

# Wykorzystanie niekonwencjonalnego sposobu natleniania podłoża hodowlanego w procesie fermentacji glukonowej

*Jan Fiedurek<sup>1</sup>*

*Jacek Pielecki<sup>2</sup>*

*Anna Gromada<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii Przemysłowej  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>2</sup> Katedra Technologii Żywności i Przechowalnictwa  
Akademia Rolnicza  
Lublin

## 1. Wprowadzenie

Jednym z zasadniczych problemów w procesie hodowli fermentorowej jest zapewnienie dostatecznie szybkiego i równomiernego dopływu tlenu do komórek. Jest to wynikiem dużej szybkości zużywania tlenu przez komórki oraz niską jego rozpuszczalnością w podłożu wynoszącą 5-7 mg/l. Taka zawartość tlenu w podłożu może być wykorzystana przez drobnoustroje w ciągu kilkudziesięciu sekund (1).

Niedobór tlenu w mikrobiologicznych procesach tlenowych powoduje powstanie warunków limitacji tlenowej określanej jako stężenie krytyczne tlenu. Dla różnych procesów wynosi ono zwykle kilka procent stanu nasycenia hodowli tlenem powietrza atmosferycznego. Konsekwencją limitacji tlenowej jest ograniczenie procesów oddechowych drobnoustrojów, wzrostu komórek, co w rezultacie prowadzi do znacznego obniżenia lub braku biosyntezy produktu (2,3).

Proces hodowli fermentorowej, w którym natlenianie podłoża hodowlanego uzyskuje się przez jego napowietrzanie i mieszanie, prowadzony jest w bioreaktorach wyposażonych w urządzenia napowietrzające, mieszadła oraz instalacje do automatycznej regulacji wartości pH, temperatury, odpienienia itp. Zapewnienie właściwych warunków mieszania i napowietrzania, zwłaszcza z użyciem grzybów nitkowatych, stanowi szczególnie trudny problem techniczny. Istnieje możliwość poprawy stopnia natlenienia poprzez zwiększenie intensywności mieszania, jednakże generuje to duże siły ścinające. Głównym ich źródłem są powstające w cieczy mikrowiry o zmiennych wymiarach i kierunkach. Przy zderzeniu się wiru z cząstką stałą, np. komórką, następuje

rozproszenie energii na jej powierzchni i fizyczne uszkodzenie ściany komórkowej. Tego rodzaju zjawiska występują głównie w fermentorach z mieszadłami mechanicznymi, gdzie obok mikrowirów niebezpieczne dla komórek są także dynamiczne uderzenia komórek o elementy konstrukcji fermentora (mieszadło, przegrody, czujniki) (4). Mikroorganizmy tworzące agregaty komórkowe (jak *A. niger*) są wrażliwe na wysokie naprężenia styczne na końcach mieszadeł. Ponadto energia zużywana na mieszanie i napowietrzanie stanowi znaczną część kosztów procesu biosyntezy mikrobiologicznej. Stało się to impulsem do poszukiwania mniej energochłonnych rozwiązań tych procesów. Celem badań była ocena przydatności nowego systemu automatycznego sterowania stopniem natlenienia pożywki w procesie fermentacji glukonowej, nie stosowanego w dotychczasowych rozwiązaniach konstrukcyjnych bioreaktorów, pozwalającego na utrzymanie względnego stężenia rozpuszczonego tlenu ( $pO_2$ ) w granicach od 1 do 100%  $\pm 2\%$  przez dodatek roztworu nadtlenu wodoru.

