vzduchu S, zakončená vzdušnicím věncem T, umístěným pod míchadlem. Na této trubici je upevněna nastavitelná zádržka U, zamezující v kapalině tvorbě víru. Vzduch, přiváděný z ústředního rozvodu gumovou hadicí, je sterilován odnímatelným filtrem V. Filtř je konstruován ze železa a je plněn skelnou vatou. Je upevněn na kovové trubici přívodu vzduchu



Obr. 2 — Ucpávková komora

do tanku. Z víka je vyvedeno potrubí pro odchod vzduchu a dva nástavce s ventily W_1 , W_2 , pro vstřík inokula, oleje a pomocných látek. Na potrubí pro odvod vzduchu je kovový zachycovač kapek a pěny X s kohoutem Y a menší pojistný skleněný filtr Z, naplněný rovněž skelnou vatou. Zařízení pro přívod a odvod vzduchu, ochranná pouzdra na vzorkovacím a ostatních vstříkovacích vývodech jsou zhotovena z kvalitních, elastických, silnostěnných gumových trubic, snášejících opakovanou sterilaci v autoklávu při zvýšených teplotách.

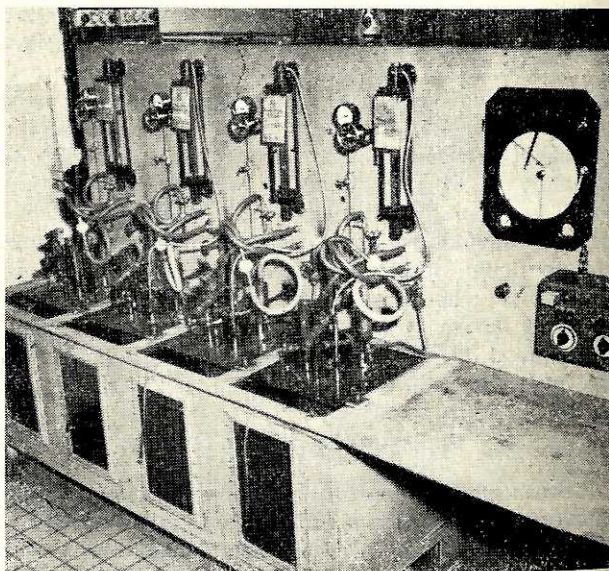
Pomocná zařízení

Tanky jsou uloženy po čtyřech do společné vodní lázně (obr. 3), opatřené automatickým dávkováním studené vody, ovládaným pneumatickým, tepelným, registračním regulátorem s kapilárním teploměrem jako čidlem a membránovým pneumatickým ventilem. Na panelové desce, umístěné nad lázní, jsou připevněny rotametry pro měření průtoku vzduchu, manometry pro měření tlaku vzduchu v tanku, příslušné ventily a potrubní rozvod (vzduch, pára). Za panelem je po délce vodní lázně připevněna pohonná transmise, uložená v texgumoidových ložiskách. Transmise je poháněna třífázovým elektromotorem (1,5 HP) s několikastupňovou řemenicí pro

měnění otáček. Transmisí jsou klínovými řemeny poháněna míchadla tanků. Počet otáček lze měnit stupňovitě od 170 do 500 otáček/min. s případným použitím převodové předlohy u elektromotoru nebo měněním řemenice různého průměru na hřídeli míchadla. Stlačený vzduch je veden potrubím od ústředního kompresoru centrálním filtrem, naplněným skelnou vatou. Centrální filtr je společný pro několik tanků a jeho úkolem je vzduch předběžně zbavit hrubé kontaminace. Náplň filtru se vyměňuje dvakrát za rok, steriluje parou a vysuší vzduchem, čemuž napomáhá plášť filtru s parním vytápěním. Z ústředního filtru je vzduch veden přes regulační vzduchový ventil do rotametru, odkud přichází snímatelnou gumovou hadicí do malých individuálních filtrů V. Průchodem skelnou vatou, napěchovanou ve filtrech, se vzduch steriluje. Individuální filtry se před každým použitím sterilují v horkovzdušném sterilátoru, načež se pod plamenem našroubují na přívod vzduchu do tanků. Vzduch odchází z tanků kovovým lapačem kapek a pěny. Přetlak v tankách se reguluje ručně částečným otevřením kohoutů. Na potrubí odpadního vzduchu za menším pojistným skleněným filtrem je zapojen manometr, ukazující tlak vzduchu v tančíku.

