



Zastosowanie niekonwencjonalnej metody natleniania podłoża hodowlanego w procesie jednoczesnej produkcji inulinazy i inwertazy przez drożdże *K. marxianus* K-2

Jacek Pielecki, Zdzisław Targoński

Katedra Technologii Żywności i Przechowalnictwa, Akademia Rolnicza, Lublin

The utility of unconventional oxygenation of culture in simultaneous production of inulinase and invertase by yeasts *K. marxianus* K-2

Summary

In this study, the apparatus for continuous controlling of dissolved oxygen concentration in the culture media was used. The automatic dosing of hydrogen peroxide (decomposed to oxygen and water) was possible, and a significant increase of extracellular enzymatic activity of inulinase (2,5-fold) and invertase (1,5-fold) were obtained in comparison with the traditional aeration. It also minimizes contamination, lowers the expenses on power consumption on aeration and mixing, reduces foaming and, consequently, high cost of antifoam emulsion and bacteriological filters.

Key words:

unconventional oxygenation, inulinase, invertase, *K. marxianus*.

Adres do korespondencji

Jacek Pielecki,
Katedra Technologii
Przemysłu
Rolno-Spożywczego
i Przechowalnictwa,
Akademia Rolnicza,
ul. Skromna 8,
20-704 Lublin.

1. Wprowadzenie

Natlenianie podłoży hodowlanych w bioreaktorach w szczególności przy wysokich stężeniach komórek stanowi ciągle ważny obszar badań procesów biotechnologicznych. Jednym z podstawowych problemów w przemianach tlenowych, które stanowią znaczącą część procesów biotechnologicznych, jest zapew-

nienie szybkiego i możliwie jak najbardziej równomiernego dopływu tlenu do komórek mikroorganizmu. Drobnoustroje charakteryzują się na ogół dużą dynamiką zużycia tlenu, co przy niskiej jego rozpuszczalności ($5-7 \text{ mg/dm}^3$) może w ciągu kilkudziesięciu sekund doprowadzić do wyczerpania tlenu z podłoża (1). Niedobór tlenu w mikrobiologicznych procesach tlenowych wywołuje limitację tlenową, określaną też jako stężenie krytyczne tlenu, które w zależności od rodzaju procesu wynosi kilka procent względnego nasycenia podłoża tlenem powietrza atmosferycznego. Konsekwencją limitacji tlenowej jest ograniczenie procesów oddechowych i wzrostu komórek, co prowadzi do znacznego obniżenia lub – w krańcowych przypadkach – do całkowitego zatrzymania biosyntezy różnych produktów (2,3).

W bioreaktorach z mieszadłem mechanicznym, jednym ze sposobów poprawy stopnia natleniania jest zwiększenie intensywności mieszania przy stałym objętościowym natężeniu przepływu powietrza. Jednak zwiększenie prędkości obrotowej mieszadła może powodować obok rozbicia agregatu komórkowego, uszkodzenia ściany komórek mikroorganizmu i destrukcję białek enzymatycznych (4). Zwiększenie intensywności napowietrzania i szybkości mieszania podłoża hodowlanego może powodować jego intensywne pienienie i wypienianie się z objętości fermentora. Wysokie napięcie powierzchniowe na zewnętrznej powierzchni powstających bąbelków piany może również uszkadzać strukturę białek enzymatycznych. Dlatego konieczne staje się stosowanie kosztownych emulsji odpieniających. Tego rodzaju zjawiska występują głównie w fermentorach z mieszadłami mechanicznymi, gdzie niebezpieczeństwo stwarzają także dynamiczne uderzenia komórek mikroorganizmu, zawieszonych w strudze przepływającej cieczy, o elementy konstrukcji fermentora (np. zastawki, czujniki, mieszadła itp.).

