

# Vliv bioinženýrských parametrů na tvorbu sekundárních metabolitů

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

Príspevek prednesený na bioinženýrském minisymposiu v rámci 14. výročního sjezdu Čs. společnosti mikrobiologické, Praha 1978.

Tento příspěvek má upozornit na vzájemnou vazbu mezi biochemickými, mikrobiologickými a inženýrskými aspekty provozování fermentačních výrob s vědomím, že odlišování primárních a sekundárních metabolitů je určitým antropomorfismem. Za sekundární metabolity budou považovány mikrobiální produkty buňky, syntézované v nadbytku a nemající zřetelnou úlohu v jejich základním metabolismu. Jedná se v neposlední řadě o antibiotika.

Specifičnost těchto biosyntéz lze spatřovat v několika oblastech, které mají dopad na možnosti regulovat procesy:

- dělení buněk a tvorba produktu probíhají velmi často v oddělených fázích,
- komplexnost médií neumožňuje přímé sledování růstu,
- rychlost růstu producentů antibiotik (většinou mycelárních mikroorganismů) neumožňuje rychlé odpovědi kultury na změny prostředí,
- problémy s přenosem hmoty, tepla a energie,
- monitorování analytických parametrů a množství produktu může být jen stěží prováděno on-line,
- formulace řídicích reakcí procesu je díky nedostačným znalostem mechanismů biosyntézy nesnadná.

## 1. Vztah růstu mycelárních mikroorganismů — producentů antibiotik — k inženýrským parametrům

Mycelární hyfy producentů antibiotik vystavené mechanickému namáhání mají délku 50 až 500  $\mu\text{m}$ , a průměr 2 až 10  $\mu\text{m}$ . Životní cyklus mycelárních mikroorganismů a jeho regulace je souhrnně pojednán v práci *Betiny* [1]. Zdánlivá viskozita média s obsahem 100 až 250  $\text{kg}/\text{m}^3$  vlhké biomasy mycelárních forem buněk [2] může dosahovat 0,1 Pa.s. Morfologie mycelárního vlákna je kromě inženýrských parametrů determinována geneticky, dále složením média, pH média [při pH 6,0 popisuje *Pirt* a *Callow* [3] u *Pen. chrysogenum* dlouhé vlákno, při pH 7,4 zkrácení vlákna] a koncentrací  $\text{CO}_2$  v aeračním plynu desetinásobné prodloužení lag-fáze růstu *Pen. chrysogenum* při 1% koncentraci  $\text{CO}_2$ , neovlivnění růstu *Str. erythreus* při obohacení vstupního plynu o 11 %  $\text{CO}_2$ , ale 40 % inhibice produkce erythromycinu [4].

Partikule mycelia mají v míchaném systému tendenci tvořit aglomeráty v závislosti na velikosti inokulace, obsahu povrchově aktivních látek, pevných partikulí a míchání [5]. Peletizace je většinou nevídaný jev fermentací antibiotik vedoucí k nehomogennímu růstu a zhoršenému přestupu kyslíku a živin k rostoucím buňkám producentů antibiotik, na rozdíl od fermentací kyseliny giberelové, itakonové, D-manitolu apod. U *Pen. chrysogenum* [10] je uváděna možnost vzniku pelety nekoagulujícího typu, když z jedné spory se formuje jedna peleta. Pro kvantifikaci růstu plísni vyvinul *Metz* [7]

metodiku zahrnující měření délky hlavní hyfy, celkové délky hyfy v partikuli, jednotku růstu hyfy v partikuli a bezrozměrnou délku hyfy. Tímto způsobem může být sledováno ovlivnění morfologie mycelia inženýrskými podmínkami kultivací. *Tanaka* a *et al.* [8] sledovali 18 kmenů vláknitých mikroorganismů včetně *Penicillia* a *Streptomyces* z hlediska uvolňování intracelulárních nukleotidů a formulovali index R reprezentující tloušťku mycelárního vlákna nutnou k udržení fyziologické aktivity při mechanickém namáhání. *Martin* a *Mc Daniel* [9] formulují „dobu zralosti“ buněk —  $t_m$  *Streptomyces viridoflavus* při fermentaci kandicinu jako časovou prodlevu mezi vytvořením nové buňky a startem produkce. Rychlost tvorby polyenních antibiotik je proporcionální rychlosti růstu v  $t_m$ . Kratší  $t_m$  indikuje dřívější derepresi sekundárního metabolismu. Podle autorů hodnoty  $K_p$  (rychlost tvorby produktu/g suché váhy/h) a  $t_m$  mohou být použity pro předpověď koncentrace makrolidního antibiotika, pokud budou do formulace modelu zahrnuty údaje pro přestup hmoty.

