

## Fermentácia cefalosporínu C — regulácia metabolizmu

Ing. JÁN RAKYTA, Ing. LADISLAV WELWARD, CSc.,

Ing. RUDOLF KOŠALKO, CSc., Výzkumný ústav liečiv Modra, pracovisko Slovenská Lupča

**Kľúčové slová:** limitujúci substrát, sacharidy, tuky, limitujúca koncentrácia rozpusteného  $O_2$ , optimálna koncentrácia rozpusteného  $O_2$ , cefalosporín C, dávkovanie substrátu

Cefalosporínové antibiotiká patria medzi najprogresívnejšie chemoterapeutiká súčasnosti. Základom pre výrobu značnej skupiny týchto antibiotík je biosyntetická príprava cefalosporínu C (ďalej CFS-C). Fermentácia CFS-C sa realizuje v praxi väčšinou pomocou vysokoprodukčných mutantov *Acremonium chrysogenum* na pôdach obsahujúcich zdroje uhlíka (sacharidy, tuky), zdroje organického a anorganického dusíka (proteínové múky, kukuričný extrakt, amonné soli), zdroje síry (D, L-metionín, sulfáty) a ďalšie minerálne soli (fosfáty, síran horečnatý, uhličitán vápenatý, stopové prvky).

Ako sme už uviedli, kmene *Acremonium chrysogenum* využívajú pre svoj rast a produkciu CFS-C ako zdroj uhlíka jednak sacharidy a jednak tuky. Huber a Tietz [1] porovnávali možnosti fermentácie CFS-C na pôde, kde hlavný uhľkatý substrát bol sacharid (glukóza) s pôdou, kde zdroj uhlíka bol zabezpečovaný tukmi (sojový olej, laird oil). V oboch prípadoch bol zdroj uhlíka použitý ako limitujúci substrát. Použitie tukov vo fermentácii CFS-C sa ukázalo operatívne lepšie a chod fermentácie bol stabilnejší ako pri použití dávkovanej glukózy. Tuky vo fermentácii CFS-C plnia zároveň úlohu odpeňovadiel.

Fermentácia cefalosporínu C patrí medzi aerobné fermentácie s vysokými nárokmi na aeráciu. Pre produkciu cefalosporínu C je nutné, aby v pôde bolo dostatočné množstvo kyslíka. Pri nízkych koncentráciách  $O_2$  v pôde (pod 5 mg/l) sa znižuje produkčná rýchlosť CFS-C a substráty sa neefektívne metabolizujú. Na obr. 1 vidieť porovnanie časového priebehu produkcie CFS-C pri fermentácii, ktorá bola limitovaná kyslíkom s fermentáciou, kde v produkčnej fáze bolo dostatočné množstvo rozpusteného kyslíka.

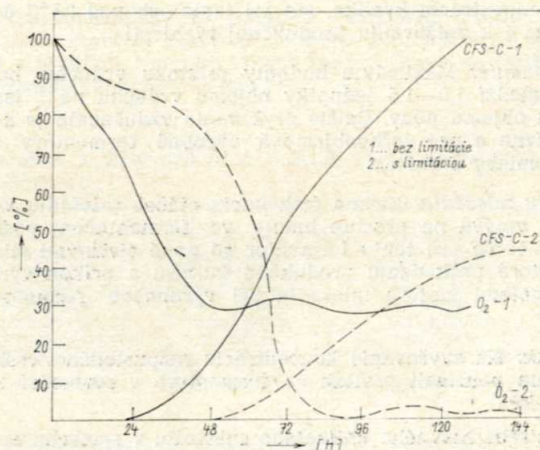
Naše pokusy sme robili s kultúrou *Acremonium chrysogenum* CCM F-750, ktorá utilizovala tuky ako hlavný uhľkatý substrát, zdroj dusíka bol zabezpečovaný kukuričným extraktom a amoniakálnym dusíkom a zdroj síry zabezpečovali v pôde sulfáty.

