

# Wpływ temperatury na szybkość wzrostu *Aspergillus niger* w podłożach stałych

Krzysztof W. Szewczyk  
Wydział Inżynierii Chemicznej  
i Procesowej  
Politechnika Warszawska  
Warszawa

## 1. Wprowadzenie

Hodowla grzybów mikroskopowych w podłożach stałych jest używana m.in. w produkcji preparatów enzymatycznych oraz biokonwersji surowców celulozowych. Technika ta posiada wiele zalet, takich jak prostota aparatury, wysoka wydajność wytwarzania metabolitów przez mikroorganizmy wzrastające w warunkach zbliżonych do naturalnych, możliwość wykorzystywania surowców odpadowych. Podstawowa trudność hodowli w tych podłożach polega na utrzymaniu jednolitych warunków wzrostu w całym podłożu.

Podczas wzrostu mikroorganizmów wydzielane jest ciepło. Ciepło to jest przewodzone przez stałe podłoże i odprowadzane do powietrza chłodzącego podłoże. W rezultacie, w podłożu stałym powstają gradienty temperatury. Praktycznie nie jest możliwe uzyskanie izotermicznych warunków wzrostu w warunkach przemysłowych. Z tego względu badanie wpływu temperatury na szybkość wzrostu mikroorganizmów ma podstawowe znaczenie dla rozwoju inżynierii hodowli w podłożach stałych.

Przedstawiane dotychczas w literaturze modele teoretyczne opisujące szybkość przyrostu biomasy w podłożu stałym dotyczyły wzrostu w warunkach izotermicznych. Brak jest ujęć wpływu temperatury na przebieg hodowli. W odniesieniu do hodowli wgłębnych jedynie Elsner i in. [1] podjęli próbę przedstawienia modelu przyrostu biomasy w warunkach nieizotermicznych. Zaproponowali oni model reakcji enzymatycznej limitującej wzrost, wykorzystujący opis ilościowy termicznej dezaktywacji enzymów. Z uwagi na różnice w mechanizmach wzrostu w roztworach i w stałych pożywkach, model Elsnera nie może być bezpośrednio zastosowany do opisu hodowli w podłożu stałym.

Celem niniejszej pracy jest analiza możliwych modeli teoretycznych opisujących szybkość wzrostu mikroorganizmów w podłożach stałych w warunkach nieizotermicznych oraz ich weryfikacja doświadczalna.

## 2. Model wzrostu w podłożu stałym

Przedmiotem analizy będzie układ ze stałą pożywką przerastaną przez grzyby mikroskopowe. Substrat stały wraz z ewentualnymi dodatkami określany jest mianem podłoża hodowlanego. Z kolei określenie „złóże hodowlane” dotyczy złożonego składu stałej pożywki i przerastającej jej grzybni.

Można przyjąć, że szybkość przyrostu biomasy grzybni jest zależna od masy mikroorganizmów i ilości dostępnego substratu stałego [2]

$$\frac{dX}{dt} = k_g X A \quad (1)$$

Z kolei, ilość dostępnego substratu można określić jako różnicę pomiędzy początkową ilością substratu a tą „zajętą” przez grzybnię

$$A = A_0 - Y_{AX} X \quad (2)$$

gdzie  $Y_{AX}$  jest współczynnikiem proporcjonalności. W rezultacie otrzymuje się równanie na szybkość przyrostu biomasy

$$\frac{dX}{dt} = k_x X \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad (3)$$

w którym, stała szybkości przyrostu biomasy

$$k_x = k_g A_0 \quad (4)$$

jest równa maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, a  $X_m$  jest najwyższą ilością biomasy jaka może wyrosnąć w danych warunkach.

$$X_m = \frac{A_0}{Y_{AX}} \quad (5)$$

Otrzymana zależność, zwana równaniem krzywej logistycznej, była z powodzeniem stosowana do opisu kinetyki hodowli w podłożu stałym w warunkach zbliżonych do izotermicznych [3, 4]. Warunek początkowy dla tego równania wygodnie jest sformułować w postaci [5]

$$t = 0 \quad X = X_0' \quad (6)$$

gdzie  $X_0'$  jest pozorną masą inokulum. Warunek ten pozwala wyeliminować z rozważań czas fazy adaptacji.