Pracovní postup používaný při práci s laboratorními tančíky

Popsaných laboratorních fermentačních tanků se používá ve Výzkumném ústavu antibiotik od r. 1951. Za tu dobu byl vypracován technologický postup, který byl prověřen při výzkumu technologie několika základních antibiotik. Přitom se ukázalo několik velmi důležitých faktorů. Je to zvláště způsob sterilace půdy, přerušované míchání, zamezení vniknutí kontaminace, víceetapňová fermentace, způsob prekurzorování a odpěňování půdy, vliv konstrukčního materiálu, podmínky míchání a vzdušnění. Na základě zkušeností získaných sledováním a propracováním těchto faktorů byl sestaven tento pracovní postup:



Obr. 3 — Baterie laboratorních fermentačních tanků

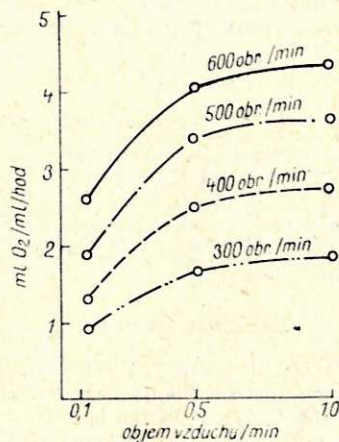
Řádně umyté prázdné tanky se sestaví a s nasazenými malými pojistnými skleněnými filtry se sterilují ve skříňovém autoklávu 4 hodiny při 125° C tak, že všechny ventily a kohouty na tanku jsou uzavřeny. Přes skleněné filtry se vyrovnává tlak v tancích s okolím při sterilizaci a zvláště po ní při chladnutí tanku. Živná půda se připravuje buď v oddělené nádobě ze surovin, prošlých chemickou a hlavně biologickou kontrolou [10] a vpustí se do tančičku, který se pak znovu steriluje v autoklávu, nebo se půda připraví a steriluje v centrálním sterilátoru půdy, odkud se přepustí pomocným rozvodným potrubím sterilovaným parou do jednotlivých tančičků, které jsou mezitím po sterilizaci usazeny do lázně. V centrálním sterilátoru, který je poněkud upravený poloproduční tank, se steriluje půda za neustálého míchání, tedy způsobem, kterým bude sterilována v poloprodučních nebo výrobních tancích. Před uložením do lázně se na tančičky nasadí za aseptických podmínek sterilované vzduchové filtry, dávkovací lahvičky s odpěňovadlem, popř. s prekursorem. Živná půda v tancích se naočkuje pipetou z inokulační baňky inokulem po ověření jeho sterility a produkční schopnosti. Tančičky po nasazení do lázně předešlé teploty se zapojí na přívod a odpad vzduchu, vyreguluje se vzdušnění a přetlak v tanku, do vrchní olejové misky L_1 se vpustí pára a zapojí se míchání. Na vzorkovací vývody tančičků se nasadí ochranné gumové násadce, naplněné 2procentním vodním roztokem fenolu.

Při vícestupňové fermentaci, kdy se jednoho tančičku používá jako tanku očkovacího, je z tohoto tanku přepouštěno vzrostlé inokulum rozdílem tlaků sterilního vzduchu do dalších tanků, a to odnímatelným potrubím z nerezové oceli, předem sterilovaným parou a napojeným na vzorkovací vývody tančičků. Během kultivace jsou asepticky brány vzorky fermentační půdy. V nich se zjišťuje sterilita půdy očkovaním na krevní agary a do bujonů s glukosou, změny složení živné půdy během růstu mikroorganismů a biosynthesy antibiotika.

