

Interakce mezi vnějšími podmínkami a výtěžky biosyntéz sekundárních metabolitů

663.15
663.15.039.3

Ing. PETR ETTLER, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Příspěvek přednesený na konferenci „Náprodukce mikrobiálních metabolitů“, Žďár nad Sázavou, 1979

Kultivační baňka je všeobecně užívaným nástrojem studia submerzních kultur v laboratorním měřítku. Její použití je výhodné pro screening, testování fermentačních médií, selekci kmenů a hodnocení jejich růstu. Ve většině submerzních kultur je však růstová rychlost funkcí rychlosti přenosu hmoty a z laboratorního měřítka sama o sobě neposkytuje žádoucí informace o vztahu dodávky kyslíku a jeho spotřeby k produkci, jenž je označován za limitující faktor při přenosu do většího měřítka. Nelze však opomenout otázku promíchávání, která je významná nejen z hlediska dispergačního účinku souvisejícího s přenosem kyslíku, ale též z hlediska homogenizačního účinku. Homogenizace je zvláště důležitá pro přestup tepla i hmoty u médií s vyšší zdánlivou viskozitou. Již různý způsob uzavírání baněk zátkami (1, 2, 3) ovlivňuje dodávku kyslíku k rostoucím buňkám. Při biosyntetické přípravě erythromycinu jsme zjistili až 50% rozdíl v tvorbě produktu podle způsobu zátkování [4]. Hirose [5] spolu s Mc Danielem a Bailem [6] považují přestup kyslíku zátkou baňky a přestup přes mezifázové rozhraní kapalina—plyn za dva nejdůležitější mechanismy ovlivňující studium submerzních kultur již v laboratorním měřítku. S tímto vědomím se pokoušel Yamada [7] pomocí membrán nové kyslíkové elektrody a polarografického analyzátoru hodnotit aerační kapacity různých typů baněk s různými typy uzávěrů (K_1) a definovat též odpor přes mezifázové rozhraní kapaliny—plyn (K_2).

Definoval OTR přes zátku jako: $N_1 = K_1 (p_a - p_f)$ (1)

přes mezifázové rozhraní: $N_2 = K_2 (p_f - p_1)$ (2)

Celková OTR byla potom stanovena jako:

$$N = \frac{1}{\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2}} (p_a - p_1) \quad (3)$$

aerační koeficient: $n = \frac{N}{V_1}$ (4)

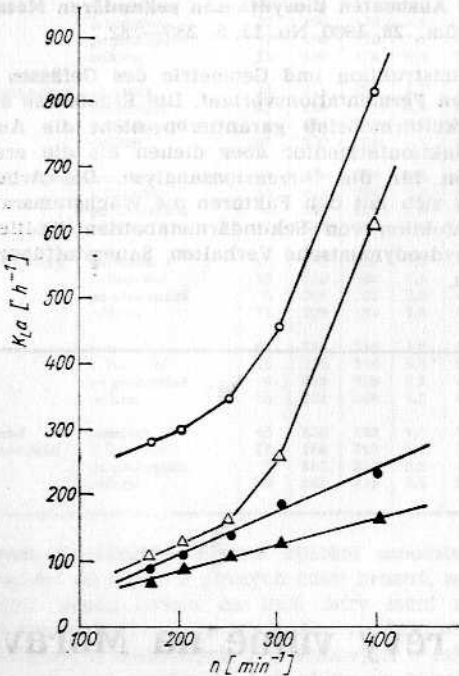
Třepačkovými pokusy při konverzi sorbitolu na sorbozu kulturou *Acetobacter suboxydans* potvrdil pak proporcionálnost mezi aerační kapacitou a rychlostí konverze. Tento model jednosměrné difúze je zkrácený, neboť nezahrnuje ventilaci CO_2 . Tento druhý směr difúze bývá zanedbáván, přestože existují práce popisující odlišnost jak v rychlosti růstu, tak v tvorbě produktu při zvýšených koncentracích CO_2 . Také vliv aerace z povrchu bývá opomíjen.