Na fermentačné pokusy sme používali 30 l laboratórny fermentor CHEMAP a 5000 l výrobné fermentory. Uvedené fermentory majú turbínové miešadlá so 6 rovnými lopatkami a deliacim kotúčom (ON 69 1021). Pomer priemeru fermentora k priemeru miešadla  $D/d = 3$ . Intenzitu miešania zvyšujú 4 radiálne narážky so šírkou  $b = D/10$ . V laboratórnom fermentore Chemap sú 4 turbíny uvedeného typu. Vo výrobnom fermentore je len 1 turbína podľa ON 69 1021 doplnená 2 miešadlami so 6 ohnutými lopatkami. Frekvencia otáčok miešadla v laboratórnom fermentore je meniteľná a pri fermentácii CFS-C

sme pracovali s frekvenciou otáčok 10–10,8 Hz. Vo výrobnom fermentore bola frekvencia otáčok konštantná 3,5 Hz.

Fermentory disponovali meraním a reguláciou teploty, meraním a reguláciou pH, meraním koncentrácie rozpusteného kyslíka a automatickým dávkovaním substrátov.

Požiadavky na aeráciu závisia okrem iných faktorov (napr. reologické vlastnosti pôdy) aj od použitého uhľkatého substrátu. Spotreba kyslíka je vyššia pri utilizácii



Obr. 1. Porovnanie produkcie cefalosporínu C v závislosti na koncentrácii rozpusteného  $O_2$

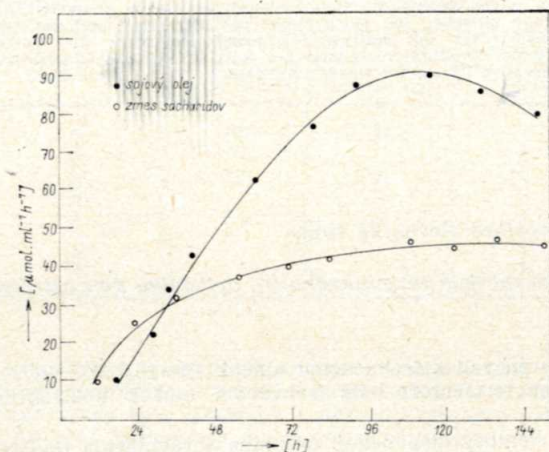
CFS — cefalosporín C v % max. koncentrácie, C<sub>2</sub> — v % sat. koncentrácie

tukov v porovnaní s utilizáciou sacharidov. Pre úplnú oxidáciu glukózy je  $RQ = 1,0$  a pre úplnú oxidáciu trioleinu  $RQ = 0,71$  [2]. Významný je tiež vplyv tukov na znižovanie hodnoty  $K_{La}$  [3].

Pri experimentálnom porovnaní bola spotreba kyslíka pri fermentácii cefalosporínu C s tukovým substrátom podstatne vyššia ako pri použití sacharidického substrátu (obr. 2). Spotreba kyslíka v priebehu fermentácie bola meraná manometrickou metódou.



Pre zabezpečenie dostatočného prestupu hmoty ako i optimálnej koncentrácie rozpusteného kyslíka v pôde sme predovšetkým využili technické možnosti daných fermentorov. Na priebeh fermentácie CFS-C mali význam tieto parametre: teplota, vzdušenie, otáčky miešadla, pretlak vo fermentore. Optimalizáciou uvedených parametrov pre fermentáciu CFS-C sme sa už zaoberali na našom pracovisku v minulosti [4, 5]. I keď uvedené parametre značne ovplyvňujú priebeh fermentácie cefalosporínu C, je ich použitie ohraničené a nedá sa nimi dostatočne zabezpečiť optimálna koncentrácia rozpusteného kyslíka v priebehu procesu.



Obr. 2. Časový priebeh rýchlosti spotreby  $O_2$  pri použití rôznych substrátov

**Teplota:** Používali sme rozdielnu teplotu pre rastovú a produkčnú fázu. Pre rastovú fázu  $28^\circ C$  a pre produkčnú fázu  $24-25^\circ C$ . Znižovaním teploty možno dosiahnuť vyššiu koncentráciu kyslíka, ale pri teplotách pod  $23^\circ C$  dochádza i k zníženiu produkčnej rýchlosti.

**Vzdušenie:** Maximálne hodnoty prietoku vzduchu boli v rozmedzí 1,0–1,5 jednotky objemu vzduchu na 1 jednotku objemu pôdy. Ďalšie zvyšovanie vzdušenia je neefektívne a pre veľkoobjemové výrobné fermentory aj ekonomicky nereálne.

