

Vybrané bioinženýrské přístupy studia biosyntézy penicilinu

Ing. PETR PILÁT, CSc., Ing. KAREL BEZDĚK, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Od zavedení průmyslové výroby penicilinů bylo nalezeno a postupně realizováno několik způsobů řízení produkčního procesu. Vycházely z vlastností a charakteru fermentace i jednotlivých produkčních mikroorganismů (*Penicillium chrysogenum*). Dokud byla jako zdroj uhlíku používána laktóza, nebylo nutno řešit problém spojený s inhibicí biosyntézy antibiotika katabolickou represí. Přechod k používání sacharózy nebo glukózy byl doprovázen urychlením fermentace, ale současně bylo nutno hledat takový typ vedení procesu, který by v maximálně dostupné míře omezoval především zmíněnou inhibici. Existuje též řada produkčních kmenů inhibovaných stejným mechanismem amonnými ionty. Zásadní změnu v technice vedení fermentací tohoto typu znamenalo objevení a optimalizace principu jednorázové přítokované kultury (fed batch). Vhodným postupným dávkováním např. sacharózy po celou dobu kultivace byla její aktuální hladina trvale udržována pod úrovní inhibice a současně tento způsob limitace procesu odkryl možnosti další optimalizace. Jedním z prvních způsobů aktivního řízení biosyntézy k dosažení vysokých výtěžků antibiotika bylo dávkování substrátů (zdroje uhlíku a dusíku, např. sacharóza a amoniak) podle aktuální hladiny pH a sušiny mycelia (častěji sedimentu) fermentační pudy (např. *Squires*, 1972). Ačkoliv je tento způsob kvalitativně závislý na složení fermentační pudy a na dané fázi fermentace (zvláště ve druhé polovině procesu vedl k nepřesnostem), byl pro svou jednoduchost a rychlost úspěšně používán. Později byly studovány a zaváděny další způsoby vedení fermentace, používané zvláště v kombinaci s již uvedeným přístupem. Jednalo se např. o sledování koncentrace oxidu uhličitého ve výstupním plynu z fermentoru (např. *Icygin et al.*, 1976), hladiny rozpuštěného kyslíku ve fermentační pudy (*Squires*, 1972, *Giona et al.*, 1976). Tyto způsoby jsou provozně i aparaturně náročnější, dávají však lepší a přehlednější informaci o průběhu procesu i když mají své nedostatky. Přístupem, který přinesl další vylepšení postupu řízení biosyntézy penicilinu, není však vhodné jej používat izolovaně, je bilanční metoda (*Ryu a Hospodka*, 1980). Další možnosti poskytuje systémové inženýrství (např. *Quicker et al.*, 1981; *Van Suijdam et al.*, 1982). Současný způsob řízení biosyntézy penicilinu představuje složitý systém kontinuálního nebo semikontinuálního dávkování několika substrátů. Jedná se o přítok zdrojů uhlíku, dusíku, fosforu a prekursoru příslušného penicilinu. Další přítoky a dávky jsou spojeny

např. s nutností odpěňovat fermentační pudy nebo fyzikologické úpravy pH a reprezentují další substráty. Je zřejmé, že objektivní optimalizace tohoto složitého systému při nalezení jednotné strategie řízení je vhodná pro použití výpočetní techniky. Podklady pro tuto optimalizaci vedení produkčního procesu jsou ve VÚAB postupně kompletovány od roku 1978. Metodicky byl jako studijní systém v první fázi používán semikontinuální proces (v režimu tzv. repeated fed batch). Tímto způsobem byly upřesněny a nalezeny některé základní parametry fermentace (např. optimální fermentační pH, teplota, kinetika vztahu mezi růstem, produkcí a spotřebou základních substrátů atd. — *Pilát*, 1978, 1979). Fermentační puda, s výjimkou prvních hodin procesu, představuje newtonskou kapalinu pseudoplastického charakteru. Míchání a přestup hmoty v newtonských kapalinách jsou velice složité děje, jejichž studium zvláště v případě biologických systémů je dosud v počátcích. Na prvním místě nutno uvažovat kultivace vláknitých mikroorganismů, protože reologické parametry pud se během růstu mění, zvláště tehdy, obsahuje-li puda suspenzní složky, v případě penicilinové fermentace především arašídovou nebo bavlníkovou mouku. Přesto jsou poměrně jednoduše dostupné některé údaje o reologickém chování fermentace, jež jsou m. j. dobře využitelné k popisu procesu. V průběhu je celkové reologické chování pudy ve stále vyšší míře ovlivňováno myceliem produkčního mikroorganismu. Během hlavní růstové fáze je růst nejintenzivnější, vlákna mycelia jsou dlouhá, intenzivně rozvětvená, možno pozorovat interakce mezi myceliem a částicemi mouky. Z reologického hlediska je možno tento úsek fermentace charakterizovat prudkým nárůstem zdánlivé viskozity fermentační pudy. V dalším průběhu nastává rychlé štěpení suspenzních částic pudy, hlavní podíl výživy kultury se přenáší do dávkovaných substrátů, rychlost růstu klesá. Zvládnutí této přechodové oblasti je klíčové pro další průběh biosyntézy. Při reologickém přístupu k vedení fermentace se v této fázi s rychle klesající růstovou rychlostí postupně zkracují vlákna kultury, snižuje se intenzita jejich větvení, zdánlivá viskozita fermentační pudy klesá. V dalším průběhu procesu je přítok jednotlivých substrátů řízen tak, aby reologické vlastnosti pudy zůstávaly na požadované úrovni. Podrobné studium reologického chování fermentace a srovnávání s dosavadním způsobem řízení biosyntézy penicilinu umožnilo postupný přechod k aktivnímu vedení procesu podle reologických parametrů fer-