Obr. 1. Schematický náčrt baněk používaných pro sledování rychlosti přenosu kyslíku v laboratorním měřítku u modelových médií i při kultivačních pokusech (Van Suijdam [8])

Van Suijdam a kol. [8] se pokusili statickou a dynamickou metodou definovat rychlost přenosu kyslíku v baňce při plnění vodou i syntetickým růstovým médiem. Byla potvrzena (obr. 1) odlišnost zjišťování OTR ve vodě i vzrůstovém médiu, byť jen syntetickém. Je zajímavé, že se přesto stále ještě setkáváme s vyhodnocováním fermentačních pokusů či volbou jejich parametrů podle hodnoty tzv. sulfitového čísla, i když je všeobecně tradována jeho neadekvátnost vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem a iontovým silám média.

Zjištění homogenity vsádky, ovlivnění nepříznivých viskozitních poměrů z hlediska přestupu hmoty a tepla, zjištění vlivu velikosti inokulace, vlivu stříhových sil, vlivu aerace včetně aerace z povrchu nátokování substrátů a ostatní, podle pH, respirace či pO_2 , regulace technologie, jsou důležité faktory, které mohou stěžít být propracovány v laboratorním měřítku.



Δ $V_g = 0.41$ VVM } sířičitanová metoda
 \circ $V_g = 0.88$ VVM }
 \blacktriangle $V_g = 0.41$ VVM } statická metoda bez korekce
 \bullet $V_g = 0.88$ VVM } na odezvu elektrody

Obr. 2. Porovnání hodnot koeficientu K_{La} získaných sířičitanovou a statickou metodou v 300 l fermentoru Chemap

Na obr. 2 je uvedeno porovnání hodnot koeficientu K_{La} získaného sířičitanovou a statickou metodou při dvou velikostech aerace [9]. Sířičitanová čísla vykazují v porovnání s výsledky statické metody exponenciální vzrůst v závislosti na frekvenci otáčení míchadla, přestože hodnoty K_{La} byly korigovány podle iontové síly roztoku. Z uvedených výsledků vyplývá nerealistická aplikace sířičitanové metody i na hrubý odhad velikosti koeficientu K_{La} . Její výhoda však tkví v možnosti porovnání starších literárních údajů a možnosti porovnání různých aeračních systémů.

Greenhalgh a kol. [10] uvádějí, že skutečná hodnota přestupu kyslíku z plynu do kapaliny odpovídá 10 až 15 % hodnoty sulfátového čísla. V literatuře je všeobecně doporučováno používat pro studie přenosu kyslíku simulační média, která se svým rheologickým chováním co nejvíce přibližují skutečné situaci v průběhu procesu. Jedná se o různé roztoky polymerních vláken (modelovaná morfologie hyf), papírovou drť nebo roztoky CMC (modelované newtonské chování mycelárních suspenzí [11]).

Mnohem jednodušší situace z hlediska doprovodných efektů prostředí (fyzikálně chemické vlastnosti) a apli-

kace kyslíkových elektrod (vliv interakce bublin, tloušťky membrány) je při testování dynamických vlastností systému přímo v mikrobiální kultuře bilanční metodou. Výsledkem výpočtu je pak zjištění celkové rychlosti absorpce kyslíku, což je parametr dostatečně charakterizující průběh biosyntetického procesu v daném zařízení.

Použité symboly

- N_1 rychlost přenosu kyslíku přes zátku ($\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$)
- K_1 objemový koeficient přestupu kyslíku přes zátku ($\text{mol O}_2 \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
- N_2 rychlost přenosu kyslíku přes mezifázové rozhraní kapalina—plyn ($\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$)
- K_2 objemový koeficient přestupu kyslíku přes mezifázové rozhraní kapalina—plyn ($\text{mol O}_2 \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
- P_a parciální tlak O_2 mimo buňku (Pa)
- P_f parciální tlak kyslíku v plynné fázi uvnitř baňky (Pa)
- P_l parciální tlak kyslíku v kapalně fázi v baňce (Pa)
- n rychlost přestupu kyslíku v kultivační baňce ($\text{mol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
- V_1 objem kapalně fáze (ml)
- K_{La} objemový koeficient přestupu kyslíku (h^{-1})
- CMC karboxymetylcelulóza