Te problemy stały się podstawą do poszukiwania nowych, efektywniejszych i mniej energochłonnych sposobów natleniania podłoża hodowlanego. Jedną z alternatyw jest zastosowanie nadtlenu wodoru jako źródła tlenu, jednak zastosowanie tego typu natleniania jest możliwe tylko w przypadku mikroorganizmów syntetyzujących katalazę. Z przeprowadzonych wcześniej badań nad zastosowaniem tej metody w produkcji kwasu glukonowego przez *A. niger* wynika, że jest to metoda dająca szereg wymiernych korzyści jak: uzyskanie biosyntezy pożądaných produktów na poziomie metody klasycznej lub wielokrotnie wyższym, znaczne obniżenie kosztów energii na mieszanie i napęd sprężarki powietrza, wyeliminowanie klasycznej instalacji napowietrzającej i konieczności stosowania drogich emulsji odpieńających oraz ograniczenie możliwości wtórnego zakażenia mikrobiologicznego fermentora przez układ natleniania (5).

Problemy wynikające ze stosowania tej metody natleniania mogą dotyczyć konstrukcji urządzenia dozującego nadtlenek wodoru, możliwości toksycznego oddziaływania tlenu na mikroorganizm i stabilności enzymów zewnątrzkomórkowych w środowisku zawierającym rozcieńczony, nie rozłożony nadtlenek wodoru.

Celem badań była ocena przydatności niekonwencjonalnej metody natleniania podłoża hodowlanego w procesie jednoczesnej produkcji inuliny i inwertazy przez

drożdże *Kluyveromyces marxianus* K-2 w czasie wglębnej hodowli fermentorowej. Problematyka ta związana jest ze znanymi trudnościami w natlenianiu podłoży hodowlanych w produkcji biomas drożdżowych.

2. Materiały i metody badań

2.1. Mikroorganizm

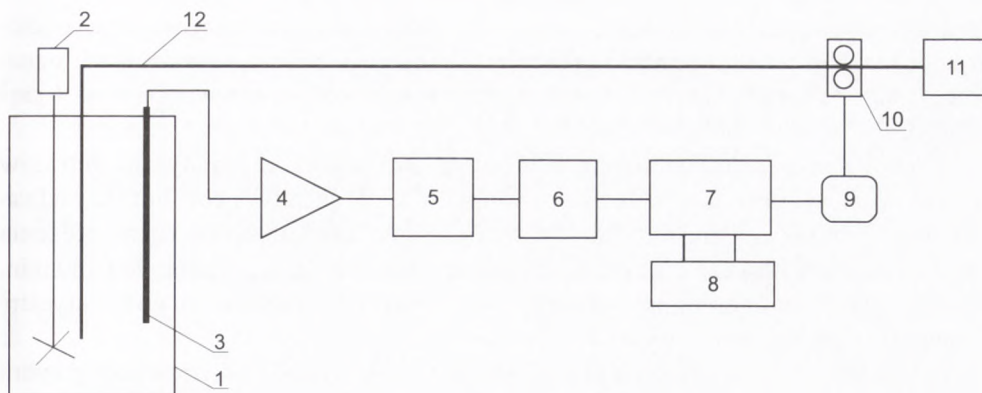
W badaniach użyto szczep drożdży *K. marxianus* K-2 pochodzący z kolekcji Katedry Technologii Żywności i Przechowalnictwa AR w Lublinie. Drożdże hodowano na skosach agarowych zawierających 2% inuliny, inkubując je w temp. 28°C przez okres 48 godz. Tak przygotowane kultury przechowywano w temp. ok. 4°C i używano jako materiał posiewowy do przygotowania inokulum.

