

Regulace aerace v průběhu výroby oxytetracyklinu

663.15:615.779.93

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

Příspěvek přednesený na konferenci „Racionalizace fermentačních procesů“ ve Zvíkovském Podhradí, červen 1981

ÚVOD

Fermentační průmysl se v posledních letech stále více prosazuje v mnoha odvětvích našeho hospodářství. Tento vliv je však spojen se zvýšeným nárokem na spotřebu elektrické energie. Ekonomicky vedený proces by měl mít optimální využití energie vložené do míchání a vzdušnění vsádky fermentoru, neboť růst produkčního mikroorganismu a tvorba produktu jsou výrazně závislé na těchto operacích. Spotřeba energie pro výrobu stlačeného vzduchu představuje v celosvětovém měřítku 10 % veškeré energie spotřebované v průmyslu [1]. Sterilní vzduch je nejdražší „surovinou“ při výrobě antibiotik a jiných biosyntetických produktů. Jeho příprava stojí 40 % veškerých nákladů [2]. Příspěvek pojednává o racionalizaci výroby oxytetracyklinu v měřítku 15 m³ fermentorů regulací dodávky kyslíku k rostoucím buňkám *Streptomyces rimosus* při biosyntéze oxytetracyklinu.

Materiál a metody

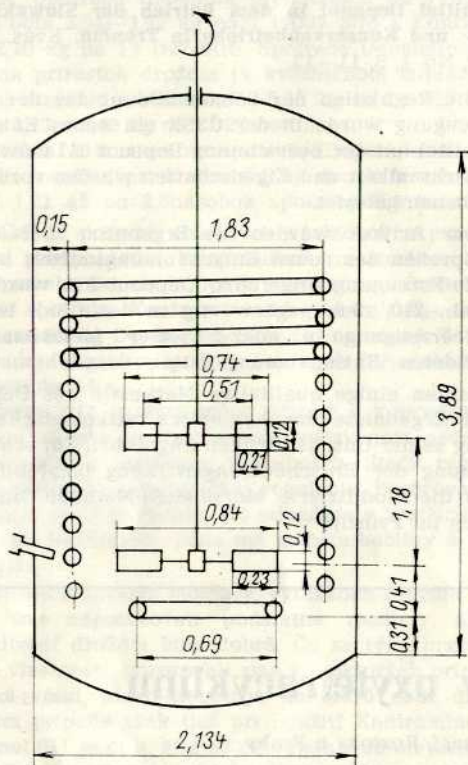
Pokusy byly prováděny v aparatuře 15 m³ fermentorů s instalovaným jednotkovým příkonem $P/V = 1,55 \text{ kW} \cdot \text{m}^{-3}$ a frekvencí otáčení míchadla 120 min^{-1} . Geometrie vestavby a míchání je uvedena na obr. 1. Změny koncentrace rozpouštěného kyslíku byly sledovány ste-

rilovatelnou kyslíkovou elektrodou Sensorlabs, jak jsme již dříve publikovali [3]. Umístění elektrody ve stěně fermentoru je zřejmé z obr. 1. Reologická charakteristika kultivační pudy byla zjišťována ze závislosti smykového napětí a stříhové rychlosti v systému válec-válec rotačního viskozimetru Contraves-Rheomat 30, Švýcarsko. Hodnota sedimentu byla odečtena z kalibrované kyvety po 10 min centrifugace při $n = 3000 \text{ min}^{-1}$. Analýza výstupních plynů byla prováděna Infralytem, Junkalor, NDR. Kultivační médium pro biosyntézu oxytetracyklinu je komplexního charakteru, jako hlavní zdroje C a N jsou používány bramborový škrob, síran amonný a zdroj organického dusíku.

