

Optimierung alter Biotechnologischer Verfahren

Schügerl, Karl

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 1989 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.77-79



Verlag Erich Goltze KG, Göttingen

Optimierung alter Biotechnologischer Verfahren

Von **Karl Schügerl**

Die neuen Erkenntnisse in der Bioprozeßtechnik ermöglichen es, alte Verfahren zu verbessern.

Als Beispiel sollen die Verbesserungsmöglichkeiten der Penicillinproduktion näher untersucht werden.

Seit 40 Jahren wird Penicillin G produziert. Seit dieser Zeit wurde der Produktionsstamm *Penicillium chrysogenum* durch herbeigeführte Mutation so verbessert, daß er jetzt 30–40 g/l Penicillin G produziert. Wir haben untersucht, ob eine Verbesserung der Produktionstechnologie möglich ist.

Die Hauptprobleme der Produktion sind der hohe spezifische Leistungseintrag, der durch die hohe Viskosität des Mediums bedingt ist, und die großen Penicillinverluste bei der Aufarbeitung der Fermentationsbrühe, die durch die geringe Stabilität des Penicillins bei den geringen pH-Werten der Extraktion bedingt sind.

Man benötigte in der Industrie 4–5 kW/m³, um in das hochviskose Medium ausreichenden Sauerstoff einzutragen.

Bei der Aufarbeitung betragen die Verluste etwa 15%.

Die Zielsetzung der Arbeit war, den spezifischen Leistungseintrag und die Verluste zu reduzieren.

Reduzierung des spezifischen Leistungseintrags

Die hohe Viskosität des Mediums ist durch die langen verzweigten Hyphen bedingt, die relativ locker gepackt über den gesamten Raum miteinander verwoben und verknäult sind.

Bei Verwendung bestimmter Drehzahlen in der Vorkultur, Impfmenge und Substratkonzentration in der Hauptkultur kann eine Pelletsuspension erzeugt werden, die bis zu einem Sedimentgehalt von 40% eine geringe Viskosität aufweist. Die volumenbezogenen Stoffdurchgangskoeffizienten sind um einen Faktor 4 bis 5 höher als mit filamentösem Mycel.

Bei der Anwendung der Pelletsuspension ist es leicht, die notwendige Sauerstoffmenge ins Medium einzutragen.

Bei der Bildung der Pellets tritt jedoch ein zusätzlicher Stofftransportwiderstand auf. Bei der Auslegung dieses Systems muß man diese zusätzlichen Widerstände berücksichtigen.

Der Gesamtwiderstand setzt sich aus drei Teilen zusammen: der Widerstand an der Gas/Flüssigkeitsphasengrenze, der sich aus der Sauerstoffbilanz ermitteln läßt, der Widerstand in der Grenzschicht an der Pelletoberfläche, der sich aus bekannten Bezie-

hungen berechnen läßt, und der Widerstand im Pellet, der unbekannt ist. Dieser Widerstand wird jedoch zur Optimierung des Systems benötigt.

Mit Hilfe einer Mikrosauerstoffelektrode wurden die Gelöstsauerstoffkonzentrationsprofile in den Pellets in je 10 Mikrometer Abständen gemessen und daraus die Stofftransportwiderstände ermittelt. Sowohl diese Messungen als auch die histologischen Untersuchungen wiesen darauf hin, daß die Eindringtiefe des Sauerstoffs bei hohem Konzentrationsniveau im Medium 200 Mikrometer beträgt. Nur in dieser Schicht findet man metabolisch aktive Zellen. Die Zellen, die mit Sauerstoff nicht ausreichend versorgt werden, sterben ab und werden lysiert. Bei hohem Gelöstsauerstoffkonzentrationsniveau im Medium beträgt der optimale Pelletdurchmesser 400 Mikrometer. In größeren Pellets sterben die Zellen in der Pelletmitte ab. Dadurch vermindert sich die Produktivität. Bei kleineren Pellets steigt die Viskosität des Mediums, daher nimmt das Gelöstsauerstoffniveau im Medium ab, und die Produktivität vermindert sich ebenfalls. In Medien mit 1,2 mm Pelletdurchmesser beträgt die Produktivität nur 50% derjenigen, die mit 400 Mikrometer Pelletdurchmesser erzielt wird.

Mit optimierter Vorkultur, Mediumzusammensetzung und Prozeßführung gelang es, in der Hauptkultur eine Suspension mit mittleren Pelletdurchmessern von 400 Mikron zu erhalten. Dadurch ließ sich der spezifische Leistungseintrag in einem Technikkumsreaktor von 100 l auf einem Wert von $0,8 \text{ kW/m}^3$ reduzieren.

