

# Biokonwersja D-sorbitolu do L-sorbozy przy użyciu immobilizowanych komórek bakterii

Stanisław Walisch

Jarosław Lipiński

Instytut Mikrobiologii i Immunologii

Uniwersytet Łódzki

## 1. Wstęp

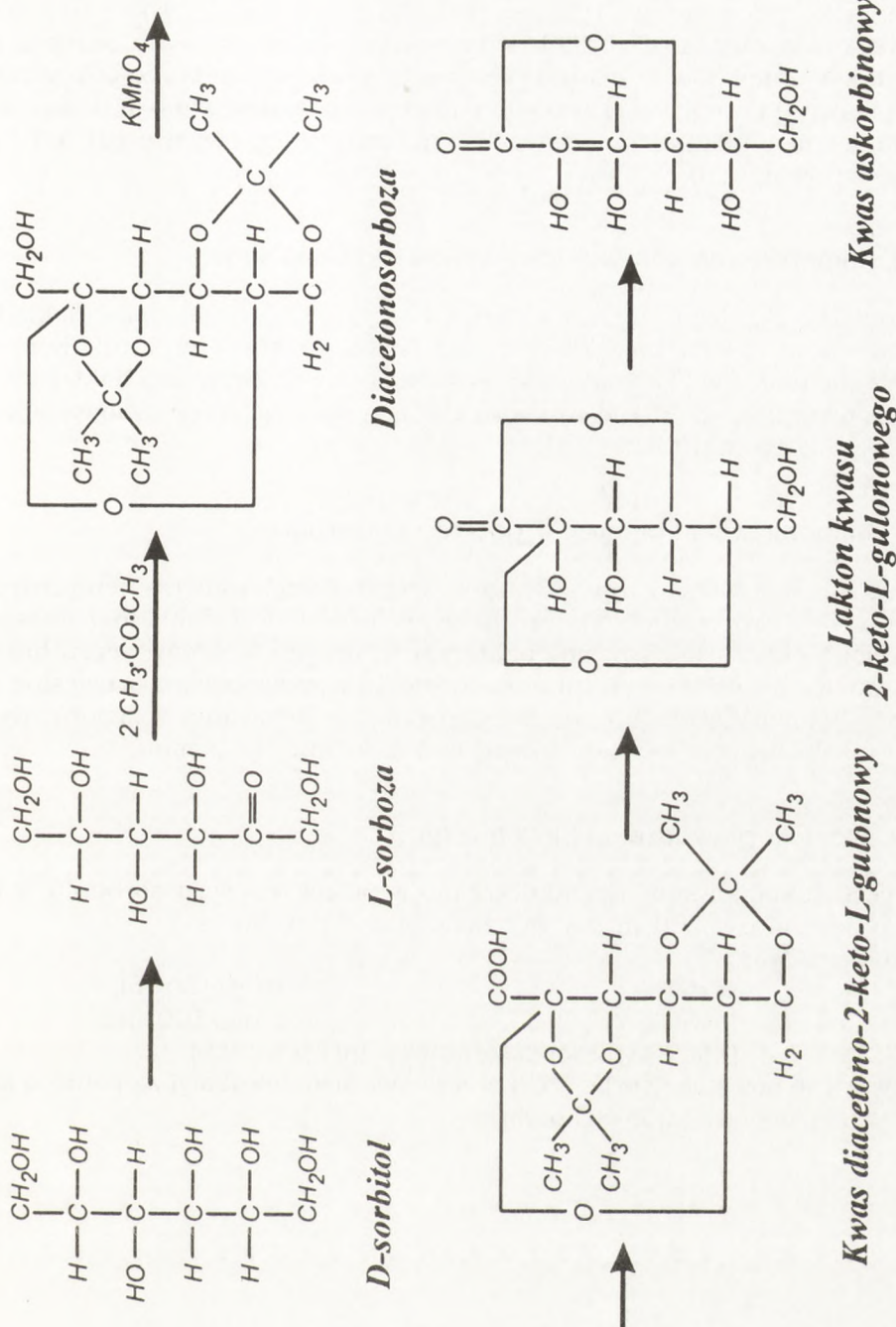
W mikrobiologiczno-chemicznej metodzie produkcji witaminy C (3,8) (rys. 1), pierwszym etapem jest utlenianie D-sorbitolu do L-sorbozy przy użyciu bakterii z rodzaju *Acetobacter* lub *Gluconobacter* w jednoczesnym procesie obejmującym hodowlę drobnoustrojów i biokonwersję.