**Otáčky miešadla:** Zmena frekvencie otáčok miešadla výrazne vplýva na prestup hmoty vo fermentačnej pôde. Ohraničenia pre tento fermentor sú dané strižnými silami, ktoré poškodzujú produkčnú kultúru a príkonovými možnosťami motora miešadla pri výrobných fermentoroch.

**Pretlak:** Na zvyšovanie koncentrácie rozpusteného kyslíka sme používali pretlak vo fermentore v rozmedzí 70 až 95 kPa.

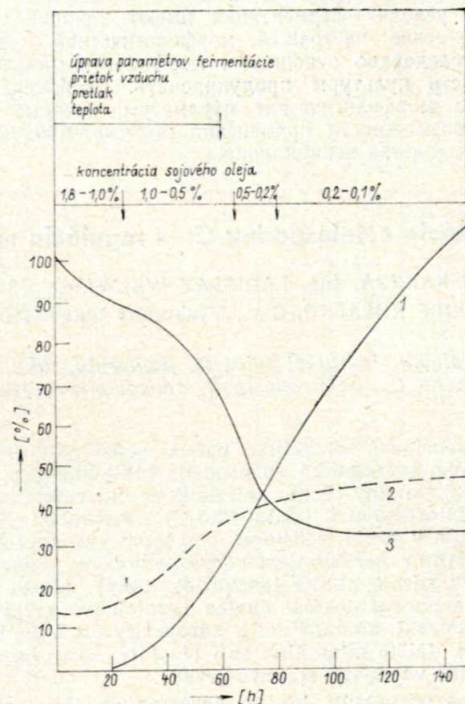
Spotreba hlavného uhlíkatého substrátu v priebehu fermentácie CFS-C je značná (10–15 % na objem fermentačnej pôdy) a pre optimálne vedenie procesu je nutné jeho rozdávkovanie.

Overovali sme režim dávkovania sojového oleja, ktorý bol regulovaný jeho koncentráciou. Na stanovenie koncentrácie oleja v pôde sme používali dve analytické metódy. Extrakčnú metódu, ktorá bola dostatočne presná, ale časovo náročná. Časový rozdiel medzi analytickým stanovením oleja a zmenou jeho dávkovania spôsoboval, že v priebehu fermentácie dochádzalo k takému zníženiu koncentrácie rozpusteného kyslíka v pôde, pri ktorej sa značne znížila produkčná rýchlosť CFS-C. Prítomná úprava substrátov pokračovala v nezmenenej miere za tvorby biomasy a vedľajších fermentačných produktov.

Druhú analytickú metódu, ktorú sme používali pri stanovení tukov, bola sedimentačná metóda. Časovo táto metóda bola nenáročná, ale nedostatočne presná a

ovplyvňovaná zmenami v charaktere pôdy. Pri poklese koncentrácie oleja pod 1 % prakticky bola nepoužiteľná.

Pri sledovaní fermentácie CFS-C sme zistili, že pri poklese koncentrácie tukov na hodnoty 0,1–0,2 % malé množstvá prídavku oleja (0,05–0,1 %) majú rýchlu odzvu v koncentrácii rozpusteného kyslíka v pôde. Preto sme sa rozhodli za parameter regulácie dávkovania sojového oleja zvoliť koncentráciu rozpusteného kyslíka.



Obr. 3. Priebeh regulácie fermentácie cefalosporínu C

1 — koncentrácia cefalosporínu C v % max. konc., 2 — sediment v %, 3 — koncentrácia rozpusteného  $C_2$  v % sat. koncentrácie

Priebeh takto regulovanej fermentácie CFS-C je znázornený na obr. 3. V prvej fáze fermentácie (do 60 h), ktorá je charakterizovaná rastom biomasy a nízkou produkčnou aktivitou sa robí postupná zmena parametrov, ktoré vplývajú na koncentráciu rozpusteného kyslíka v pôde (teplota, pretlak, vzdušenie a pri laboratórnom fermentore aj otáčky).

Koncentrácia oleja je kontrolovaná v tejto fáze analyticky (sedimentačnou i extrakčnou metódou). Dávkovanie oleja sa volí tak, aby koncentrácia oleja postupne klesala a pri 6 mg/l bola nižšia ako 0,5 %. V produkčnej fáze sa menila rýchlosť dávkovania oleja v rozmedzí  $0,5 \text{ kg/m}^3$ – $3,5 \text{ kg/m}^3$  pôdy v závislosti na koncentrácii rozpusteného kyslíka prestavovaním dávkovacieho režimu automatického dávkovača (výrobok dielní n. p. Biotika) obsluhou fermentora. Reálna je i možnosť priamej väzby dávkovača na kyslíkovú elektródu.