2.2. Hodowla fermentorowa

Bioreaktor laboratoryjny (Bioflo III, firmy New Brunswick) o pojemności 2,5 dm³, wypełniano do objętości 1,0 dm³ pożywką zawierającą: (NH₄)₂HPO₄ – 0,1%, MgSO₄ – 0,05%, FeSO₄ – 0,0015%, ekstrakt drożdżowy – 0,03 i 1% inuliny (Merck). Następnie jałowiono w temp. 110°C przez 30 minut. Po tym czasie bioreaktor chłodzono i zaszczepiano materiałem posiewowym w postaci 48-godzinnej hodowli wstrząsanej szczepu *K. marxianus* K-2 w ilości 10% objętości pożywki. W tym celu kolby Erlenmayera o pojemności 500 cm³ wypełniano do objętości 100 cm³ podłożem hodowlanym o podanym składzie, jałowiono, zaszczepiano sterylnie 1 cm³ zawiesiny komórek drożdży w jałowej wodzie (10⁷ kom./cm³) i inkubowano na wstrząsarce rotacyjnej (200 obr/min) przez 48 godz. w temp. 28°C. Hodowle bioreaktorowe prowadzono w temp. 30°C i pH = 4,5, przy mieszaniu podłoża z szybkością 150 obr/min, oraz automatycznym dozowaniem 5% roztworu H₂O₂, umożliwiającym utrzymanie stałej wartości stężenia rozpuszczonego tlenu na poziomie 30% względnej jego rozpuszczalności. Do celów porównawczych przeprowadzono hodowle natleniane powietrzem atmosferycznym (2 dm³ powietrza/dm³ podłoża/min) przy obrotach mieszadła wynoszących 300 obr/min. Co 24 godziny z fermentora pobierano sterylnie próbkę płynu pohodowlanego do analiz.

2.3. Kontrola stopnia natleniania podłoża hodowlanego

Urządzenie do kontroli stopnia natleniania podłoża hodowlanego w bioreaktorze wyposażono w standardową elektrodę tlenową 3, pompę perystaltyczną 10,



Rys. 1. Schemat urządzenia do natleniania podłoża hodowlanego: 1 – zbiornik bioreaktora, 2 – mieszadło mechaniczne, 3 – elektroda tlenowa, 4 – wzmacniacz, 5 – przetwornik analogowo-cyfrowy, 6 – filtr, 7 – moduł sterujący, 8 – programowany regulator stężenia tlenu, 9 – zasilacz, 10 – pompa, 11 – zbiornik nadtlenu wodoru, 12 – przewód doprowadzający nadtlenek wodoru.

programowany, mikroprocesorowy miernik rozpuszczonego tlenu 8 i zbiornik nadtlenu wodoru 11. Tak skonstruowany zestaw pozwalał na automatyczne utrzymywanie stałego, zaprogramowanego poziomu stężenia rozpuszczonego tlenu (z dokładnością do 0,5%) przez odpowiedni dodatek roztworu nadtlenu wodoru do podłoża hodowlanego. Skonstruowane urządzenie może współpracować z dowolnym typem bioreaktora laboratoryjnego (6).

2.4. Metody analityczne

Pobrane z fermentora próbki płynów pohodowlanych o objętości 5 cm³ wirowano przy 10 000 × g przez 20 minut w temp. 4°C. W supernatancie oznaczano aktywności zewnątrzkomórkowe inulinyazy (E.C.3.2.1.7) i inwertazy (E.C.3.2.1.26). Enzymy związane z komórką wydzielano z uzyskanej biomasy drożdży metodą autolizy komórek. W tym celu odwirowaną biomasę przemywano wodą destylowaną, powtórnie wirowano jak wyżej, zawieszano w 5 cm³ 0,05 M buforu octanowego o pH = 5,0 i przetrzymywano przez 18 godzin w temperaturze 50°C (7). W autolizacji oznaczano aktywności enzymatyczne inulinyazy i inwertazy.

Aktywność enzymatyczną inulinyazy (inwertazy) oznaczano w ten sposób, że do 0,9 cm³ 0,1 M buforu McIlvaine'a o pH = 5,0 (pH = 4), zawierającego 1% inuliny (0,1 M sacharozy) dodawano 0,1 cm³ odpowiednio rozcieńczonego filtratu (autolizatu). Tak przygotowaną mieszaninę reagującą inkubowano w termostacie o temperaturze 50°C (60°C) w ciągu 30 minut. Ilość cukrów redukujących uwolnionych w czasie reakcji oznaczano metodą Millera (9). Za jednostkę aktywności enzymatycznej

przyjęto taką ilość enzymu, która uwalniała z substratu 1 μmol ekwiwalentu fruktozy (glukozy) w 1 cm^3 mieszaniny reagującej w ciągu 1 minuty, w warunkach oznaczenia (8). Aktywność enzymatyczną wyrażano w jednostkach aktywności U na 1 cm^3 filtratu lub autolizatu.