mentační půdy a optimalizaci celého postupu. Průběh fermentace je sledován od počátku a dodržení optimálního průběhu křivky zdánlivé viskozity fermentační půdy řízením dávkování roztoků jednotlivých substrátů je dosaženo morfologické a biosyntetické stabilizace fermentace, vedoucí k významnému zvýšení výtěžků antibiotika a prodloužení procesu [Pilát *et al.*, 1983]. Biosyntetický proces a jeho řízení na úrovni současných znalostí představuje značně složitý systém, jehož další optimalizace klasickými přístupy již není zcela objektivně možná. Jak již bylo uvedeno, jedná se o řízení fermentace několika přítoky, z nichž některé mají nutriční význam, další prekurzory biosyntézy a zbylé fyziologicky regulují fermentační podmínky (odpěňování, úprava pH atd.). Fermentace je podél přítokovaného jednorázového procesu systémem s významně se měnícím pracovním objemem fermentoru doprovázeným několika odtahy, časový faktor stárnutí kultury a tím změny v distribuci dávkovaných živin nejsou též zanedbatelné. Kvalitativně vyšší úroveň optimalizace biosyntézy antibiotika včetně úspěšného převodu do provozního fermentačního měřítka je možno dosáhnout pouze s využitím výpočetní techniky a metod systémového inženýrství. Tímto způsobem byl prozatím popsán průběh fermentací pomocí bilancování přítoku a spotřeby základních živin (uhlík, amoniakální a organický dusík, fosfor, prekurzor). Do bilance fermentace jsou zahrnuty změny pracovního objemu fermentoru, ztráty odparem i vzorkováním, výpočty produkční i růstové rychlosti, základních konverzních i ekonomických koeficientů, charakterizujících detailně kinetiku produkčního procesu [Bezděk a Pilát, 1984]. Výpočetní program bude dále rozšířen v dostupné míře o výpočet specifických charakteristik. Pro výpočty je používán kalkulátor Hewlett Packard 85. Po dokončení hlubšího studia a rozboru kinetiky vlastní biosyntézy bude možno přistoupit k modelování produkčního procesu, jeho optimalizaci s využitím metod systémového inženýrství a popřípadě k řízení za použití výpočetní techniky.

Literatura

- [1] BEZDĚK K., PILÁT P.: Biotechnologie antibiotik, konf., Jáchymov, 12.—13. září 1984
- [2] GIONA A. R., DE SANTIS R., MARELLI L., TORO L.: Biotechnol. Bioeng. **18**, 1976, 493.
- [3] IČYGIN S. B., BIRJUKOV V. V., LURJE L. M.: Chim. farm. žur. **10**, 1976, 129.
- [4] PILÁT P.: 12th Int. Congr. Microbiol., Munich, Sept. 3—8, 1978, Abstr. Commun., p. 150.
- [5] PILÁT P.: Int. Symp. Antibiot., Weimar, Mai 14—18, 1979, Abstr. C12.
- [6] PILÁT P. *et al.*: PV 961—83, 1983.

- [7] QUICKER G., SCHUMPE A., KÖNIG B., DECKWER W. D.: Biotechnol. Bioeng. **21**, 1981, 635.
- [8] RYU D. D. Y., HOSPODKA J.: Biotechnol. Bioeng. **22**, 1980, 289.
- [9] SQUIRES R. W.: Dev. Ind. Microbiol. **13**, 1972, 128.
- [10] VAN SUJIDAM J. C., HOLLS H., KOSSEN N. W. F.: Biotechnol. Bioeng. **24**, 1982, 177.

Pilát P., Bezděk K.: Vybrané bioinženýrské přístupy studia biosyntézy penicilinu. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 9, s. 208—209.

Práce přehledně přibližuje některé metody studia a optimalizace biosyntézy penicilinu ve VÚAB. Ke sběru dat a postupnému zvyšování produkčních charakteristik byly a jsou využívány semikontinuální systém, studium a optimalizace reologických charakteristik procesu a bilancování za využití výpočetní techniky.

Пилат, П., Бездек, К.: Избранные биоинженерские подходы изучения биосинтеза пенициллина. Квас. прум. **30**, 1984, № 9, стр. 208—209.

Работа занимается некоторыми методами изучения и оптимизации биосинтеза пенициллина в Научно-исследовательском институте антибиотиков и биотрансформаций. Для получения данных и для постепенного повышения характеристик продукции используются полунепрерывная система, изучение и оптимизация реологических характеристик процесса и баланс с помощью вычислительной техники.

Pilát P., Bezděk K.: A Survey of Some Bioengineering Approaches to Study of Penicillin Biosynthesis. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 9, pp. 208—209.

This contribution discusses some methods of penicillin biosynthesis study and optimization applied in the Institute of Antibiotics and Biotransformations. The semicontinuous system [repeated fed batch], study and optimization of process rheology and computer balance are used for data sampling and increasing gradually production characteristics.

Pilát P., Bezděk K.: Die ausgewählte Zutritte des Studiums der Penicillinbiosynthese. Kvas. prům. **30**, 1984, No. 9, S. 208—209.

Der Artikel bringt die Zusammenfassung der Studien- und Optimierungsmethoden der Penicillinbiosynthese. Das halbkontinuierliche System, das Studium und die Optimierung der rheologischen Prozeßcharakteristik und die Bilanzen mittels der Rechenmaschine sind für das Sammeln der Angaben und die Erhöhung der Produktionsverträge verwendet.