*Christner* [10] při optimalizaci specifické rychlosti tvorby produktu  $K_p$  konstatuje, že nejvyšších hodnot ( $K_p = 1,0\text{--}21,0$ ) je dosahováno u syntéz, na kterých se podílí jen malé množství enzymů v blízkosti glykolytické dráhy a pro jejichž biosyntézu je třeba 9–20 enzymů majících  $K_p = 0,15\text{--}1,0$ , ( $K_p$  *Pen. chrysogenum* BC 351 =  $3,0 \cdot 10^{-3}$ , *Str. griseus*  $3,3 \cdot 10^{-3}$ , *Str. rimosus*  $1,0 \cdot 10^{-2}$ , *Str. aureofaciens*  $2,0 \cdot 10^{-2}$ .) Při fenotypické optimalizaci nemůže být geneticky determinovaná  $K_p$  překročena, avšak je korelována se speciální rychlostí spotřeby substrátu, v němž lze spatřovat i možnosti ovlivnění v bioinženýrském pohledu.

## 2. Hydrodynamické chování mycelárních suspenzí

Charakter tokových vlastností při fermentacích antibiotik je primárně určen geometrií systému, ale reologické vlastnosti mycelárních púd jsou za standardního uspořádání regulovány koncentrací buněk a fyziologickým stavem mycelia. *Metz* [7] uvádí, že viskozita mycelární suspenze je ovlivněna kromě již uvedených vlivů i poměrem délka/tloušťka hyfy a její flexibilitou. Již při stanovení reologických vlastností se musíme vyrovnat s takovými problémy jako je sedimentace, separace fází, nehomogenita vzorků z různých míst nádob apod. Reologické chování je většinou newtonské, vedoucí k relativně nízkým viskozitám v oblastech vysokých gradientů rychlostí v blízkosti míchadla (odstředivý efekt — „channeling“) a vysokým viskozitám v oblastech nižších gradientů rychlostí u stěny [11]. Rychlostní gradient míchadla souvisí nejen s homogenitou vsádky, přenosem kyslíku (efektivní přestup  $\text{O}_2$  jen v zóně míchadla, dále koalescence), ale s působením těchto fyzikálních parametrů na rostoucí buňky. Je popsán dvojitý druh poškození [12], související s mechanickým poškozením hyfy a narušením metabolismu, enzymatických aktivit a produkce. Jednotný reologický model pro



všechny mycelární suspenze není možno nalézt. Newtonské chování při fermentaci *Str. niveus* je popisováno mocninovým zákonem, u *P. chrysogenum* a *Str. griseus* Binghamským modelem, u *P. chrysogenum* Cassonovým modelem. Newtonské chování je popisováno při fermentacích *Str. noursei* [12].

Při zjišťování možností ovlivnění těchto nepříznivých viskozitních poměrů z hlediska přestupu hmoty, tepla a energie se nabízí několik řešení:

- vypracovat optimální teplotní režim vedení fermentace. Tento teplotní režim z pohledu viskozity však nemusí být optimálním z hlediska růstu produkčního mikroorganismu a produkce vlastní. Protože jak složení média, tak teplotní režim je většinou přísně vybalancován, je praktická možnost aplikace tohoto způsobu minimální;

- regulace tlaku; zvýšením přetlaku ve fermentoru se podle Henryho zákona zvýší rozpustnost  $O_2$ , ale také  $CO_2$ ;

- „dilution method“ uváděná Charlesem [13] spočívající v naředění obsahu fermentoru sterilní vodou nebo roztokem živin v určitém období, aby nebyla ohrožena produktivita procesu;

- šlechtění produkčního kmene, aby fyzikálně chemické vlastnosti kultury byly odlišné od mateřského kmene [14];

- provozování příkrmových technologií, změny ve složení média (podle  $pO_2$ ,  $D.O.C.$ , respirace kultury, pH);

- přísady nízkomolekulárních povrchově aktivních látek [15] (adsorpce vzduchových bublin na tyto povrchově aktivní látky, snížení koalescence a zlepšení přenosu kyslíku).