Wpływu roztworów nadtlenu wodoru na aktywności enzymatyczne filtratów pochodzących określano przez dodawanie do 1 cm^3 filtratu 2 cm^3 buforu McIlvaine'a o odczynie optymalnym dla danego enzymu, zawierającego różne stężenia H_2O_2 . Tak przygotowane próby przetrzymywano w temp. 50°C w czasie 90 i 180 min. Po tym czasie w mieszaninach reagujących oznaczano aktywności enzymatyczne inulinyazy i inwertazy jak wyżej.

Wydajność biomasy określano wagowo przez wysuszenie odwirowanej grzybni do stałej masy w temp. 105°C .

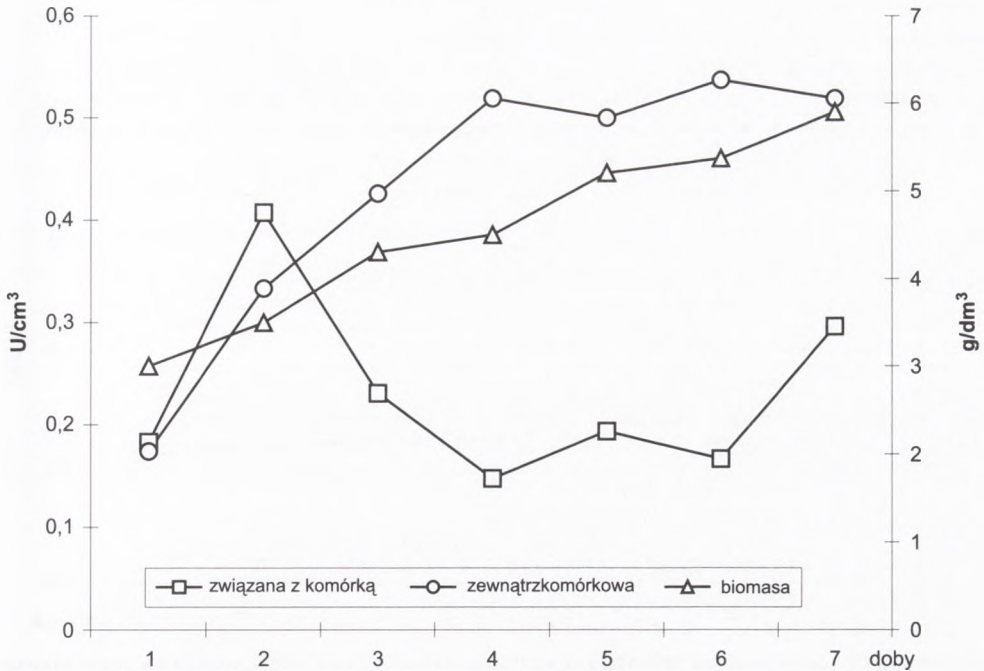
Wartości aktywności enzymatycznych oraz plon biomasy obliczano z uwzględnieniem rozcieńczenia podłoża hodowanego wskutek dozowania roztworu nadtlenu wodoru.

Czas generacji i asymilacji tlenu uwolnionego z nadtlenu wodoru przez *K. marxianus* K-2 oznaczano w ten sposób, że do 100 cm^3 pożywki zawierającej 3-dobową hodowlę wstrząsaną drożdży dodawano 0,2 cm^3 5% roztworu H_2O_2 . Czas generacji tlenu mierzono od momentu wprowadzenia do podłoża wody utlenionej do chwili osiągnięcia najwyższego stężenia tlenu w podłożu. Czas asymilacji tlenu przez drożdże określano mierząc czas spadku stężenia tlenu w podłożu od wartości najwyższej do najniższej.

Stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu hodowanym mierzono przy użyciu standardowej elektrody tlenowej Ingold produkcji Mettler-Toledo GmbH i wyrażano w procentach względnego nasycenia hodowli tlenem powietrza atmosferycznego.