W ostatnich latach pojawiła się w biotechnologii tendencja do bardziej ekonomicznego wykorzystania materiału biologicznego. Dąży się do wielokrotnego użycia namnożonej masy drobnoustrojów w powtarzających się szarżach technologicznych. Pominięcie procesu namnażania znacznie skraca cykl produkcyjny, a niejednokrotnie pozwala na korzystne zmiany składu chemicznego medium poddawanego biokonwersji. Jednak zwykle przeniesienie oddzielonych po procesie drobnoustrojów do następnego cyklu nie zawsze prowadzi do pozytywnych rezultatów w związku z tym, że są to drobnoustroje z późnej fazy stacjonarnej wzrostu wykazujące zwykle znacznie obniżoną aktywność biochemiczną w pożądanym przez nas kierunku. Dlatego też ostatnio stosuje się unieruchamianie komórek w odpowiednio dobranym nośniku, przy czym drobnoustroje mogą być pobrane z dowolnej fazy wzrostu, takiej w której wykazują najwyższą aktywność biokonwersji (1,2,5,7,9). Zimmobilizowane komórki mogą być wielokrotnie użyte do przeprowadzenia interesującego nas procesu.

Celem pracy były próby zastosowania trzech różnych nośników żelowych do unieruchomienia bakterii czynnych w biokonwersji sorbitolu do sorbozy.

## 2. Materiały i metody

Użyte w pracy szczepy bakterii rodzaju *Gluconobacter* pochodziły z kolekcji Instytutu Mikrobiologii UŁ. Stosowano żele: alginian wapnia i karaginan typ I (Sigma Chem. Co., USA), agar (Difco, USA) oraz pozostałe odczynniki produkcji POCh, Gliwice.



Rys. 1. Skrócony schemat otrzymywania witaminy C (wg 3).



## 2.1. Namnożenie i przygotowanie bakterii do immobilizacji

Bakterie hodowano w 100 ml podłoża zawierającego sole mineralne, ekstrakt drożdżowy oraz sorbitol, w litrowych kolbach na wytrząsarce o 115 obr./min, w temp. 30°C. Hodowlę przerywano w 19 – 20 godz., co odpowiadało późnej logarytmicznej fazie wzrostu i bakterie odwirowywano w temp. 4°C. Uzyskaną masę bakterii przemywano buforem fosforanowym o pH 5,5 i ponownie wirowano (10).

## 2.2. Immobilizacja komórek przy użyciu alginianu sodu

Alginate sodu rozpuszczano w wodzie destylowanej, a następnie dokładnie mieszano z zawiesiną bakterii o znanej liczbie komórek w 1 ml. Końcowe stężenie alginianu w zawieszynie wynosiło około 1,5%. Zawiesinę bakterii w alginianie wkraplano do 0,4 M roztworu CaCl<sub>2</sub> uzyskując silnie żelowane kulki o średnicy 2 – 3 mm (6).

## 2.3. Immobilizacja komórek w agarze i karaginie

Agar lub karaginan rozpuszczano w wodzie destylowanej w temperaturze 100 lub 70°C, roztwór chłodzono do temp. 40 – 45°C i dokładnie mieszano z określoną objętością zawiesiny bakteryjnej. Stężenie końcowe agaru lub karaginanu w zawieszynie wynosiło ok. 2,5%. Tak przygotowaną zawiesinę napełniano kapilary szklane o średnicy 3 mm. Po żelowaniu roztworu, wypychano cienki walec z kapilary i cięto go na odcinki 2 – 3 mm.

## 2.4. Warunki prowadzenia biokonwersji

Unieruchomione komórki inkubowano w 50 ml roztworu sorbitolu w kolbach o pojemności 300 ml na wytrząsarce w temp. 30°C.

Skład roztworu:

sorbitol	10 g/100 ml,
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 mg/100 ml,
0,067 M bufor fosforanowy (pH 5,5 – 8,0).	

Zawartość powstałej sorbozy oznaczano w czasie inkubacji za pomocą zmodyfikowanej metody Luffa-Schoorla (4).

### 3. Wyniki i dyskusja

Zawiesiny bakterii *Gluconobacter* sp. unieruchamiano w trzech różnych żelach: alginianie, agarze i karaginanie. Wyniki biokonwersji sorbitolu do sorbozy, prowadzonej przy użyciu bakterii immobilizowanych w wymienionych żelach przy zmiennej gęstości unieruchomionych komórek przedstawiono w tab. 1 – 3. Biokonwersję początkowo prowadzono w środowisku o pH 5,5 — optymalnym dla wzrostu drobnoustrojów. W dalszych badaniach zastosowano pH=7, korzystniejsze dla procesu biokonwersji. Przeprowadzono również próby wielokrotnego użycia immobilizowanych komórek w wymienionych żelach. Wyniki biokonwersji sorbitolu do sorbozy przy 4-krotnym użyciu tych samych bakterii immobilizowanych w alginianie przedstawiono na rys. 2.