### 3. Vliv dodávky kyslíku na biosyntézu antibiotik

Hydrodynamické podmínky chování mycelární suspenze ve fermentoru nelze oddělovat od podmínek aerace [16]. Tvorba, tvar a dynamika pohybu bublin je ovlivněna především měrnou hmotností, viskozitou a povrchovým napětím. Biologicko-inženýrský problém zajištění plně aerobiózy při fermentacích antibiotik je snaha exponovat největší možný povrch bubliny k difúzi, tj. snížit velikost bublin zvýšením poměru povrch/objem a zajistit nejdelší její možnou dráhu ve fermentoru [17]. Intenzifikace biosyntézy antibiotik vysokoprodukčními kmeny mikroorganismů a médií a vysokými koncentracemi substrátů souvisí při intenzivní aeraci s problematikou pěnění [16]. Hodnoty  $K_{La}$  pro danou plynovou zádrž jsou menší pro zvyšující se koncentraci povrchově aktivní látky, používané k odpěnění, indukující zvýšení mezifázového rozhraní pro přenos hmoty a změnu  $P/V$ . Zhorší se dispergace plynu a vyskytují se bubliny všech velikostí [18]. Příspěvek velmi jemných bublin přenosu hmoty je velmi zanedbatelný pro malou vzestupnou rychlost a dlouhou dobu zdržení.

Ze schopnosti a snadnosti tvorby pěny a z její stability se vypočítává stupeň odpěnění [19].

Kromě složení a podmínek přípravy média mají na pěnovost médií vliv teplota kultivace, rozdíl teplot mezi plynou a kapalnou fází, sterilace, množství vneseného inokulačního materiálu a pH [20]. Povrchové napětí, kapilarita a napětí mezní hodnoty jsou určujícími faktory potlačování tvorby pěny.

Hodnota objemového koeficientu přestupu kyslíku —  $K_{La}$  — je důležitým parametrem pro srovnání účinnosti aeračních systémů. Míchání má příznivý účinek na rychlost přestupu následkem zvýšení  $K_{La}$  jemnějším rozptýlením vzduchu a zvýšením plochy mezifázového rozhraní —  $a$ , zvýšením turbulence a zvýšením  $K_L$ , jakož i prodloužením doby zdržení bublin v kapalně fázi. Zá-

vislost frekvence otáčení míchadla a zdánlivé viskozity tvoří klíčový vztah při fermentacích antibiotik, z něhož je možno odhadnout nejen účinnost homogenizace suspenze, ale i přenos hmoty a velmi často i výtěžek antibiotika [21].

Velikost aerace ovlivňuje hodnotu  $K_{La}$  až do kritické hodnoty odpovídající zahlcení míchadla. Hodnota  $K_{La}$  v určitém rozmezí závisí na velikosti bublin [22], ale je ovlivněna přítomností povrchově aktivních látek a mikroorganismů. *Jarai* [23] popisuje při fermentacích nystatinu a fumagillinu trvalý pokles hodnoty  $K_{La}$  v důsledku zvýšení viskozity média. Tato skutečnost je potvrzena v řadě prací [24, 25] i pro ostatní antibiotika. Z rovnice pro přestup kyslíku [22] vyplývá, že přestup kyslíku je maximální při nulové  $D.O.C.$  v kapalině. Při fermentacích antibiotik by to znamenalo pracovat v limitu kyslíku, pod kritickou koncentrací kyslíku pro daný produkční mikroorganismus. Hnací sílu přestupu lze zvýšit aerací vzduchem obohaceným kyslíkem nebo zvýšením tlaku při fermentaci, která je odrazem hydrodynamického chování vsádky a fyziologického stavu kultury. Hladina rozpuštěného kyslíku je odlišná jak pro jednotlivé fermentace antibiotik, tak různá stadia fermentačního procesu. *Jarai* [23] uvádí pokles  $D.O.C.$  při fermentaci fumagillinu a nystatinu mezi 24 až 48 h, *Virgilio a kol.* [26] kritický čas fermentace rifamycinu mezi 50 a 80 h.

Intenzivní aerace souvisí s ventilací  $CO_2$ . Výpočet pro  $K_{La} CO_2$  je obdobný jako pro  $O_2$  s rozdílností v difuzivitě plynů. Málo je známo o mechanismu, kterým  $CO_2$  prochází membránou buňky. Předpokládá se, že je to prostá difúze [27]. *Birjukov* [28] popisuje vazbu  $pCO_2$  a ovlivnění respirace kultury *P. chrysogenum* a *Str. erythreus*.

