

Sterylizacja ciągła podłoża do biosyntezy bacytracyny

Urszula Cywińska¹

Jan Iciek²

Aleksander Chmiel³

Paweł Stolarek¹

1. Wprowadzenie

Sterylizacja roztworów i zawiesin może być realizowana w sposób okresowy lub ciągły. W krajach stosujących technologie o wysokim poziomie technicznym różne media sterylizowane są metodą ciągłą (1, 2). Od dawna prowadzi się też prace nad ciągłą sterylizacją brzeczek fermentacyjnych (3, 4).

Sterylizacji podłoży wymagają liczne technologie przemysłu spożywczego i farmaceutycznego, w których wynik procesu fermentacyjnego zależy m.in. od wyeliminowania potencjalnych zakażeń obcą mikroflorą. Należy tu np. biosynteza antybiotyków, aminokwasów, kwasów organicznych, dekstranu, enzymów itp. oraz procesy biotransformacji — np. związków steroidowych. Są to technologie od lat stosowane w polskim przemyśle biotechnologicznym. Ich usprawnienie przez zastosowanie techniki sterylizacji ciągłej może przynieść znaczne efekty ekonomiczne, na co składa się zarówno niższy koszt procesu sterylizacji, jak i poprawa jakości sterylizowanego podłoża.

Zastosowanie ciągłej sterylizacji termicznej — w porównaniu do okresowej — pozwala na (5):

- efektywniejsze wykorzystanie surowców (dzięki mniejszemu ich uszkodzeniu w wyniku obróbki termicznej),
- zwiększenie zdolności produkcyjnej instalacji (krótszy okres sterylizacji, a także czas cyklu technologicznego),
- około czterokrotne zmniejszenie zużycia energii cieplnej i wody chłodzącej,
- możliwość stosowania fermentorów (bioreaktorów) ciągłych.

Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne „Polfar” są jedynym w kraju i jednym z nielicznych w Europie (obok RFN i Jugosławii) producentem bacytracyny. W Pabianickiej „Polfie” podłoża do biosyntezy antybiotyku jest dotychczas sterylizowane okresowo w temperaturze $120 + 121^{\circ}\text{C}$ przez 0,5 h. W RFN i Ju-

¹ Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska PŁ

² Instytut Chemicznej Technologii Żywności PŁ

³ Instytut Technologii i Chemii Leków AM w Łodzi

gosławii podłoże do biosyntezy bacytracyny jest sterylizowane w sposób ciągły (w przepływie).

Celem pracy była ocena przydatności procesu sterylizacji ciągłej podłoża do usprawnienia technologii produkcji bacytracyny. Wykonano badania rozpoznawcze i określono efekty zastosowania ciągłej sterylizacji termicznej podłoża. Jakość wysterylizowanego podłoża oceniano w testach fermentacyjnych. Procesy biosyntezy bacytracyny prowadzono w podłożu sterylizowanym metodą zarówno okresową jak i ciągłą. W badaniach laboratoryjnych użycie podłoża wysterylizowanego metodą ciągłą pozwoliło uzyskać wydajność antybiotyku średnio o 30 % wyższą niż w podłożu sterylizowanym w sposób okresowy. W porównaniu z procesem w skali przemysłowej, w którym użyte było podłoże wysterylizowane metodą okresową, dla tego samego materiału posiewowego wydajność była wyższa nawet o 80 %.