TABELA 1  
BIOKONWERSJA SORBITOLU DO SORBOZY PRZEZ IMMOBILIZOWANE  
W ALGINIANIE KOMÓRKI *GLUCONOBACTER* SP. (pH 5,5)

Nr serii	Liczba komórek w 1 ml żelu	Czas inkubacji w godzinach							
		19	21	27	37	47	61	73	77
		Zawartość sorbozy w g/100 ml							
1	$2,2 \cdot 10^8$			4,4		6,5		7,0	6,2
2	$2,2 \cdot 10^9$			4,5		7,5		5,6	
3				4,8		7,3		5,0	
4	$2,2 \cdot 10^{10}$	3,5		5,6		7,9*		6,2	
5	$1,2 \cdot 10^{12}$		3,2		5,6	7,9	7,3		
6	$2,5 \cdot 10^9$ bakterie nie immobilizowane	2,8		5,2		6,3		6,2	

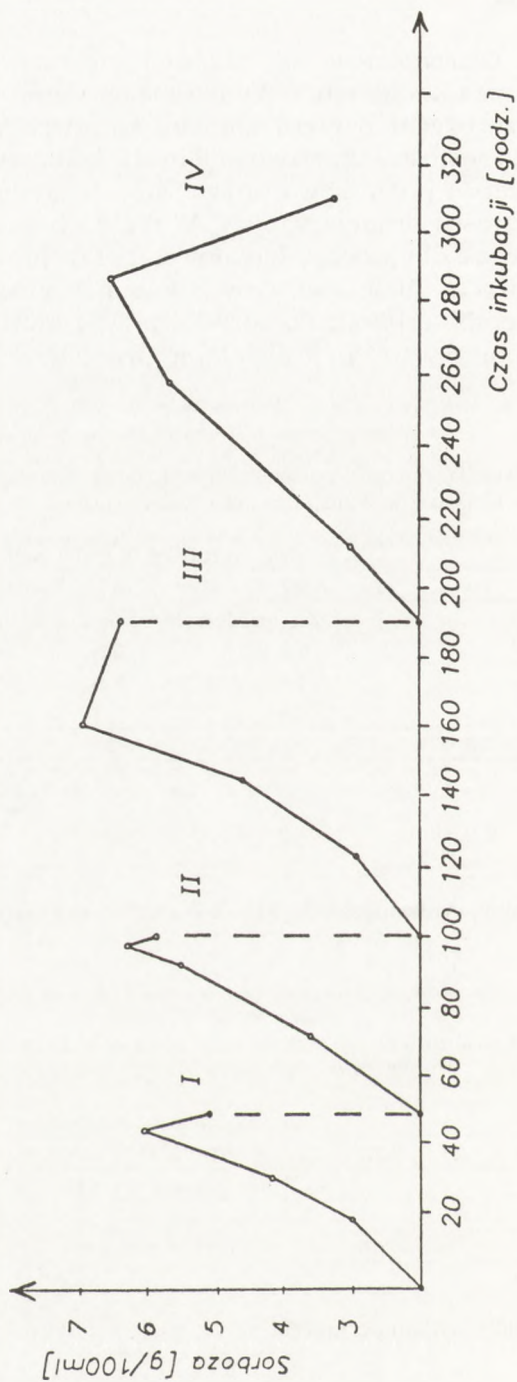
\* przy pH 7 porównywalny wynik uzyskano już w 31. godz. inkubacji.

TABELA 2  
BIOKONWERSJA SORBITOLU DO SORBOZY PRZEZ BAKTERIE *GLUCONOBACTER* SP.  
IMMOBILIZOWANE W AGARZE (pH 5,5)

Nr serii	Liczba komórek w 1 ml żelu	Czas inkubacji w godzinach									
		19	21	23	27	29	37	43	47	53	71
		Zawartość sorbozy w g/100 ml									
1	$2,6 \cdot 10^9$		5,5		6,4				7,2	5,7	
2	$4,0 \cdot 10^{10}$			7,0		7,4*	6,4				
3	$6,5 \cdot 10^{10}$	3,9						5,7		6,9	5,2

\* przy pH 7 uzyskano 80% wydajność procesu w 43. godz. inkubacji.





Rys. 2. Biokonwersja sorbitolu do sorbozy przy wielokrotnym użyciu bakterii unieruchomionych w alginianie ( $2.2 \cdot 10^9$ /ml).

TABELA 3  
 BIKONWERSJA SORBITOLU DO SORBOZY PRZEZ IMMOBILIZOWANE  
 W KARAGINIANIE KOMÓRKI *GLUCONOBACTER* SP. (pH 5,5)

Nr serii	Liczba komórek w 1 ml żelu	Czas inkubacji w godzinach					
		21	43	53	65	75	93
		Zawartość sorbozy w g/100 ml					
1	$6,0 \cdot 10^8$	2,8	6,0		6,4	6,7	4,8
2	$2,3 \cdot 10^9$	3,5	6,4	6,7	5,9		
3	$1,9 \cdot 10^{10}$	5,2	6,6		5,7*		

\* przy pH 7 uzyskano 70% wydajność procesu w tym samym czasie inkubacji.