## 2. Materiały i metody badań

### 2.1. Organizm i podłoża hodowlane

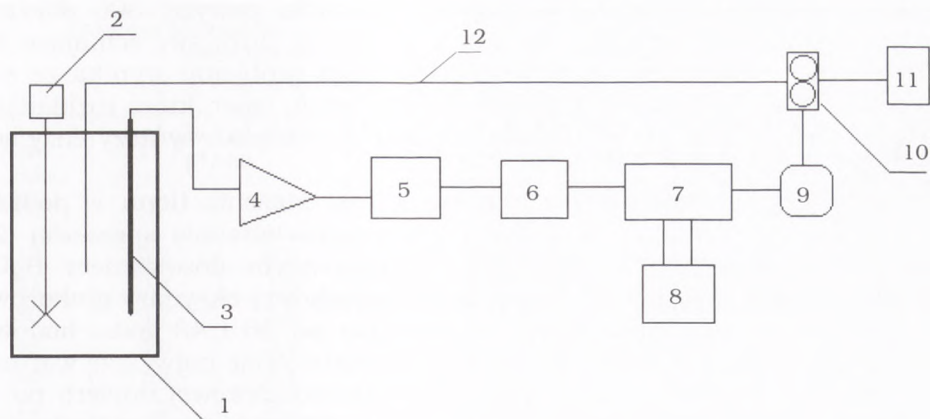
W badaniach użyto mutantu *A. niger* AM-11 pochodzącego z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS (5).

### 2.2. Hodowla fermentorowa

Bioreaktor laboratoryjny (Biostat B, firmy B. Braun Biotech International GmbH) o pojemności 2000 ml, po napełnieniu 1600 ml pożywki składającej się z glukozy — 8%, ekstraktu drożdżowego — 0,5%,  $KNO_3$  — 1,0%,  $KH_2PO_4$  — 0,1%,  $CaCO_3$  — 2,5% (oddzielnie jałowiony) oraz po jego wysterylizowaniu w autoklawie przy nadciśnieniu 0,075 MPa w ciągu 20 minut, zaszczepiano materiałem posiewowym w postaci 48-godzinnej hodowli wytrząsanej szczepu *Aspergillus niger* AM-11 w ilości 10% w stosunku do objętości pożywki. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze przez okres 72 godzin, w temperaturze 30°C, przy jej mieszaniu z szybkością obrotów mieszadła wynoszącą 300 obr/min, oraz automatycznym dozowaniu wody utlenionej o stężeniu 20% umożliwiającym utrzymanie stałego poziomu tlenu na poziomie 30%  $\pm 2\%$ .

### 2.3. Kontrola stopnia natleniania podłoża

Urządzenie do kontroli stopnia natlenienia podłoża hodowlanego (rys. 1) w bioreaktorze składa się z czujnika stężenia tlenu  $pO_2$ , który stanowi elektroda tlenowa (3), pompy perystaltycznej (10), programowanego regulatora stężenia tlenu (8) i zbiornika nadtlenu wodoru (11). Urządzenie to pozwala na automatyczne utrzymanie stałego stężenia rozpuszczonego tlenu (w granicach od 1 do 100%) przez dodatek roztworu nadtlenu wodoru (18).



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, 8 — programowany regulator stężenia tlenu, 9 — zasilacz, 10 — pompa, 11 — zbiornik nadtlenu wodoru, 12 — przewód doprowadzający nadtlenek wodoru.

## 2.4. Analityka

Aktywność oksydazy glukozowej określono metodą enzymatyczną, przyjmując, za jej jednostkę taką ilość enzymu, która uwalnia 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  z roztworu glukozy w ciągu minuty na 1 ml przesącza lub rozkłada 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (w przypadku katalazy) (6). Zawartość kwasu glukonowego określano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (chromatograf cieczowy — LC-5A produkcji czeskiej) i wyrażano w g/l podłoża. Glukozę analizowano metodą Lloyda i Whelana (7), natomiast białko według procedury Schacterle i Pollacka (8). Stężenie rozpuszczonego tlenu w podłożu mierzono przy użyciu elektrody Ingolda (Mettler-Toledo GmbH) i wyrażano w procentach względnego nasycenia hodowli tlenem powietrza atmosferycznego. Wydajność biomasy określano wagowo przez wysuszenie grzybni do stałej wagi w temp.  $105^\circ\text{C}$ . Po zakończeniu hodowli grzybnię dezintegrowano przy użyciu homogenizatora szklanego typu Potter-Elvehjema ze szklanym trzonem obracającym się z szybkością 100 obr/min; wewnątrzkomórkową oksydazę glukozową i katalazę ekstrahowano ze zdeintegrowanej grzybni przy użyciu 0,1 M buforu Mc Ilvaine'a (pH 6,0).