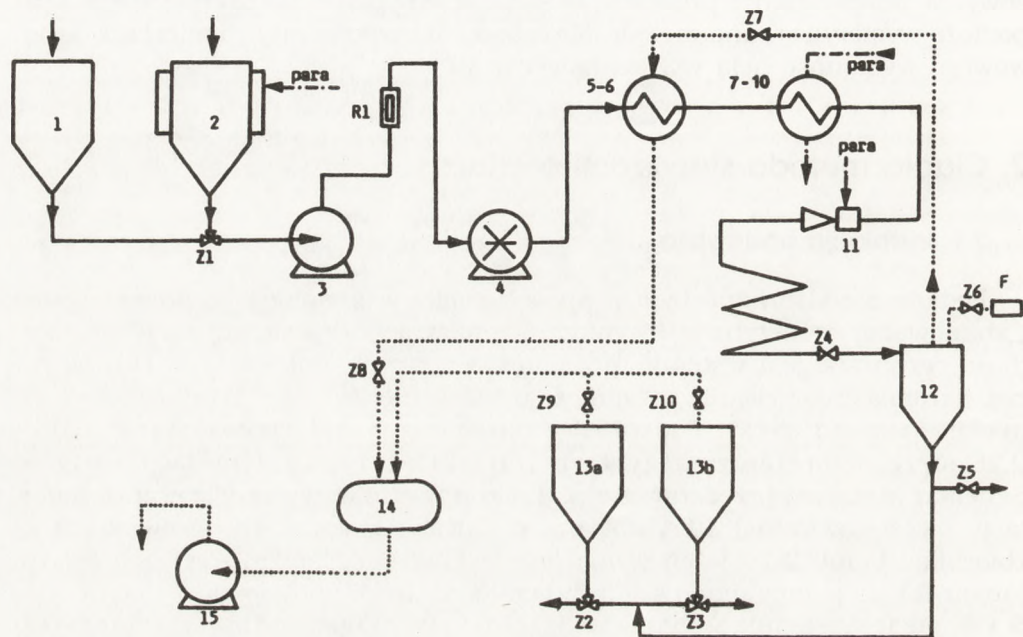
2. Ciągła metoda sterylizacji podłoża

2.1. Instalacja badawcza

Podłoże sterylizowane było w sposób ciągły w instalacji zaprojektowanej i zbudowanej w Instytucie Inżynierii Chemicznej i Procesowej PŁ (6, 7). Medium ogrzewane jest wstępnie przeponowo w wymiennikach typu rura w rurze, natomiast ogrzewanie zasadnicze uzyskiwane jest bezprzeponowo metodą iniekcji pary do cieczy. Podstawowe parametry instalacji: wydajność $0,05 \div 0,25 \text{ m}^3/\text{h}$, temperatura sterylizacji $130 \div 145^\circ\text{C}$ i czas sterylizacji $5 \div 25 \text{ s}$. Schemat instalacji przedstawia rys. 1. Po uprzednim wysterylizowaniu instalacji, ciecz (zawiesina) sterylizowana podawana jest pompą wirnikową **3** ze zbiornika **1** (lub **2** — jeżeli wymagane jest wstępne podgrzanie) poprzez rotametrami **R1** do pompy mono **4**, która przetłacza medium dalej do wymienników **5** i **6**, gdzie następuje wstępne podgrzanie cieczy oparami z rozprężacza **12**. Dalsze podgrzanie (parą technologiczną) następuje w wymiennikach **7** i **10**, skąd ciecz przepływa do wtryskiwacza pary **11**, gdzie w wyniku bezprzeponowego kontaktu z parą ogrzewa się do temperatury sterylizacji. Zasadnicza sterylizacja następuje w przetrzymywaczu — na odcinku przewodu między wtryskiwaczem **11** i zaworem **Z4**. Z przetrzymywacza przez zawór **Z4** medium kierowane jest do rozprężacza, gdzie schładza się przez samoodparowanie. Wysterylizowana ciecz/zawiesina jest gromadzona w odbieralnikach **13a** i **13b**; opary są zawracane i służą jako czynnik grzejny w wymiennikach **5** i **6**. Aseptyczny zawór **Z5** umożliwia pobieranie próbek do analizy. Pompa próżniowa **15** zapewnia podciśnienie w układzie, a zbiornik kompensacyjny **14** zapobiega wahaniom ciśnienia. Temperatura sterylizacji uzyskiwana była poprzez zmianę ciśnienia pary dostarczanej do wtryskiwacza, czas sterylizacji regulowany był wydajnością instalacji i gabarytami przetrzymywacza. Zawory **Z7** i **Z8** służą do regulacji wartości podciśnienia w wymiennikach **5** i **6**. Dodatkowo zawór **Z7** służy do regulacji podciśnienia w rozprężaczu **12**. Za-

wory **Z9** i **Z10** służą do regulacji poziomu cieczy w rozprężaczu **12**, a także do regulacji podciśnienia w zbiornikach **13a** i **13b**.