Można przyjąć, że stała  $k_g$  zależy od temperatury zgodnie z równaniem Arrheniusa

$$k_g = k_g^0 \exp \left( - \frac{E_g}{RT} \right) \quad (7)$$

Zależność ta reprezentuje jedynie aktywujące działanie temperatury. W modelu należy ponadto uwzględnić dezaktywację termiczną mikroorganizmów.

## 2.1. RÓWNOWAGOWY MODEL DEZAKTYWACJI TERMICZNEJ

W modelu tym założymy występowanie równowagi pomiędzy aktywną i nieaktywną formą biomasy. Stała równowagi zależy od temperatury.

Zastosowanie tego sposobu rozumowania do hodowli w podłożu stałym prowadzi do równania krzywej logistycznej (3), w którym

$$X_m = \frac{A_0}{Y_{AX} (K_d + 1)} \quad (8)$$

zaś  $K_d$  jest stałą równowagi dezaktywacji. Zależność stałej równowagi od temperatury przedstawia równanie:

$$K = \exp\left(\frac{\Delta S_d^0}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta h_d^0}{RT}\right) = K_d^0 \exp\left(-\frac{\Delta h_d^0}{RT}\right) \quad (9)$$

gdzie  $\Delta S_d^0$  jest standardową entropią dla dezaktywacji zaś  $\Delta h_d^0$  standardową entalpią dezaktywacji.

Zgodnie z podanym modelem, wraz ze wzrostem temperatury rośnie wartość maksymalnej właściwej szybkości wzrostu, maleje natomiast wartość graniczna ilości biomasy mikroorganizmów w złożu.

## 2.2. MODEL REAKCJI LIMITUJĄCEJ

W modelu tym, przyjmiemy podobnie jak Elsner i in. [1], że szybkość przyrostu biomasy zależy od pewnej przemiany enzymatycznej, której zależność od temperatury zgodna jest z równaniem Arrheniusa, zatem

$$k_g = k_E C_E \exp\left(-\frac{E_E}{RT}\right) \quad (10)$$

gdzie  $C_E$  jest stężeniem enzymu kontrolującego przebieg reakcji limitującej. Taka metoda opisu szybkości przyrostu biomasy w hodowli wglębnej została zaproponowana przez Pirta [6]. Można przyjąć, że kluczowy enzym występuje w dwóch odmianach: aktywnej i nieaktywnej — między którymi występuje równowaga zależna od temperatury. Prowadzi to do równania na szybkość przyrostu biomasy zgodnego z zależnością krzywej logistycznej (3), przy czym stała szybkości  $k_x$  zależy od temperatury

$$k_x = \frac{k_x^0 \exp\left(-\frac{E_E}{RT}\right)}{1 + K_d^0 \exp\left(-\frac{\Delta h_d^0}{RT}\right)} \quad (11)$$

gdzie  $\Delta h_d^0$  jest, w tym przypadku, entalpią przemiany formy aktywnej enzymu w nieaktywną.

Model ten przewiduje występowanie maksimum w zależności stałej szybkości przyrostu biomasy od temperatury.

### 2.3. MODEL KINETYCZNY

Przyjmujemy, że szybkość dezaktywacji termicznej biomasy można opisać kinetyką pierwszorzędową

$$r_d = k_d X \quad (12)$$

gdzie stała  $k_d$  zależy od temperatury zgodnie z zależnością Arrheniusa. Model ten jest powszechnie stosowany do opisu śmierci termicznej mikroorganizmów podczas sterylizacji.

Wprowadzając (12) do równań na przyrost biomasy (1), otrzymuje się równania na szybkość przyrostu netto biomasy mikroorganizmów zgodne z równaniem krzywej logistycznej (3), w którym

$$k_x = A_0 \left[ k_g^0 \exp\left(-\frac{E_g}{RT}\right) - k_d^0 \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right) \right] \quad (13)$$

$$X_m = \frac{k_g^0 \exp\left(-\frac{E_g}{RT}\right) - k_d^0 \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right)}{k_g^0 \exp\left(-\frac{E_g}{RT}\right)} \frac{A_0}{Y_{XA}} \quad (14)$$

Zarówno w tym jak i w modelu reakcji limitującej, stała szybkości  $k_x$  wykazuje również maksimum w zależności od temperatury.