Regulace  $pCO_2$  při fermentacích antibiotik (podobně jako  $pO_2$ ) může být prováděna regulací  $RPM$ ,  $VVM$  nebo přetlakem. Přímá vazba mezi  $pCO_2$  v kapalině a  $CO_2$  ve výskytu plynů nebyla popsána.

### 4. Design fermentorů pro biosyntézu antibiotik

Klasifikace fermentorů pro biosyntézu antibiotik se v zásadě opírá o zajištění homogenity obsahu fermentorů se zřetelem na axiální a radiální složky míchání. Pro fermentace antibiotik je většinou používán klasický mechanicky míchaný typ fermentoru s narážkami, mnohonásobné míchadlo na jedné ose, Rushtonova konfigurace podle Chepos ON 69 1021, 69 1022, 69 1024, 69 1027. Vzhledem k velkým provozním rizikům je v celém světě dávana přednost standardní konfiguraci před jakýmkoliv experimentováním. Bohužel platí raději know-how než know-why [29]. Je popisována konfliktnost řady požadavků na design fermentorů: zajištění vysokého přenosu hmoty na mezifázovém rozhraní kapalina—plyn, ale bez problému pěnění, s dostatečnou zádrží, ale při nízkém  $P/V$ . Zabránit mrtvým zónám ve fermentoru, ale nepoškodit mycelium a zachovat levný a robustní design. Mechanické míchání má ústřední důležitost při fermentacích antibiotik. Odpověď na zvyšování frekvence otáčení míchadla při biosyntézách antibiotik je v prvé řadě založena na ekonomické rozvaze.

Výsledky z pokusů se *Streptomyces* indikují [21], že řídicím parametrem řady fermentací je vztah mezi homogenitou a stříhovým namáháním. Naše zkušenosti jednoznačně ukazují, že výstavba dokonalejších fermentačních procesů a biotechnologií vyžaduje systémový přístup a syntézu jak mikrobiologických, biochemických, tak i inženýrských znalostí.

### Literatura

- [1] BETINA, V.: Biol. listy 42, 1977, s. 1
- [2] BLANCH, H. W., Bhavaraju, S. M.: Biotechnol. Bioeng. 18, 1976, s. 745



- [3] PIRT, S. J., CALLOW, P. S.: Nature **184**, 1959, s. 307  
 [4] NASH, C. H.: Antimicrob. Chemother. **5**, 1974, s. 544  
 [5] MIURA, Y., MIYAMOTO, K.: J. of Chem. Eng. of Japan **8**, 1975, s. 300  
 [6] METZ, B., KOSSEN, N. W. F.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 781  
 [7] METZ, B.: Doktorská práce, Delft 1976  
 [8] TANAKA, H. A. KOL.: Ferm. Technol. **53**, 1975, s. 18  
 [9] MARTIN, J. F., Mc DANIEL, L. E.: Biotechnol. Bioeng. **17**, 1975, s. 925  
 [10] CHRISTNER, A.: Z. für Allg. Microb. **16**, 1976, s. 157  
 [11] TAGUCHI, H. A. KOL.: J. FERM. Technol. **46**, 1968, s. 814  
 [12] BLANCH, H. W., BHAVARAJU, S. M.: Biotechnol. Bioeng. **18**, 1976, s. 745  
 [13] CHARLES, M.: Adv. in Biochem. Eng. **8**, 1978, s. 1  
 [14] KÜENZI, M. T.: FEMS Symposium 1977  
 [15] ROBINSON, C. W., WILKE, Ch. R.: Biotechnol. Bioeng. **15**, 1973, s. 755  
 [16] SOIFER, R. D., GORSKAJA, S. V., IVANKOVA, T. A.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No 4, 1974, s. 755  
 [17] YAGI, H., YOSHIDA, F.: Ferm. Technol. **52**, 1974, s. 905  
 [18] VIJESTUR, U. E., KRISTAPSONS, M. Ž.: Obzor, 1973, s. 12  
 [19] GADEN, E. L., KEVORKIJAN, V.: Chem. Eng. **10**, 1956, s. 173  
 [20] GORSKAJA, S. V.: Chem. farm. Ž. **6**, 1956, s. 55  
 [21] FEWKES, R. C. J., WANG, D. I. C.: Proc. V. IFS Berlin 1976, s. 77  
 [22] SOBOTKA, M.: Kandidátská disertační práce, MBÚ ČSAV, 1975  
 [23] JARAI, M.: Proc. IV. IFS: Ferment. Technol. Today, Kyoto, 1972, s. 97  
 [24] DEINDOERFER, F. H., GADEN, E. L.: Appl. Microbiol. **3**, 1955, s. 253  
 [25] BYLINKINA, E. S., BIRJUKOV, V. V.: Proc. IV. IFS: Ferment. Technol. Today, Kyoto, 1972, s. 105  
 [26] VIRGILIO, A. A. KOL.: Biotechnol. Bioeng. **6**, 1964, s. 271  
 [27] YAGI, H., YOSHIDA, F.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 801  
 [28] BIRJUKOV, V. V., ICYGIN, S. B.: Chim. form. ž., **10**, 1976, s. 122  
 [22] KATINGER, H. W. D.: FEMS Symposium No 4, Ed. Meyrath Bullock Academic Press, 1977, s. 137