W badaniach nad sterylizacją ciągłą podłoża do produkcji bacytracyny, z uwagi na specyficzne właściwości medium (gęsta i lepka zawiesina), wymieniono zawór **Z4** na zawór o większej średnicy wewnętrznej, w zbiorniku **2** zamontowano mieszadło o regulowanej liczbie obrotów, aby zapobiec sedymentacji cząstek zawiesiny oraz ograniczono zakres objętościowego natężenia przepływu do 150 ± 240 l/h, a tym samym również czas sterylizacji (5 ± 8 s). Poniżej tego zakresu niestabilna praca pompy uniemożliwia ustalenie prawidłowych warunków sterylizacji podłoża.



Rys. 1. Instalacja do ciągłej sterylizacji termicznej cieczy i zawiesin: **1** - zbiornik zalewowy, **2** - zbiornik zalewowy z płaszczem grzejnym, **3** - pompa wirnikowa, **4** - pompa mono, **5 + 10** - wymienniki ciepła, **11** - wtryskiwacz pary, **12** - rozprężacz, **13a,b** - odbieralniki, **14** - kompensacyjny zbiornik próżniowy, **15** - pompa próżniowa z pierścieniem wodnym, **R1** - rotametr, **Z1 + Z10** - zawory, **F** - filtr powietrza.

2.2. Materiał

Materiał badany stanowiła pożywka produkcyjna dla biosyntezy bacytracyny przygotowana wg receptury podanej przez PZF „Polfa” w Pabianicach. W skład pożywki wchodziła mąka sojowa (frakcja zawierająca cząstki poniżej 0,5 mm), mąka kukurydziana, węglan wapnia strącony oraz siarczan sodowy. Dodatek środka przeciw pianowego uzależniony był od wskazań PZF „Polfa”. Zawartość suchej substancji zmieniano w granicach od 5 do 12%.

2.3. Badanie skuteczności sterylizacji

W badaniach skuteczności sterylizacji chodziło o ustalenie, czy ciągła obróbka termiczna w instalacji doświadczalnej pozwala uzyskać sterylne podłoże oraz czy nie ma zakażeń wtórnych. Do określenia skuteczności sterylizacji zastosowano metodę bezpośredniej analizy czystości mikrobiologicznej badanego medium przed i po procesie sterylizacji. Badania mikrobiologiczne prowadzono w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ.

Badania skuteczności sterylizacji wykazały, że dla uzyskania jałowego podłoża do produkcji bacytracyny podczas jego sterylizacji w przepływie, niezbędne jest zastosowanie następujących parametrów:

- temperatura sterylizacji $> 144^{\circ}\text{C}$,
- temperatura za wymiennikami płaszczowo-rurkowymi $> 124^{\circ}\text{C}$,
- czas sterylizacji > 6 s.

Podłoża sterylizowane w tych warunkach używane były do prowadzenia procesu biosyntezy.

3. Warunki obróbki termicznej podłoża a efekt biosyntezy bacytracyny

Porównywano wydajność procesu biosyntezy bacytracyny w podłożach o tym samym składzie, sterylizowanych metodą ciągłą i okresową, stosując dla obu podłoży ten sam materiał posiewowy (inokulum). Warunki sterylizacji podłoża fermentacyjnego:

1) sterylizacja okresowa — ogrzewanie przeponowe, temperatura sterylizacji 120°C , czas sterylizacji 0,5 h,

2) sterylizacja ciągła — ogrzewanie wstępne przeponowe, ogrzewanie do temperatury sterylizacji bezprzeponowe, temperatura sterylizacji 144°C , czas sterylizacji 6 s, wstępne schładzanie bezprzeponowe, dochładzanie przeponowe.

Biosyntezę bacytracyny prowadzono w bioreaktorze laboratoryjnym serii 3000 firmy CHEMAP o pojemności całkowitej 3,5 l oraz roboczej $1,5 \pm 2$ l. Bioreaktor wyposażony był w układy automatycznej regulacji temperatury, natleniania (przepływu powietrza, obrotów mieszadła) i piany. Natlenienie utrzymywano na poziomie 40% stanu nasycenia podłoża. Materiałem posiewowym do każdego procesu była hodowla szczepu produkcyjnego *Bacillus licheniformis* dostarczana z PZF „Polfa” w Pabianicach. Próby z końcowego okresu procesu przekazywano do analizy w PZF. Dla porównania przedstawiono wyniki uzyskane w PZF w skali przemysłowej (PRZEM) w procesach z użyciem tego samego materiału posiewowego, a także w skali pilotowej (PILOT) oraz w kolbach (KOLBY) szczepionych bezpośrednio ze skosów. W tab. 1 przedstawiono wpływ warunków obróbki termicznej w sterylizatorze ciągłym na efekt fermentacji.