## 3. Wyniki badań i ich omówienie

Niska zawartość tlenu w środowisku hodowlanym, szczególnie w procesach z dużą gęstością biomasy powoduje jego szybkie wykorzystanie przez drobnoustroje. Zastąpienie powietrza czystym tlenem tylko częściowo rozwią-

zuje ten problem. Zwiększenie szybkości mieszadła powyżej 300 obr/min powoduje uszkodzenie grzybni *A. niger* z uwagi na duże siły ścinające (9). Możliwość niekonwencjonalnego rozwiązania tego problemu wynika ze stosunkowo wysokiej aktywności katalazowej grzybni *A. niger*, która rozkładając podawany nadtlenek wodoru, dostarcza tlenu do wzrostu, syntezy enzymów i kwasu glukonowego.

Wstępne wyniki wskazują na znaczny wzrost stężenia tlenu w podłożu hodowlanym w warunkach kiedy tradycyjne napowietrzanie sprężarką (2 l powietrza/l podłoża/min) zastąpiono automatycznym dozowaniem  $H_2O_2$ . Najwyższą aktywność wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej oksydazy glukozowej (OG) uzyskano w tych warunkach odpowiednio po 36 i 48 godz. hodowli. Aktywność wewnątrzkomórkowej katalazy uzyskała swoje najwyższe wartości już po 24 godz. hodowli, zaś jej frakcji zewnątrzkomórkowej dopiero po 48 godz. Warto przy tym odnotować, że zarówno aktywności wewnątrzkomórkowej oksydazy glukozowej, jak i katalazy były wyższe od aktywności frakcji zewnątrzkomórkowych (odpowiednio 1,4 i 4,8-krotnie). Porównanie aktywności wewnątrzkomórkowej katalazy otrzymanej w warunkach natleniania nadtlentkiem wodoru oraz przy napowietrzaniu klasycznym wykazało ponad 5-krotnie wyższą aktywność tego enzymu w pierwszym przypadku. Obserwowane szybkie zużycie glukozy po 36 godz. hodowli korelowało z najwyższym przyrostem kwasu glukonowego. Ilości wytwarzanego w tych warunkach kwasu glukonowego były stosunkowo duże i wahały się w granicach od 47,0 do 51,3 g/l. Oznacza to, że były prawie 3-krotnie wyższe od uzyskanych metodą tradycyjnego natleniania powietrzem atmosferycznym (tab. 1). Sucha masa grzybni przyrastała do końca czasu hodowli i była zbliżona do uzyskanej w warunkach klasycznego napowietrzania (tab. 1), co może świadczyć o braku toksycznego oddziaływania nadtlentku wodoru na wzrost grzybni (9-10). Dodawany 20% roztwór nadtlentku wodoru wpływał na rozcieńczenie pożywki. Jego zużycie wynosiło 78,2 oraz 275,1 ml odpowiednio po 24 i 48 godz. hodowli, a zatem w okresie, kiedy uzyskano najwyższe aktywności katalazy, OG oraz zawartość kwasu glukonowego. W stosunku do wyjściowej objętości podłoża (1600 ml) stanowi to jego rozcieńczenie w granicach 4,5 do 17,2%. Rozcieńczenie podłoża nie miało ujemnego wpływu na fermentację. W prezentacji wyników uwzględniano stopień rozcieńczania podłoża po każdym okresie hodowli.

Wiele danych literaturowych świadczy o korzystnym wpływie zwiększonej zawartości tlenu w środowisku hodowlanym na syntezę OG (11-13). Aktywność OG uzyskanej w warunkach natleniania była 2-krotnie wyższa w porównaniu z hodowlą napowietrzaną powietrzem atmosferycznym (11). Względne stężenie tlenu w środowisku hodowlanym niższe niż 5% jest czynnikiem ograniczającym syntezę tego enzymu przez *A. niger* (3). Jednakże w przypadku enzymu wytwarzanego przez *P. variable* niskie stężenie tlenu (1-5%) nie ma negatywnego wpływu na jego syntezę (2).