Bei Anwendung von 4 Bioreaktoren mit je 250 m^3 lassen sich dadurch erhebliche Energieeinsparungen erzielen.

Reduzierung der Verluste bei der Aufarbeitung

Zur Isolierung des Penicillins werden die Zellen mit einer Drehtrommel abgetrennt und die zellfreie Fermentationsbrühe zuerst auf Null Grad gekühlt, dann mit Schwefelsäure angesäuert, und das Penicillin G mit n-Butylacetat in Zentrifugalextraktoren extrahiert. Penicillin G ist eine schwache Säure mit einem pK_s -Wert von 2,7. Man kann nur die undissoziierte Säure mit dem Lösungsmittel extrahieren. Daher muß die wäßrige Lösung auf pH 2 eingestellt werden. Bei diesem niedrigen pH-Wert ist das Penicillin sehr instabil. Trotz der niedrigen Temperatur und der kurzen Extraktionszeit treten Verluste in Höhe von 15–20% auf.

Man kann das Penicillin im neutralen pH-Bereich, in dem es stabil ist, mit einem Carrier extrahieren. Langkettige sekundäre Amine, die in der wäßrigen Phase unlöslich sind, bilden mit dem Penicillin Anion und mit dem Proton ein Ionenpaar, das nur in der organischen Phase löslich ist. Bei pH 5 erreicht man mit diesem Carrier, der in n-Butylacetat gelöst ist, einen sehr hohen Extraktionsgrad. Bei pH 7–7,5 läßt sich das Penicillin rückextrahieren, da bei diesem pH-Wert die Stabilität des Komplexes sehr gering ist. Somit kann die Extraktion und Rückextraktion im pH-Bereich 5 bis 7 erfolgen.

Dieses Konzept wurde in einer Laboratoriumskolonnen von 4 m Höhe getestet. Hier konnten die Verluste von 15% auf 1% reduziert werden. Da es möglich war, die Stöchiometrie und die Kinetik der Reaktion zu ermitteln, konnte eine Pilotanlage von 8 m Höhe ausgelegt werden. Auch in dieser Anlage gab es nur geringe Verluste. Da

jedoch in der Praxis die Extraktion in Zentrifugalextraktoren erfolgt, war es notwendig, zu testen, ob sich die Carrier-Extraktion auch hier einsetzen läßt.

Die hervorragenden Ergebnisse ließen sich sowohl in Laboratorienextraktoren als auch in Pilot-Extraktoren wiederholen.

Integration der Produktbildung und -umsetzung

Penicillin G wird nur in geringen Mengen in der Therapie verwendet. Der größte Teil des Produktes wird zur Herstellung von halbsynthetischen Penicillinen verwendet.

Ampicillin ist eines der wichtigsten halbsynthetischen Penicilline, das aus Penicillin in einer enzymatischen Umsetzung hergestellt wird. Das Herstellungsverfahren von Ampicillin aus 21 Schritten. Wir haben untersucht, ob sich die Zahl der Zwischenstufen durch Prozeßintegration reduzieren läßt.

Penicillin G wurde während seiner Bildung aus der zellfreien Fermentationsbrühe, die durch eine Ultrafiltrationsmembran aus dem Reaktor entnommen wurde, mit Hilfe der Flüssigmembrantechnik (wäßrige Emulsion in der Ölphase, die in dem zellfreien Fermentationsmedium dispergiert ist) extrahiert und gleichzeitig durch das Enzym Penicillin G-Amidase, das in der inneren wäßrigen Phase der Flüssigmembran immobilisiert ist, in APS, einem Zwischenprodukt der Biosynthese, und Phenyllessigsäure gespalten.

Phenyllessigsäure diffundierte in das Medium zurück und wurde zusammen mit dem penicillinfreien Medium in den Reaktor zurückgeführt. Die APS wurde nach Spaltung der Flüssigmembran freigesetzt und enzymatisch in Ampicillin umgesetzt. Durch Ersparen der Isolierung und der Reinigung des Penicillins vor seiner Umsetzung gelang es, die Zahl der Stufen bei der Produktion von 21 auf 7 zu reduzieren. Gleichzeitig ließen sich die Verluste während der Bildung von Penicillin G auf 1/3 vermindern.

Diese Beispiele zeigen, daß sich alte Produktionsverfahren in der Biotechnologie durch Anwendung neuer Erkenntnisse und Techniken wesentlich verbessern lassen.