TABELA 1
WPLYW WARUNKÓW OBRÓBKII TERMICZNEJ W STERYLIZATORZE CIĄGLYM NA BIOSYNTEZĘ BACYTRACyny

| Parametry | Miano | Numer serii pomiarów | | |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| nateżenie przepływu | $m^3/s \times 10^9$ | 5,56 | 5,56 | 5,42 |
| temp. wlot. zawiesiny | °C | 18 | 45 | 86 |
| temp. wylot. z wymienn. przepon. | °C | 123 | 126 | 126,5 |
| temp. steryl. | °C | 143 | 147,5 | 144 |
| czas steryl. | °C | 6,0 | 6,0 | 6,1 |
| temp. w rozpręż. | °C | 81 | 89,5 | 94 |
| * czas | min | 30 | 120 | 30 |
| * temp. | °C | 80 ÷ 75 | 89 ÷ 80 | 93 i 88 |
| wydajność bacytracyny | j/ml | 510 | 340 | 480 |

* Warunki przetrzymywania podłoża po sterylizacji do momentu rozpoczęcia procesu fermentacji.

Porównanie produktywności procesów biosyntezy bacytracyny prowadzonych w podłożach sterylizowanych metodą ciągłą oraz okresową przedstawiono w tab. 2. Dla podłoży sterylizowanych okresowo uzyskano wyższą wydajność przy prowadzeniu procesu biosyntezy w kolbach oraz w skali pilotowej. Przy prowadzeniu procesu biosyntezy w bioreaktorze laboratoryjnym lepsze efekty uzyskano stosując sterylizację ciągłą. Wydajność bacytracyny 510 j/ml uzyskana w serii pomiarów nr 1, w podłożu wysterylizowanym metodą ciągłą, była najwyższą z uzyskanych i o 82% wyższą od wydajności w skali przemysłowej dla tego samego materiału posiewowego. Średnia wydajność w skali przemysłowej wynosiła 385 j/ml. Niską wydajność fermentacji w serii pomiarów nr 2 należy tłumaczyć zbyt długim czasem przetrzymywania wysterylizowanej zawiesiny w podwyższonej temperaturze przed zaszczepieniem i rozpoczęciem procesu fermentacji. Również istotna jest temperatura podłoża w rozprężaczu (tab.1); nie powinna być wyższa od 80°C.

Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że poprzez modyfikację obróbki cieplnej podłoża (szybsze schładzanie po sterylizacji) korzystne efekty zostaną zwiększone. Generalnie, produkcja bacytracyny w bioreaktorze laboratoryjnym w podłożu sterylizowanym metodą ciągłą — średnia 443 lub 495 j/ml — jeżeli pominąć serię pomiarów nr 2 (zbyt długi czas przetrzymywania podłoża po sterylizacji w temperaturze 80 ÷ 75°C) była wyższa od uzyskanej w podłożu wysterylizowanym metodą okresową — średnia 417 j/ml. W warunkach przemysłowych średnia produkcja antybiotyku dla procesów z użyciem podłoży sterylizowanych metodą okresową wynosi 385 j/ml. Znacznie

wyższe wyniki uzyskano w kontrolnych procesach biosyntezy bacytracyny prowadzonych w kolbach wstrząsanych (średnia 562 j/ml). W doświadczeniach tych użyty był jednak inny materiał posiewowy (hodowla bakterii na skosach agarowych) oraz zastosowana odmienna technika prowadzenia procesu.

TABELA 2

PRODUKCJA BACYTRACINY W BIOREAKTORZE LABORATORYJNYM (LAB), W PODŁOŻU STERYLIZOWANYM METODĄ OKRESOWĄ ORAZ CIĄGLĄ. DLA PORÓWNIANIA PRZEDSTAWIONO WYNIKI UZYSKANE W PZF W SKALI PRZEMYSŁOWEJ (PRZEM) W PROCESACH Z UŻYCIEM TEGO SAMEGO MATERIAŁU POSIEWOWEGO (INOKULUM) ORAZ W SKALI PILOTOWEJ (PILOT) I W KOLBACH (KOLBY) SZCZEPIONYCH BEZPOŚREDNIO ZE SKOSÓW. W PRÓBACH TYCH PODŁOŻE BYŁO STERYLIZOWANE METODĄ OKRESOWĄ