3. Wyniki i omówienie wyników

Porównanie aktywności filtratów pochodzących otrzymanych w warunkach natleniania hodowli *K. marxianus* K-2 nadtlaniem wodoru oraz przy napowietrzaniu klasycznym wykazało istotny wzrost tych aktywności w pierwszym przypadku. Aktywność inulinyazy w filtratach pochodzących była większa o ok. 2,5, a inwertazy ok. 1,5-krotnie w stosunku do uzyskanych metodą napowietrzania klasycznego (rys. 2-5). Również filtry otrzymane z ekstrakcji enzymów związanych z komórkami *K. marxianus* K-2 po hodowli metodą niekonwencjonalną wykazywały ponad dwukrotny wzrost aktywności w 5 lub 6 dobie hodowli w stosunku do uzyskanych metodą klasyczną (rys. 4,5). Hodowla klasyczna charakteryzowała się wyższą dynamiką przyrostu stężenia biomasy w podłożu niż hodowla natleniana niekonwencjonalnie tak, że w filtratach oznaczono dwukrotny przyrost stężenia biomasy od początku do końca hodowli. Hodowla natleniana nadtlaniem wodoru wykazywała ok. 1,2-krotny przyrost stężenia biomasy (rys. 2,4). Stały przyrost ilości biomasy w podłożu w cza-



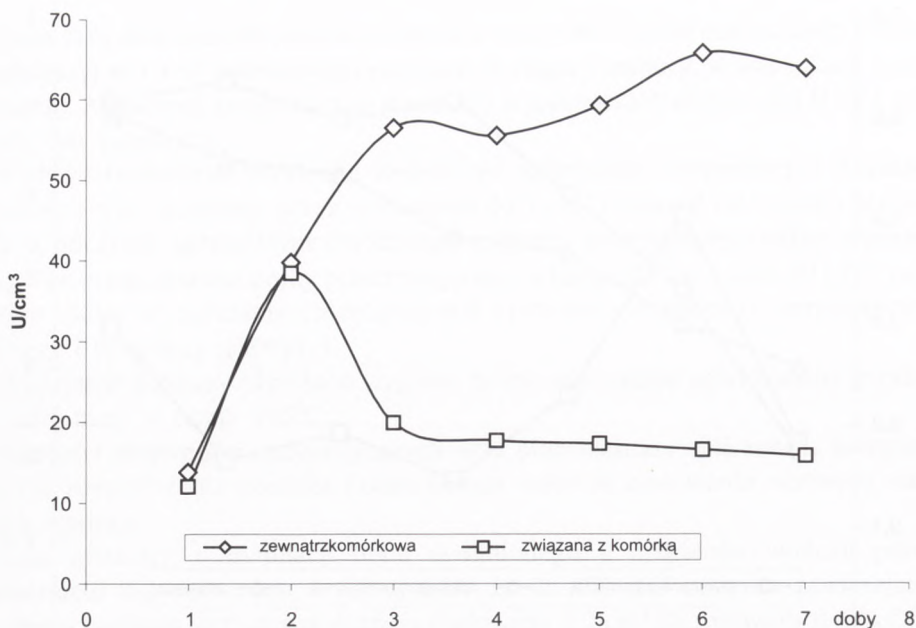
Rys. 2. Dynamika produkcji inuliny zewnętrzkomórkowej i związanej z komórką oraz plon biomasy w czasie klasycznej, wglębnej hodowli fermentorowej drożdży *K. marxianus* K-2, natlenianej na poziomie 30% względnej rozpuszczalności tlenu.

się trwania hodowli niekonwencjonalnej, może świadczyć o braku toksycznego oddziaływania roztworu nadtlenu wodoru na mikroorganizm. Dozowanie roztworu wody utlenionej powodowało okresowe jego występowanie w podłożu w nie rozłożonej formie. Dlatego zbadano wpływ roztworów nadtlenu wodoru na aktywności enzymatyczne inuliny i inwertazy w filtratach pochodzących.