Literatura

[1] CHAIN, E. B., GUALANDI, G.: *Rent. Inst. Super. Sanita* 17, 1954, s. 5
[2] SCHULTZ, J. S.: *Appl. Microbiol.* 12, 1964, č. 14, s. 305
[3] IKENO, Y., OZAKI, A.: *Agr. Biol. Chem.* 32, 1968, č. 7, s. 912
[4] ETTLER, P., PÁČA, J., CECHNER, V.: V. IFS. W. Berlin, Ed. H. Dellweg 1976
[5] HIROSE, Y., SONODA, H., KINOSHITA, K., OKADA, H.: *Agr. Biol. Chem.* 30, 1966, č. 1, s. 49
[6] MC DANIEL, L. E., BAYLEY, E. G.: *Appl. Microbiol.* 17, 1969, č. 2, s. 286
[7] YAMADA, S., WADA, M., CHIBATA, I.: *J. Ferm. Technol.* 56, 1978, č. 1, s. 29
[8] VAN SUIJDAM, J. C., KOOSSEN, N. W. F., JOHA, A. C.: *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1978, s. 1695
[9] PÁČA, J., ETTLER, P., GRÉGR, V.: *Appl. Chem. Biotechnol.* 26, 1978, s. 309
[10] GREENHALGH, S. H., MC MANAMEY, W. J., PORTER, K. J.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 25, 1975, s. 143
[11] MOO-YOUNG, M., HIROSE, T., GEIGER, K. H.: *Biotechnol. Bioeng.* 11, 1969, s. 725

Ettler, P.: *Interakce mezi vnějšími podmínkami a výtěžky biosyntéz sekundárních metabolitů*. Kvas. prům. 28, 1980, č. 12, s. 280—282.

Typ zařízení a jeho konstrukce výrazně ovlivňují biosyntetický proces. Výsledky z kultivační na třepacím stroji nemohou poskytnout téměř žádné informace pro rozměrovou analýzu. 20 ks slitých baněk à 50 ml neodpovídá 1 l netto obsahu fermentoru z pohledu chování kultury i tvorby produktu. Dosažení špičkové produkce v laboratorním měřítku není zárukou adekvátního efektu ve větším měřítku, nýbrž slouží jako prvotní informace o procesu. Jednou z cest sledování vazby aparátu na proces a jeho optimalizaci je zachování kinematické podobnosti a dynamické podobnosti systémů (rovnost sil působících na kapalinu, obvodové rychlosti míchadla, relace P/V , T_{mix} , K_{La} apod.).

Эттер, П.: *Взаимодействие между внешними условиями и выходом вторичных продуктов метаболизма в процессах биосинтеза*. Квас. прум. 26, 1980, № 12 стр. 280—282.

На ход процесса биосинтеза оказывают значительное влияние тип и конструкция применяемой установки. Результаты разведения на качальке не могут дать почти никакой информации полезной для больших объемов

среды. С точки зрения поведения культуры и образования продукта слитое содержание 20 колб по 50 мл не отвечает даже одному литру содержания ферментера. Получение максимално возможной продукции в лабораторном масштабе не может быть гарантией же эффективности в производственных условиях. Лабораторные результаты являются лишь первой, ориентировочной информацией о процессе. Одним из методов изучения влияния аппарата на ход процесса и возможности его оптимизации является обеспечение кинематического и динамического подобия систем (равности сил действующих на жидкость, окружной скорости мешалки, отношения P/V , T_{mix} , K_L и итд.).

Ettler, P.: Interaction between enviromental conditions and biosynthesis of excessive metabolites. Kvas. prům. 26, 1980, No. 12, pp. 280—282.

The type and design of fermentation vessel influences the biosynthetic process. The results from shaken

flasks and laboratory scale can't offer enough data for dimensional analysis. The discussion is focused on some physical factors limiting the microbial growth under specific environment e. g. resistences to oxygen transfer.

Ettler, P.: Beziehung zwischen äußeren Bedingungen und den Ausbeuten Biosynthesen sekundären Metabolite. Kvas. prům., 26, 1980, No. 12, S. 280—282.

Die Konstruktion und Geometrie des Gefäßes beeinflusst den Fermentationsverlauf. Die Ergebnisse aus der Schüttelkulturmaßstab garantieren nicht die Ausbeute im Produktionfermentor aber dienen als die erste Information für die Dimensionsanalyse. Die Arbeit beschäftigt sich mit den Faktoren die Wachstumsrate und Überproduktion von Sekundärmetaboliten limitieren z. B. das hydrodynamische Verhalten, Sauerstoffübergangsrate u. a.