| Nr serii pomiarów | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
|---|---------|-----------------------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|-----|
| Czas proc. | h | 26 | 24 | 26 | 24 | 29 | 24 | |
| P r o d u k c j a | (LAB) | sterylizacja ciągła | | | sterylizacja okresowa | | | |
| | | j/ml | 510 | 340 | 480 | 480 | 370 | 400 |
| | (PRZEM) | sterylizacja okresowa | | | | | | |
| | | j/ml | 280 | 320 | – | – | 370 | 370 |
| | (PILOT) | j/ml | 480 | 500 | – | 600 | 580 | 520 |
| | (KOLBY) | j/ml | 680 | 650 | – | 760 | 670 | 610 |

4. Wnioski

1. Wydajność procesu biosyntezy bacytracyny w bioreaktorze laboratoryjnym w podłożu sterylizowanym metodą ciągłą jest średnio o około 30% wyższa niż wydajność procesu w podłożu sterylizowanym w sposób okresowy.

2. Czas obróbki termicznej podczas sterylizacji ciągłej jest około 300 razy krótszy niż podczas sterylizacji okresowej.

3. Podłoże po sterylizacji jest szczególnie wrażliwe na dalsze warunki termiczne; proces schładzania należy prowadzić bardzo intensywnie.

4. Należy oczekiwać, że wprowadzenie ciągłej sterylizacji termicznej podłoża do procesu produkcyjnego biosyntezy bacytracyny w warunkach przemysłowych wpłynie na zwiększenie wydajności procesu.

5. Zastosowanie ciągłej sterylizacji podłoża poza zwiększeniem wydajności procesu zapewnia jednocześnie oszczędność w zużyciu energii cieplnej (3 ÷ 4-krotnie) i wody chłodzącej (około 3-krotnie) (5).

Literatura

1. Budślawski J., (1971), Zarys chemii mleka. Chemia i biochemia mleka oraz jego przetworów, PWRiL, Warszawa.
2. Campbell J.R., Marshall R., (1982), Podstawy produkcji mleka spożywczego i jego produktów, PWN, Warszawa.
3. Pfeifer V.F., Vojnovich C., (1952), Continuous Sterilization of Media in Biochemical Processes, Ind. Eng. Chem. 44, No 8, 1940 - 1946.
4. Kempe L.L., (1960), Sterylation of Media for Biochemical Process, in: Advances in Applied Microbiology, ed. Umbereit W., Vol.2, Academic Press, New York, 313 - 319.
5. Iciek J., (1990), Biotechnologia, 4(10), 4 - 11.
6. CPBP 04.11, zadanie 3.4, (1986 - 1991), Ciągła, bezprzeponowa, termiczna sterylizacja cieczy oraz zawiesin, Instytut Inżynierii Chemicznej i Procesowej PŁ.
7. Iciek J., Cywińska U., Stobińska H., Stolarek P., (1990), Biotechnologia, 4(10), 51 - 60.

Autorzy dziękują Pracownikom PZF „Polfa” w Pabianicach oraz Pani dr H. Stobińskiej z Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej za pomoc w realizacji badań.

Continuous sterilization of medium for bacitracin biosynthesis

Summary

The aim of the paper was to estimate the applicability of continuous sterilization to the improvement of bacitracin production technology. Preliminary investigations were carried out and the effects of application of thermal continuous sterilization of substrates were estimated. The quality of sterilized substrates was assessed in fermentation tests. Bacitracin biosynthesis was carried out on a substrate sterilized by both batch and continuous method. In laboratory investigations a substrate sterilized by the continuous method enabled to increase antibiotic production by 30% on the average as compared to the yield obtained using a batch sterilized substrate. On an industrial scale, for the same inoculation material the production was even higher by 80%.

Key words:

bacitracin biosynthesis, sterilization, energy and water consumption, UHT.

Adres dla korespondencji:

Jan Iciek, Instytut Chemicznej Technologii Żywności PŁ, ul. Stefanowskiego 4/10, 90 - 924 Łódź.

Praca została wykonana w ramach projektu badawczego nr 3 0097 9101 pt. „Warunki i kinetyka ciągłej sterylizacji termicznej cieczy oraz zawiesin”.