Půda se odpěňuje buď mechanicky, nebo chemickými odpěňovacími prostředky. Mechanická odpěňovadla jsou zařízení namontovaná na hřídeli nad hladinou půdy (obr. 1 M). Pěnění je možno omezit také vypnutím míchadla, snížením množství vzduchu nebo změnou přetlaku v tanku. Prerušování vzdušnění a míchání má však často nepříznivý vliv na výtěžek produktu, jako je tomu zvláště např. při biosynthesě chlortetracyklinu [11]. Chemická odpěňovadla jsou olej sojový, kokosový a jiné rostlinné oleje nebo tekuté frakce živočišných tuků, silikonové oleje, alkoholy a různé jejich kombinace, např. silikonový olej suspendovaný v sojovém oleji apod. Odpěňovací prostředky lze přidávat automatickým dávkovačem ovládaným elektromagnetickým ventilem, ale osvědčilo se i ruční dávkování sterilního oleje z lahvičky, která je gumovým nástavcem spojena s přívodem do tanku. Pění-li živná půda, vpouští se olej v potřebných dávkách do tanku ventilem na vstupním potrubí. Výhodnější z obou je mechanické odpěňování, protože chemická odpěňovadla vesměs snižují přenos kyslíku do kapaliny, některá, jako např. oleje a alkoholy jsou mikroorganismy využívány jako zdroj uhlíku,

mohou však způsobovat komplikace při izolaci produktu z fermentované půdy.

Vliv konstrukčního materiálu na růst mikroorganismů se zkouší vkládáním zářezek nebo kusů plechu z různého materiálu tak, aby poměr plochy zářezky a poměr vnitřní plochy tančičku k objemu fermentované kapaliny byl stejný.



Obr. 4 — Hodnoty přenosu kyslíku

Hodnoty přenosu kyslíku, zjišťované metodou podle Coopera, Fernstroma a Millera [12] jsou uvedeny na obr. 4. Stanovení byla prováděna při teplotě $29 \pm 1^\circ \text{C}$ v objemu 10 l kapaliny. Bylo použito standardního lopatkového míchadla, jehož průměr se rovnal $\frac{2}{3}$ průměru tanku a větracího věnce s deseti otvory. Jak je patrné z obr. 4, je možno dosáhnout přenosu kyslíku různým způsobem od 0,2 do 4,2 ml O₂ na 1 ml kapaliny za hodinu, i když většina fermentací probíhá při hodnotách 2 až 3 ml O₂ na 1 ml za hodinu.

Diskuse

Popisovaného fermentačního zařízení se používá již sedm let pro výzkum technologie antibiotik penicilinu G a V, streptomycinu, chlortetracyklinu, oxytetracyklinu, erythromycinu a fungicidinu. Obsah antibiotik v 1 ml živné půdy po ukončené fermentaci, provedené v popisovaných laboratorních fermentorech, byl nejméně stejný nebo vyšší než ve fermentorech poloprodučních nebo výrobních, takže výsledky studia technologických podmínek fermentace mohou poskytovat konkrétní podklady pro převádění fermentační technologie do většího měřítka. Udržovací cena zařízení je poměrně nízká, tanky lze snadno rozebrat, čistit a sestavovat. Všechny části, kromě ucpávkové komory, jsou vyměnitelné. Pracovní objem 10 l je dostatečný pro brání vzorků pro analýzy během fermentace bez podstatné změny objemu a zajišťuje i dostatek materiálu pro chemickou izolaci produktu z fermentované půdy. V laboratorních tancích je možno sledovat řadu experimentálních podmínek, jako např. způsob inokulace, vliv konstrukčního materiálu, způsob sterilizace půdy, složení živné půdy atd. Po celou dobu používání popsanych

laboratorních tanků nepřevýšil počet kontaminovaných šarží 5 % celkového počtu šarží.