TABELA 1  
DYNAMIKA WYTWARZANIA OKSYDAZY GLUKOZOWEJ, KATALAZY ORAZ KWASU GLUKONOWEGO  
PRZEZ MUTANTA *Aspergillus niger* AM-11 NA PODŁOŻU MINERALNYM  
W WARUNKACH NIEKONWENCJONALNEGO NATLENIANIA PODŁOŻA\*

Czas hodowli (godz.)	Aktywność OG (U/ml)		Aktywność KAT (U/ml)		Glukoza (mg/ml)	Kwas glukonowy (g/l)	Sucha masa grzybni (g/l)
	Z	W	Z	W			
12	0,2	0,6	5,7	54,7	66,9	5,1	7,2
24	0,4	1,9	11,8	86,9	58,5	12,2	8,0
36	0,7	2,9	12,2	86,4	12,3	47,0	13,0
48	2,0	2,4	18,2	82,1	0,01	51,3	15,4
60	1,2	2,4	9,0	68,0	0,0	45,6	20,0
72	1,2	2,3	9,1	66,8	0,0	35,7	22,4

\*Z — zewnątrzkomórkowa OG lub KAT (katalaza), W — wewnątrzkomórkowa OG lub KAT.

W ostatnim okresie wzrasta zainteresowanie zarówno OG, jak i katalazą. Oksydaza glukozy znalazła dość szerokie zastosowanie w przemyśle, analityce oraz w niektórych działach medycyny (14-16). Również katalaza, może być stosowana w przemyśle spożywczym (do usuwania pozostałości  $H_2O_2$  wykorzystywanego do zimnej pasteryzacji mleka), tekstylnym, w medycynie i analityce (17).

Uzyskanie tych enzymów jednocześnie z kwasem glukonowym w jednym procesie technologicznym znacznie obniża koszty związane z ich wytwarzaniem. Zastosowana niekonwencjonalna metoda natleniania podłoża hodowlanego pozwala ponadto na obniżenie zużycia energii niezbędnej do napędu sprężarki powietrza w klasycznym sposobie napowietrzania, uniknięcie stosowania kosztownej emulsji odpieniającej oraz filtra mikrobiologicznego. W tabeli 2 porównano niektóre koszty napowietrzania podłoża metodą klasyczną i niekonwencjonalną. W zestawieniu kosztów nie uwzględniono ceny sprężarki powietrza i sterownika do regulacji stężenia tlenu w podłożu hodowlanym ze względu na ich porównywalne wielkości. Ponadto koszt podłoża hodowlanego w obydwu przypadkach był identyczny.

TABELA 2  
 PORÓWNANIE NIEKTÓRYCH KOSZTÓW\* NAPONOWIERZANIA METODĄ KLASYCZNA  
 I NIEKONWENCJONALNEGO SPOSOBU NATLENIANIA PODŁOŻA HODOWLANEGO W CIĄGU 24 GODZ.

Składniki kosztów klasycznego sposobu napowietrzania	Koszty (zł)
cena filtra mikrobiologicznego	10,0
cena zużytej emulsji odpieniającej	1,0
cena zużytej energii elektrycznej:	
— do mieszania podłoża (silnik 0,2 kW, praca ciągła)	1,2
— do napędu sprężarki powietrza (silnik 0,8 kW, praca cykliczna)	2,0
Razem	14,2
Składniki kosztów niekonwencjonalnego sposobu natleniania	
cena zużytej wody utlenionej	0,8
cena energii elektrycznej:	
— zużytej do mieszania podłoża (silnik 0,2 kW, praca ciągła)	1,2
Razem	2,0

\* cena 1 kWh = 0,24 zł, cena 1 kg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 3,0 zł, cena 100 ml emulsji odpieniającej (Sigma) = 44,0 zł (20 DM)

Skonstruowane urządzenie pozwala na kontrolę i automatyczne natlenianie podłoża według zaplanowanego wcześniej schematu. Do korzyści wynikających z zastosowania wymienionego sposobu napowietrzania należy zaliczyć: zwiększenie wydajności biosyntezy katalazy i kwasu glukonowego, uniknięcie zakażeń w wyniku wadliwego napowietrzania, niwelowanie dużych nakładów energetycznych na napowietrzanie. Dodatkowo obecność H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zapewnia sterylność układu aparaturowego. W stosunku do metod klasycznych znacznie wzrasta produktywność systemu, który umożliwia ponadto wykonanie ścisłego bilansu tlenowego. Natlenianie wodą utlenioną podłoża hodowlanego pozwoliło na uniknięcie jego pienienia i wypieniania się oraz wysokich kosztów emulsji odpieniającej. Istnieje także możliwość adaptacji systemu do bioremediacji zanieczyszczeń zawierających wysoko zredukowane substraty (węglowodory), wymagającej dużego stężenia tlenu w podłożu.