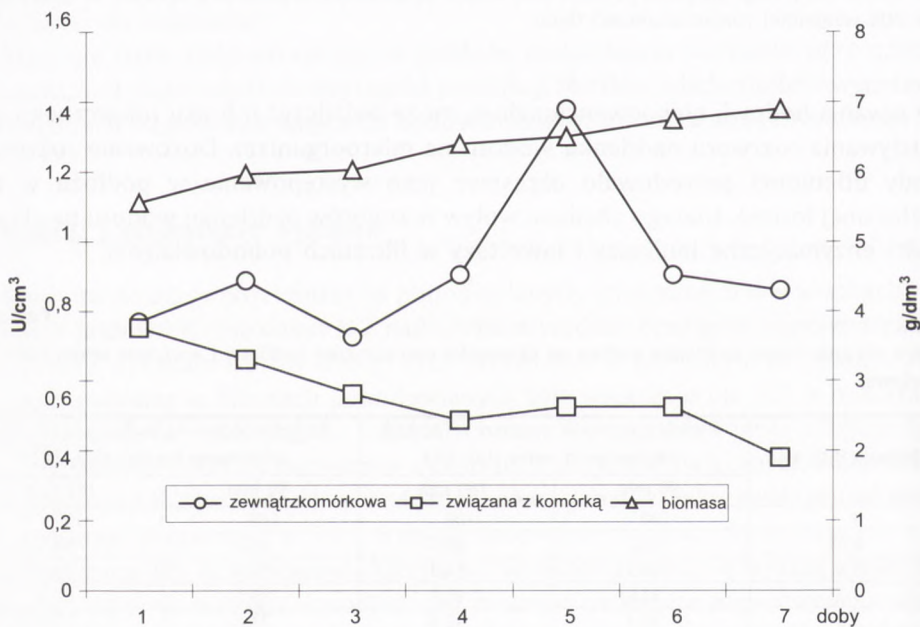
Tabela

Wpływ różnych stężeń nadtlenu wodoru na aktywności enzymatyczne inuliny i inwertazy zewnętrzkomórkowej

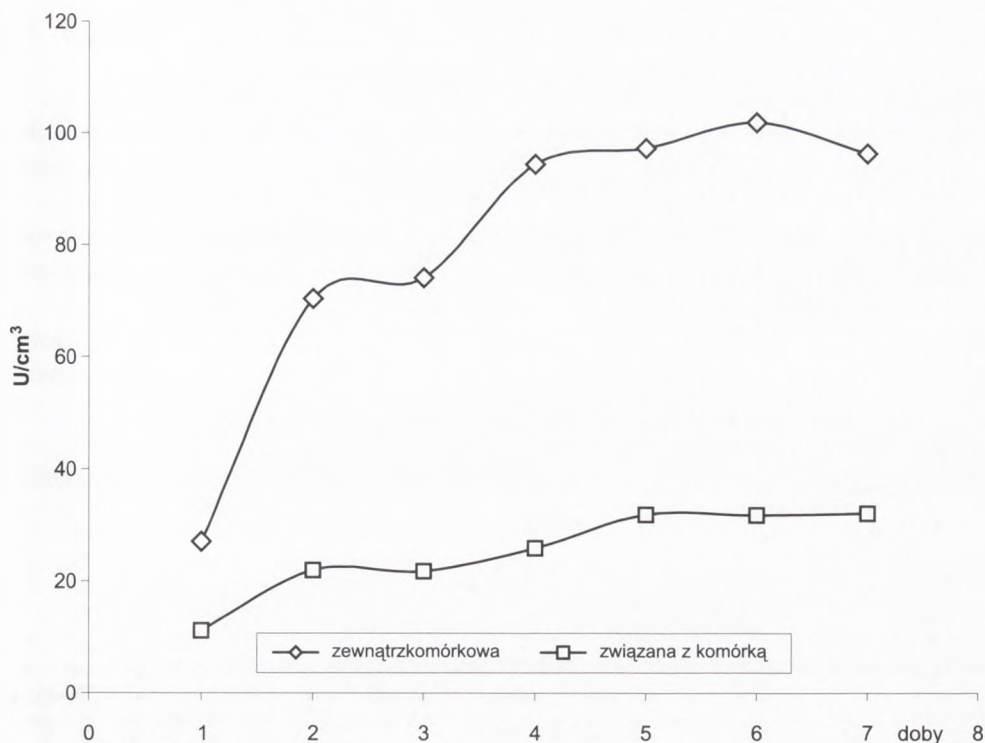
Stężenie H ₂ O ₂ (%)	Względna aktywność inwertazy w filtratach inkubowanych wobec H ₂ O ₂ (%)		Względna aktywność inuliny w filtratach inkubowanych wobec H ₂ O ₂ (%)	
	90 min	180 min	90 min	180 min
0	100	100	100	100
0,25	64,1	60,5	95,2	90,5
0,5	64,1	57,0	90,5	89,9
1,0	52,6	46,0	69,0	67,9
2,0	50,4	42,0	23,8	22,0
3,0	40,8	39,5	0	0
4,0	39,5	34,2	0	0
5,0	21,9	16,6	0	0