#### Použité symboly

- $K_L a$  objemový koeficient přestupu kyslíku [ $h^{-1}$ ]  
 $t_m$  maturation time — tzv. doba zralosti buněk,  
 $K_p$  specifická rychlost tvorby produktu [g produktu/g biomasy · h]  
 $pCO_2$  parciální tlak kyslíčnicku uhličitého v plynné fázi ve fermentoru  
 $pO_2$  parciální tlak kyslíku v plynné fázi ve fermentoru,  
 $P/V$  jednotkový příkon [ $kw \cdot m^{-3}$ ],  
 $D. O. C.$  koncentrace rozpuštěného kyslíku [ $mg \cdot l^{-1}$ ]  
 $RPM$  frekvence otáčení míchadla [ $min^{-1}$ ],  
 $v \cdot g$  objemový průtok aeračního vzduchu vztažený k pracovnímu objemu fermentoru [ $l \cdot min^{-1}$ ]

**Ettler P.: Vliv bioinženýrských parametrů na tvorbu sekundárních metabolitů.** Kvas. prům., **25**, 1979, č. 5, s. 105—111.

Nepřímá vazba růstu mycelárních mikroorganismů — producentů antibiotik výrazně odlišuje průmyslové fermentace antibiotik od ostatních biotechnologií. V příspěvku jsou hodnoceny otázky růstu, hydrodynamického chování mycelárních suspenzí, vliv dodávky kyslíku a geometrie nádoby a míchadel na tvorbu sekundárních metabolitů.

**Этлер, П.: Влияние биоинженерских параметров процесса на образование вторичных продуктов обмена веществ.** Квас. прум. **25**, 1979, № 5, стр. 105—111.

Условия, какие должны быть созданы в установках производящих антибиотики для обеспечения размножения мицеларных микроорганизмов создающих антибиотики, значительно отличаются от условий типичных для других бродильных процессов. В статье рассматриваются проблемы роста микроорганизмов, гидродинамических свойств мицеларных суспензий влияния добавки кислорода, геометрии ферментов и формы мешалок на образование вторичных продуктов обмена веществ.

**Ettler P.: Effects of Bioengineering Factors Upon the Formation of Secondary Metabolic Products.** Kvas. prům. **25**, 1979, No. 5, pp. 105—111.

Conditions which must be created in industrial fermentation plants to ensure cultivation of mycelial microorganisms producing antibiotics differ substantially from those typical for conventional fermentation processes. The article deals with the growth of mycelial suspensions, their hydrodynamic behaviour and with the effects of oxygen supply as well as design of fermenters and agitators upon the formation of secondary metabolic products.

**Ettler P.: Einfluß der biotechnischen Parameter auf die Bildung der sekundären Metabolite.** Kvas. prům. **25**, 1979, No. 5, S. 105—111.

Die indirekte Bindung des Wachstums der myzelaren Mikroorganismen — Produzenten der Antibiotika — unterscheidet die industrielle Antibiotika-Fermentationen von den übrigen Biotechnologien. In dem Beitrag werden die Probleme des Wachstums, des hydrodynamischen Verhaltens der myzelaren Suspensionen, der Einfluß der Sauerstoffzufuhr und der Geometrie der Gefäße auf die Bildung der sekundären Metabolite erörtert.