#### 4. Wnioski

1. Testowany sterownik do automatycznej kontroli stopnia natleniania podłoża hodowlanego pozwala na utrzymanie względnego stężenia rozpuszczonego tlenu według zaprogramowanego wcześniej schematu.

2. W wyniku zastosowania nowej metody uzyskano ponad 5-krotny przyrost aktywności wewnątrzkomórkowej katalazy oraz kwasu glukonowego (3-krotny) w porównaniu z wynikami uzyskanymi przy napowietrzaniu klasycznym.

3. Natlenianie podłoża tym sposobem pozwala ponadto na uzyskanie znacznych korzyści ekonomicznych wynikających ze zmniejszenia zużycia energii elektrycznej na pracę pompy, uniknięcie stosowania kosztownej emulsji odpeniającej oraz filtrów bakteriologicznych.

## Literatura

1. Bailey J. E., Ollis D. F., (1986), *Biochem. Eng. Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, New York.
2. Petruccioli M., Fenice M., Piccioni P., Federici F., (1995), *Enzyme Microb. 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. Jankowski T., Grajek W., (1993), *Biotechnologia*, 3, 166-182.
5. Gromada A., Fiedurek J., (1997), *J. Appl. Microbiol.*, 82, 648-652.
6. Fiedurek J., Gromada A., (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 313-316.
7. Lloyd J. B., Whelan W., (1969), *Analyt. Biochem.*, 30, 467-470.
8. Schacterle G. R., Pollack R. L., (1973), *Analyt. Biochem.*, 51, 654-655.
9. Fiedurek J., Gromada A., Pielecki J., (1998), *Acta Microbiol. Polon.*, 47, 355-364.
10. Müller H. M., (1986), *Zentralb. Mikrobiol.*, 141, 461-469.
11. Zetelaky K. Z., Vas K., (1968), *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 45-59.
12. Zetelaky K. Z., (1970), *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 379-397.
13. Witteveen C. F. B., Vondervoort P. J. I., Broeck H. C., Engelenburg F. A. C., Graff L. H., Hillebrand M. H. B. C., Schaap P. J., Visser J., (1993), *Current Genetics*, 24, 408-16.
14. Frost M. G., Moss D. A., (1987), *Biotechnology*, Eds. Rehm H. J., Reed G., 7a, 108-110, Verlagsgesellschaft, Weinheim.
15. Tina M., Sandholm M., (1989), *Internat. J. Food Microbiol.*, 8, 165-174.
16. Fiedurek J., Ilczuk Z., (1993), *Post. Mikrobiol.*, 32, 33-51.
17. Fiedurek J., Szczodrak J., (1997), *Post. Mikrobiol.*, 36, 71-83.
18. Fiedurek J., Pielecki J., (1999), Zgłoszenie patentowe nr P331-193 z 3.02.1999 r.

## Utility of unconventional oxygenation of culture in gluconic acid fermentation

### Summary

A new apparatus for controlling dissolved oxygen concentration in the culture media was tested. Using the apparatus, the automatic dosing of hydrogen peroxide (decomposed by catalase to oxygen and water) was possible, and a significant increase of dissolved oxygen, gluconic acid (3-fold) and over 5-fold intracellular catalase activity were obtained in comparison with the traditional aeration. It also minimises contamination, lowers the expenses on power consumption of aeration, reduces foaming and, consequently, high cost of antifoam emulsion and bacteriological filters.

### Key words:

unconventional oxygenation, glucose oxidase, catalase, gluconic acid, *Aspergillus niger*.

### Adres do korespondencji

Jan Fiedurek, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.