#### Literatúra

- [1] HUBER, F. M., TIETZ, A. J.: Defined media strategies for the biosynthesis of cephalosporin C. *Biotechnology Letters* 6, 1983, s. 385–390.
- [2] ŠÍCHO, V.: *Potravinářská biochemie* SNTL, Praha 1969 s. 325.
- [3] AIBA, S., HUMPHREY, A. E., MILLIS, N. F.: *Biotechnologie*, Praha 1972, s. 184–187.
- [4] RAKYTA, J., WELWARD, L.: Využitie merania spotreby a koncentrácie rozpusteného kyslíka v pôde pre riadenie fermentácie cefalosporínu C. III. sympóziu soc. krajín o biotechnológiach, Bratislava 1983.
- [5] LACKO, L., RAKYTA, J., WELWARD, L.: Využitie manometrických meraní pri optimalizácii fermentačných zariadení pre biosyntézu cefalosporínu C. 14. kongres Čs. spoločnosti mikrobiologickej pri ČSAV, Praha 1978.



Rakyta, J. - Welward, L. - Košalko, R.: Fermentácia celafosporínu C — regulácia metabolismu. Kvas. prům. 31, 1985, č. 7—8, s. 165—167.

Fermentácia CFS-C využívajúca tuky ako hlavný uhľikátý substrát má značné nároky na aeráciu. Koncentrácia rozpustného kyslíka v priebehu fermentácie je jedným z rozhodujúcich parametrov pre produkciu CFS-C.

Vypracovaný režim dávkovania sojového oleja v závislosti na koncentrácii rozpustného kyslíka v pôde umožňuje udržiavanie optimálnej koncentrácie kyslíka v priebehu celej fermentácie CFS-C pri dostatočnom saturovaní kultúry uhľikátym substrátom a dobrých výťažkoch CFS-C.

Ракита, Я. — Велвард, Л. — Кошалко, Р.: Ферментация *cefalosporinu C* — регуляция метаболизма. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 165—167.

Ферментация цефалоспорино C используемая жиры как главный углеродный субстрат имеет значительные претензии на аэрацию. Концентрация растворимого кислорода в течение ферментации является одним из самых важнейших параметров для продукции цефалоспорино C.

Разработанный режим дозирования соевого масла в зависимости от концентрации растворимого кислорода в среде позволяет удерживание оптимальной концен-

трации  $O_2$  в течение ферментации цефалоспорино C при достаточной сатурации культуры углеродным субстратом и хороших выходов цефалоспорино C.

Rakyta, J. - Welward, L. - Košalko, R.: Cefalosporin C Fermentation — Metbolism Control, Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 165—167.

The process of cephalosporin C fermentation where fats are utilized as a main source of carbon is needs very enough aeration.

The concentration of dissolved oxygen is one of the principal parameters for cephalosporin C production. There was developed a scheme for soya fat dosing in relation with the concentration of dissolved oxygen in the fermentation broth which enables the maintenance of an optimal concentration of  $O_2$  during the whole time of fermentation in the conditions of satisfactory saturation of the culture with carbon sources and a good CFS-C yield.

Rakyta, J. - Welward, L. - Košalko, R.: Fermentation des C-Cephalosporins — Regulation des Metabolismus. Kvas. prům. 31, 1975, Nr. 7—8, S. 165—167.

In der Cephalosporin C Fermentation in welcher Fett als die Hauptquelle des Kohlenstoffsubstrat ausnützt, eine genügende Aeration wird gefordert. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffes ist einer des wichtigsten Parameter, die Produktion von Cephalosporin C beeinflussen können.

Das ausgearbeitete Regim für Soyafett-Dosierung in Zusammenhang mit der Konzentration des gelösten Sauerstoffes macht die Unterhaltung der optimalen Konzentration des  $O_2$  im Dauer der ganzen Fermentation des CFS-C bei genügender Saturaion der Kultur mit Kohlenstoffsubstrat und guten CFS-C Ausbeuten möglich.