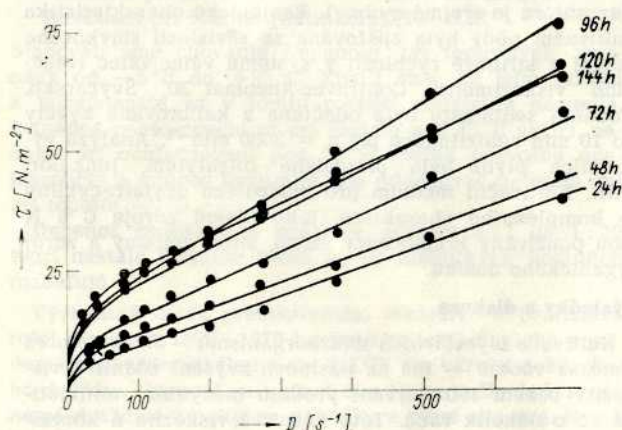
Výsledky a diskuse

Kultivace mycelárních mikroorganismů — *Streptomyces rimosus* včetně — má za následek zvýšení zdánlivé viskozity během 150 h trvání procesu biosyntézy antibiotika až o několik řádů. Tato zdánlivá viskozita a konzistence komplexního média mají za následek podstatné zhoršení dodávky kyslíku k buňce [5]. Mezi producenty antibiotik patří *Streptomyces rimosus* k méně náročným. Z pohledu reologického chování biosuspenze *Streptomyces rimosus* při biosyntéze oxytetracyklinu se setkáváme se dvěma protichůdnými procesy. Zmazovatělý a zcukře-

ný škrob je od startu procesu postupně enzymově hydrolyzován, zatímco růstem trojrozměrné sítě mycelia se viskozita zvyšuje. Sledování závislosti smykového napětí a stříhové rychlosti (obr. 2) ukázalo, že již od 24 h kultivace se začíná projevovat nenewtonské chování biosuspenze. Pseudoplastický charakter toku je stále výraznější až do 96 h, kdy je dosaženo maximální hodnoty zdánlivé viskozity. Od 100 h kultivace lze pozorovat postupné snižování zdánlivé viskozity částečnou autolýzou mycelia. Samostatné vynesení hodnot zdánlivé viskozity při stříhové rychlosti $D = 698 \text{ s}^{-1}$ v porovnání s hodnotou sedimentu na obrázku 3 ukazuje dobrou shodu obou metodik pro hrubé zjišťování růstu mycelárních mikroorganismů v heterogenním suspenzním médiu.



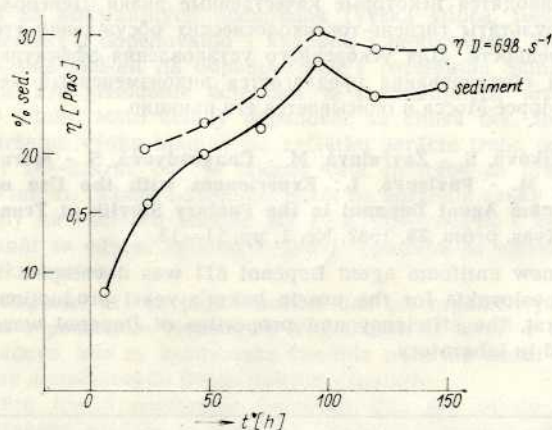
Obr. 1. Geometrické uspořádání vestavby 15 m^3 fermentoru



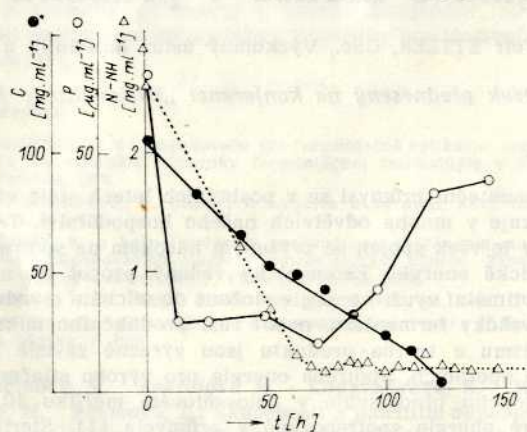
Obr. 2. Reologická charakteristika kultivačního média v průběhu biosyntézy oxytetracyklinu

V průběhu biosyntézy oxytetracyklinu se setkáváme s plynulým úbytkem uhlíkatého zdroje po celou dobu

kultivace, s udržováním optimální hladiny pH a koncentrace amonných iontů. Obrázek 4 popisuje změny koncentrace rozpuštěného kyslíku a fyziologickou aktivitu kultury *Streptomyces rimosus* při biosyntéze oxytetracyklinu. Je zřejmé, že po inokulaci produkčního fermentoru naběhne krátká etapa adaptace kultury na produkční médium. Prudký pokles hodnoty rozpuštěného kyslíku je způsoben intenzivním růstem primárního mycelia. Hydrolytický rozklad škrobu není tak rychlý, aby nastal pokles zdánlivé viskozity depotního uhlíkatého zdroje, a tak mezi 20. a 30. hodinou kultivace je dodávka kyslíku k rostoucím buňkám *Streptomyces rimosus* menší než potřeba. Tento kyslíkový limit trvá při velikosti aerace 0,6–0,8 VVM několik hodin. Nejvyšší fyziologická aktivita kultury zjišťovaná analýzou výstupních plynů spadá též do počátečního období biosyntézy. Dá se tedy říci, že pokles hodnoty D. O. C. do limitní koncentrace není tedy v časové souvislosti s maximálním růstem mycelia. Těmito daty nebyl též identifikován mechanismus „přepnutí“ primárního metabolismu na sekundární.