Závěr

Je popisována konstrukce laboratorních tanků a postup práce, který se osvědčil během sedmi let pro vypracování technologie několika základních antibiotik. Tyto zkušenosti byly během času dány k dispozici i dalším pracovištím pro řešení obdobných problémů.

Выводы

Описывается конструкция лабораторных ферментеров и вспомогательного оборудования. Далее описывается способ работы с этой аппаратурой, который давал хорошие результаты в течении семи лет при разработке технологии производства нескольких основных антибиотиков, как бензилпенициллина, феноксибензилпенициллина, стрептомицина, хлортетрациклина, окситетрациклина, эритромицина и фунгицидина. Полученный опыт передавался в течении этого времени также иным научным и производственным учреждениям для решения подобных вопросов.

Zusammenfassung

Es wird die Konstruktion von Laboratoriumsfermentoren und die Hilfseinrichtungen sowie die Arbeitsweise beschrieben, die sich im Laufe von 7 Jahren bei der Ausarbeitung der Technologie einiger Antibiotika (Penicillin G, Penicillin

V, Streptomycin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Erythromycin und Fungicidin) bewährt haben. Diese Erfahrungen wurden im Laufe der Zeit auch anderen Arbeitsstellen für die Lösung ähnlicher Probleme zur Verfügung gestellt.

Literatura

- [1] R. W. RIVETT, M. J. JOHNSON, W. H. PETERSON: Laboratory Fermentor for Aerobic Fermentations. Ind. Eng. Chem., 42, 188–190 (1950).
- [2] W. H. BARTHOLOMEW, E. O. KARROW, M. R. SFAT: Design and Operation of a Laboratory Fermentor. Ind. Eng. Chem. 42, 1827–1830 (1950).
- [3] R. G. DWORSCHAK, A. A. LAGODA, R. W. JACKSON: Fermentor for Small-Scale Submerged Fermentations. Appl. Microbiol. 2, 190–197 (1954).
- [4] W. C. FRIEDLAND, M. H. PETERSON, J. C. SYLVESTER: Fermentor Design for Small Scale Submerged Fermentation. Ind. Eng. Chem. 48, 2180–2182 (1956).
- [5] C. L. KROLL, S. FORMANEK, A. S. COVERT, L. A. CUTTER, J. M. WEST, W. E. BROWN: Equipment for Small Scale Fermentations. Ind. Eng. Chem., 48, 2190–2193 (1956).
- [6] D. G. LUNDGREN, R. T. RUSSELL: An Air-Lift Laboratory Fermentor. Appl. Microbiol., 4, 31–33 (1956).
- [7] W. E. BROWN, W. H. PETERSON: Penicillin Fermentation in a Waldhof-Type Fermentor. Ind. Eng. Chem., 42, 1823 (1950).
- [8] E. B. CHAIN, S. PALADINO, F. UGOLINI, D. S. CALLOW, J. Van Der SLUIS: A Laboratory Fermentor for Vortex and Sparger Aeration. Rend. Inst. Sup. di Sanita, 17, 61–86 (1954).
- [9] H. A. NELSON, W. D. MAXON, T. H. ELFERDINK: Equipment for Detailed Fermentation Studies. Ind. Eng. Chem. 48, 2183–2189 (1956).
- [10] M. HEROLD a kolektiv: Antibiotika, Sbírka vědeckých prací 6. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1955.
- [11] V. MATELOVÁ, M. MUSÍLKOVÁ, J. NEČÁSEK, F. ŠMEJKAL: Vliv přerušovaného vzdušnění na produkci chlortetracyklinu. Preslia, 27, 27–34 (1955).
- [12] M. C. COOPER, G. A. FERNSTROM, S. A. MILLER: Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. Ind. Eng. Chem., 36, 504–509 (1944).