Rys. 3. Dynamika produkcji inwertazy zewnątrzkomórkowej i związanej z komórką w czasie klasycznej, wglębnej hodowli fermentorowej drożdży *K. marxianus* K-2, natlenianej na poziomie 30% względnej rozpuszczalności tlenu.



Rys. 4. Dynamika produkcji inulinyazy zewnątrzkomórkowej i związanej z komórką oraz plon biomasy w czasie wglębnej hodowli fermentorowej drożdży *K. marxianus* K-2, natlenianej niekonwencjonalną metodą na poziomie 30% względnej rozpuszczalności tlenu.

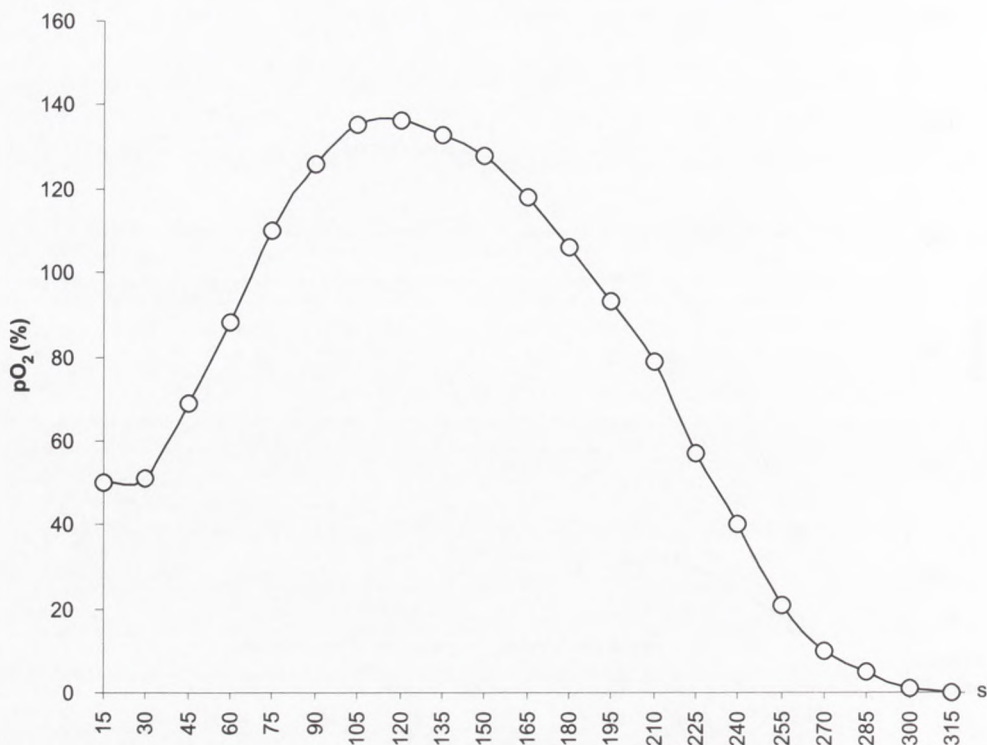


Rys. 5. Dynamika produkcji inwertazy zewnętrznej i związanej z komórką w czasie wglębnej hodowli fermentorowej drożdży *K. marxianus* K-2, natlenianej niekonwencjonalną metodą na poziomie 30% względnej rozpuszczalności tlenu.