Obr. 3. Porovnání hodnot zdánlivé viskozity biosuspenze *Streptomyces rimosus* se stanovením sedimentu



Obr. 4. Úbytek C, N a P subsirátů při kultivaci *Streptomyces rimosus* v 15 m^3 fermentoru

Místo N—NH má být správně N—NH_4^+

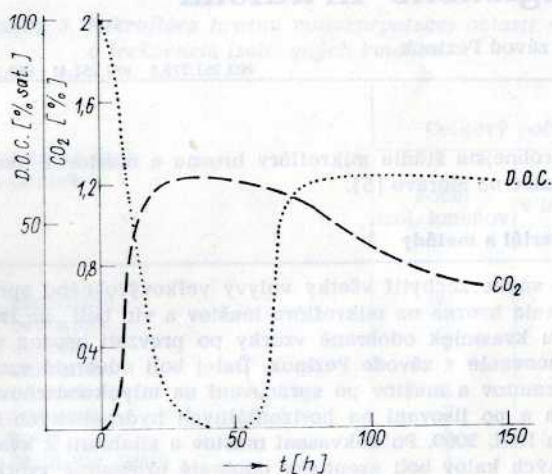
Dodávku kyslíku k rostoucím buňkám lze ovlivnit řadou způsobů: frekvencí otáčení míchadla, velikostí aerace, přetlakem ve fermentoru, obohacováním aeračního plynu kyslíkem, koncentrací povrchově aktivních látek apod.

Protože 15 m^3 fermentory nejsou vybaveny motory s převodovkami s možností změny frekvence otáčení míchadla, byla naše pozornost zaměřena na velikost aerace.

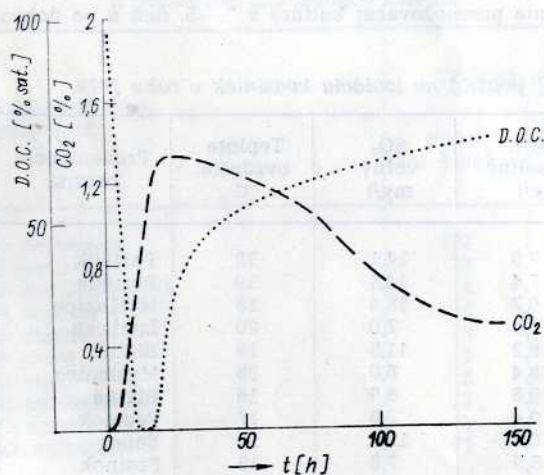
Při biosyntézách antibiotik bývá mnohdy vyžadována velikost aerace 1 VVM bez znalosti skutečné potřeby mikroorganismu. V provozním měřítku však tato vyšší aerace způsobuje nadměrné pění, respektive v potenciální ohrožení sterility a nižší sklizeň vyfermentované půdy. Proto podle znalosti průběhu koncentrace rozpuštěného kyslíku a respirace kultury byl navržen regulovaný aerační režim:

0—10 h kultivace	velikost aerace 0,55 VVM
10—20 h kultivace	0,68 VVM
20—30 h kultivace	0,5 VVM
30—150 h kultivace	0,36 VVM

Při tomto změněném režimu aerace byly sledovány průběhy veličin jako při standardně vedeném procesu. Obr. 5 demonstruje průběh D.O.C. a respirace kultury



Obr. 5. Průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku a respirace kultury *Streptomyces rimosus* při velikosti aerace 0,6—0,8 VVM



Obr. 6. Průběh koncentrace rozpuštěného kyslíku a respirace kultury *Streptomyces rimosus* při regulovaném režimu aerace

Streptomyces rimosus. Prodloužil se sice kyslíkový limit, fyziologická aktivita kultury však zůstala prakticky beze změny, právě tak jako rychlost tvorby sekundárního metabolitu. Tyto výsledky jsou ve shodě s údaji Pokorného [6]. Pro fermentační linku 6 produkčních fermentorů v sérii byl pak vypočítán souběh ve spotřebě sterilního vzduchu a na toto množství je možno regulovat dodávku

vzduchu v kompresoru. K dalším významným efektům patří značná úspora chemických protipěnicích prostředků a zvýšení sklizeného množství fermentační půdy z jednoho fermentoru a tím lepší využití fermentačního prostoru.