Najwyższe wydajności procesu biokonwersji (ok. 80%) uzyskano po 43. godz. dla immobilizatów agarowych w optymalnym pH=7, przy gęstości zawiesiny  $4,0 \cdot 10^{10}$ /ml (tab. 2). Mankamentem nośnika agarowego okazała się jednak jego mała wytrzymałość mechaniczna.

Podobną wydajność biokonwersji (ok. 79%) uzyskano w 47. godz. przy użyciu immobilizatu alginianowego o gęstości komórek  $2,2 \cdot 10^{10}$ /ml i przy pH=5,5. Podniesienie pH środowiska do 7 skróciło czas biokonwersji do 31. godz., przy tej samej wydajności procesu (tab. 1).

Zastosowanie karaginanu jako żelu do immobilizacji komórek, dało nieco gorsze efekty. W optymalnych warunkach pH=7 i przy gęstości zawiesiny  $1,9 \cdot 10^{10}$ /ml, 70% wydajność biokonwersji osiągnięto dopiero po 65. godz. trwania procesu (tab. 3). We wszystkich doświadczeniach z bakteriami immobilizowanymi wydajności biokonwersji były wyższe niż przy zastosowaniu bakterii nieimmobilizowanych.

W badaniach wielokrotnego wykorzystania unieruchomionych bakterii, najlepsze efekty uzyskano dla żelu alginianowego. W procesie prowadzonym w czterech kolejnych cyklach, w łącznym czasie dwunastu dni, nie obserwowano obniżenia wydajności biokonwersji w poszczególnych cyklach. Wydajność procesu kształtowała się w granicach 60 – 70%. Jednakże można było zauważyć przedłużający się czas kolejnych cykli biokonwersji (rys. 2). Podobnie dla immobilizatów agarowych uzyskano w czterech cyklach (12 dni) wydajność rzędu 50 – 60% — nieco niższą niż w przypadku alginianu. Przy użyciu karaginanu jako nośnika, przy podobnych wydajnościach produktu biokonwersji, proces znacznie się wydłużał w kolejnych, następujących po sobie cyklach.

#### 4. Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że w procesie mikrobiologicznego przekształcenia sorbitolu do sorbozy w produkcji witaminy C, istnieje możliwość zastosowania komórek immobilizowanych. Może to być szczególnie celowe przy wprowadzeniu metody ciągłej biokonwersji sorbitolu do sorbozy w systemie kolumnowym, co będzie przedmiotem dalszych badań.



## Literatura

1. Chibata I., Tosa T., (1977), *Adv. Appl. Microb.*, 22, 1 - 25.
2. Chibata I., Tosa T., Sato T., (1979), in: *Microbial Technology*, Eds. Peppler H. I., Perlman D., Acad Press, New York, II, 434 - 459.
3. Dyr J., (1965), *Kwasna chemie a technologie*, SMTL/SVTL, Praha, I, 158 - 162.
4. Kalendarz przemysłu spożywczego, (1954), NPLiS, Warszawa, I, 273 - 274.
5. Kierstan M.P.J., Bucke C., (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 387 - 397.
6. Kierstan M.P.J., Coughlan M. P., (1985), in: *Immobilized Cells and Enzymes*, Ed. Woodward J., Irepress, Oxford-Washington, 39 - 48.
7. Mori A., (1985), *Process Biochemistry*, 20, 67 - 74.
8. Perlman D., (1979), in: *Microbial Technology*, Eds. Peppler H.I., Perlman P., Acad Press, New York, II, 173 - 175.
9. Tsay S.S., To K. Y., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 297 - 304.
10. Walisch S., (1982), *Acta Microbiol. Polon.*, 31, 29 - 36.

### Bioconversion of D-sorbitole into L-sorbose with immobilized bacterial cells

#### Summary

*Gluconobacter* sp. cells were immobilized in three different carriers: agar, calcium alginate and  $\kappa$ -carrageenan. In all the three cases we achieved good conversion of D-sorbitol into L-sorbose. The best effects were obtained while using alginate as a carrier. The yield of bioconversion reached about 80% as soon as after in 31 hours of the process, at pH=7 and density of the suspension  $2.2 \cdot 10^{10}$ /ml. Using agar as a carrier, a similar yield (about 80%) was achieved during 43 hours of the process, at the density of suspension  $4.0 \cdot 10^{10}$ /ml. Carrageenan used as a carrier gave a little worse result — the yield of about 70%.

#### Key words:

D-sorbitole, L-sorbose, bioconversion.

#### Adres dla korespondencji:

Stanisław Walisch, Instytut Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.