Względna aktywność enzymatyczna inwertazy w mieszaninach reagujących zmniejszała się proporcjonalnie w całym przedziale wzrastających stężeń H_2O_2 . Inulina wykazywała wysoką, względną aktywność w zakresie niskich stężeń wody utlenionej, od 0,25 do 1%, niezależnie od czasu inkubacji. Zwiększenie zawartości nadtlenu wodoru w mieszaninach reagujących powyżej 2% powodowało całkowitą inaktywację tego enzymu.

Dozowany do podłoża 5% nadtlenek wodoru był rozkładany w krótkim okresie (ok. 2 min) do wody i tlenu asymilowanego przez drożdże. Pełny cykl rozkładu nadtlenu wodoru i asymilacji powstałego tlenu przez drożdże trwał 5 min. Niskie stężenia nadtlenu wodoru w konsekwencji rozcieńczenia i krótki czas występowania w postaci nie rozłożonej w podłożu nie oddziaływały hamująco na aktywności enzymatyczne filtratów pohodowlanych.

W cytowanej pozycji literatury (4) z 1983 r. opisuje się wyczerpująco potencjalne skutki intensyfikacji mieszania, wspomagającego proces wymiany masy w podłożu hodowlanym. Pomimo stale prowadzonych prac badawczych, w ciągu ostatniego



Rys. 6. Czas generacji i asymilacji tlenu przez drożdże *K. marxianus* K-2, powstałego z rozkładu nadtlenu wodoru.

dwudziestolecia nie obserwowano znaczącego postępu w rozwoju technik natleniania podłoża w hodowlach bioreaktorowych mieszanych mechanicznie i nadal są stosowane wymienione w pracy metody, zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej. Problem natleniania podłoża nadtlaniem wodoru w produkcji inulinazy i inwertazy przez drożdże nie ma odniesienia w dostępnej literaturze. Pod względem aplikacji jest to nowe rozwiązanie problemu.

Możliwość inaktywacji i degradacji białka enzymatycznego w środowisku zawierającym nadtlenu wodoru jest obecnie przedmiotem przygotowywanej do druku publikacji. W opisywanym w pracy doświadczeniu zwraca uwagę krótki czas obecności nie rozłożonego nadtlenu wodoru (ok. 8 s) przy niskiej koncentracji w podłożu (ok. 150 μ l 5% H_2O_2 /1l podłoża). Ponadto na podstawie analiz elektroforogramów prób pochodzących z doświadczeń kontrolnych i natlenianych niekonwencjonalnie nie stwierdzono występowania różnic w profilach białkowych obydwu prób.

4. Wnioski

1. W wyniku zastosowania niekonwencjonalnej metody natleniania podłoża hodowlanego, uzyskano znaczący wzrost aktywności enzymatycznej inulinazy i inwertazy w filtratach.

2. Pełna kontrola procesu niekonwencjonalnego natleniania podłoża hodowlanego drożdży *K. marxianus* K-2 pozwalała uniknąć toksycznego oddziaływania nadtlenu wodoru na ten mikroorganizm w warunkach doświadczenia.

3. Jednoczesna produkcja inulinazy i inwertazy w warunkach niekonwencjonalnego natleniania podłoża może się przyczynić do znacznego obniżenia kosztów związanych z ich wytwarzaniem na skalę przemysłową.

Literatura

1. Bailey J. E., Ollis D. F., (1986), *Biochem. Eng. Fundamentals*, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
2. Petruccioli M., Fenice M., Piccioni P., Federici F., (1995), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 17, 336-339.
3. Witteveen C. F. B., Vondervoort P. J. I., Swart K., Visser J., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 683-686.
4. Mukataka S., Tada M., Takahashi J., (1983), *Journal of Fermentation Technology*, 61, 6, 615-621.
5. Fiedurek J., Pielecki J., (1999), *Biotechnologia*, 4, 179-185.
6. Fiedurek J., Pielecki J., (1999), Zgłoszenie patentowe nr P331-193 z 03.02.1999 r.
7. von Abraham B., Klaushofer H., (1989), *Die Branntweinwirtschaft*, 129, (3), 34-38.
8. Rouvenhorst R. J., Visser L. E., van der Baan A. A., Scheffers W. A., van Dijken J. P., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1131-1137.
9. Miller G. L., (1959), *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.