Literatura

- [1] LIŠKA, A.: Osobní sdělení 1981
- [2] WHITAKER, A.: Proc. Biochem. 8 (9), 1973 s. 23
- [3] PÁČA, J., ETTLER, P., GRÉGR, V.: Kvasný prům. 24, č. 8, 1978, s. 181
- [4] JANIČEK, G., ŠANDERA, K., HAMPL, B.: Rukověť potravinářské analytiky, SNTL Praha 1982
- [5] CHARLES, M.: Adv. Biochem. Eng. 8, č. 1, Eds. Ghose, T. K., Fiechter, A., Blakeborough, N., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1978 s. 1
- [6] POKORNÝ, M., DURIČ, N., BERNÍK, J.: Abstracts of Inter. Symp. on Antibiotics Weimar, NDR 1979 s. C-5

Ettler, P.: Regulace aerace v průběhu výroby oxytetracyklinu. Kvas. prům., 28, 1982, č. 1, s. 13—16.

Byly získány údaje o spotřebě kyslíku kultu-
rou *Streptomyces rimosus*, reologickém chování biosuspenze a průběh hodnoty rozpuštěného kyslíku při biosyntéze oxytetracyklinu v 15 m³ fermentorech. Byl zaveden regulovaný režim aerace, který je zrcadlovým obrazem průběhu rozpuštěného kyslíku. Bylo tak dosaženo značné úspory sterilního vzduchu, který je nejdražší „surovinou“ ve fermentaci, dále bylo dosaženo značné úspory chemických protipěnicích prostředků. Větší sklizené množství půdy ovlivnilo výtěžek účinné látky z fermentoru.

Эттлер, П.: Регулирование аэрации в процессе производства окситетрациклина. Квас. прум., 28, 1982, № 1, стр. 13—16.

Были получены данные о потреблении кислорода культурой *Streptomyces rimosus*, о реологическом поведении биосуспензии и описан ход величины растворенного кислорода при биосинтезе окситетрациклина в 15 м³-вых ферментерах. Был внедрен регулируемый режим аэрации, являющийся зеркальным образом течения растворенного кислорода. Таким образом была достигнута значительная экономия стерильного воздуха, самого дорогого «сырья» ферментации, далее была достигнута экономия химических противопенивающих средств. Большее собранное количество почвы оказало влияние на выход действующего вещества из ферментера.

Ettler, P.: Control of Aeration During Oxytetracycline Production. Kvas. prům. 28, 1981, No. 1, pp. 13—16.

During the cultivation of *Streptomyces rimosus* and oxytetracycline biosynthesis D.O.C. and OUR were determined. According to the rheological behaviour and values of D.O.C. a stepwise aeration program was applied in industrial scale. Significant savings of antifoams together with higher harvest of cultivation broth from fermenters were achieved. The consumption of sterile air for fermentation was reduced.

Ettler, P.: Regulation der Aeration im Verlauf der Produktion von Oxytetracyclin. Kvas. prům. 28, 1982, No. 1, S. 13—16.

Es wurden Angaben über den Sauerstoffverbrauch der Kultur *Streptomyces rimosus*, das rheologische Verhalten der Biosuspension und den Verlauf des Wertes des gelösten Sauerstoffs bei der Biosynthese des Oxytetracyklins in 15-m³-Fermentoren gewonnen. Es wurde ein reguliertes Belüftungsregime eingeführt, das dem Spiegelbild des Verlaufs des gelösten Sauerstoffs entspricht. Es wurde eine beträchtliche Einsparung der sterilen Luft erzielt, die den teuersten „Rohstoff“ bei dieser Fermentation darstellt; weiter wurde auch eine we-

sentliche Ersparnis der chemischen Antischaummittel realisiert. Die größere Menge des geernteten Bodens

hatte einen positiven Einfluß auf die Ausbeute der wirksamen Substanz aus dem Fermentor.