## 3. Materiały i metody

W badaniach stosowano szczep *Aspergillus niger* K-41/4 z kolekcji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Do zaszczenia podłoża używano siedmiodniowe kultury mikroorganizmów na skosach agarowych. Zarodniki zmywano w warunkach jałowych z powierzchni skosów roztworem płynu *Tween 80*. Przygotowany roztwór inokulum dolewano do podłoża, dokładnie mieszając.

Mieszaninę otrąb pszennych (80%) i wysłodków buraczanych, którego (20%) stosowano jako podłoże hodowlane, wilgotność po sterylizacji wynosiła 60 %.

W badaniach wykorzystano zestaw kolumnowych reaktorów szklanych o średnicy 30 mm i wysokości 220 mm umieszczonych w kąpeli termostatującej. Każdy reaktor posiadał indywidualne doprowadzenie nawilżonego powietrza. Natężenie przepływu powietrza dla pojedynczego reaktora wynosiło  $6,5 \text{ dm}^3/\text{h}$ .

Stężenie dwutlenku węgla w gazach opuszczających reaktory mierzono analizatorem ULTRAMAT. Wilgotność złoża oraz zmiany jego suchej masy oznaczano metodą wagową po wysuszeniu próbki przez 24 godziny w temperaturze  $105^\circ\text{C}$ .

#### 4. Wyniki

W przeprowadzonych badaniach szybkość przyrostu biomasy oznaczano na podstawie szybkości wydzielania dwutlenku węgla, gdzie  $Y_{\text{CX}}$  jest pewnym współczynnikiem proporcjonalności zaś  $m_X$  jest szybkością przemiany podsta-

$$J_{\text{CO}_2} = \frac{dN_{\text{CO}_2}}{dt} = Y_{\text{CX}} \left( \frac{dX}{dt} + m_X X \right) \quad (15)$$

wowej. Przyjmując, że szybkość przyrostu biomasy mikroorganizmów opisywana jest krzywą logistyczną, otrzymuje się

$$J_{\text{CO}_2} = k_X N_{m, \text{CO}_2} X^* (1 + \beta - X^*) \quad (16)$$

gdzie

$$N_{m, \text{CO}_2} = Y_{\text{CX}} X_m \quad (17)$$

$$\beta = \frac{m_X}{k_X} \quad (18)$$

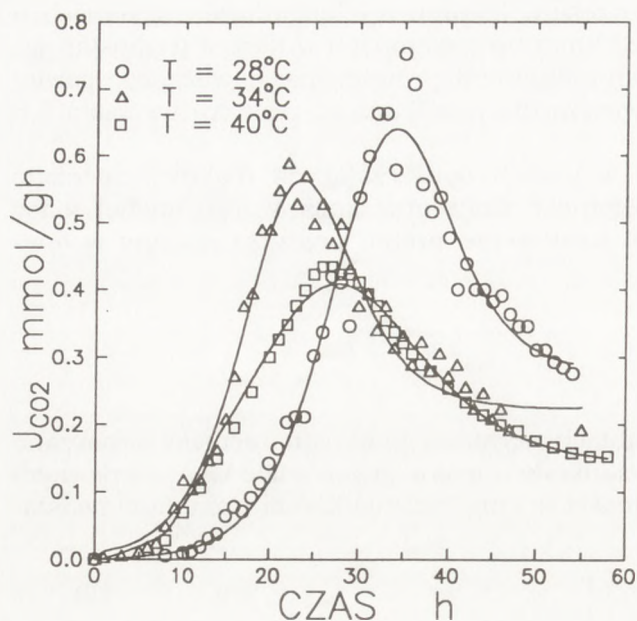
zaś  $X^*$  jest bezwymiarowym stężeniem biomasy, które można wyznaczyć z równania

$$X^* = \frac{1}{1 + \frac{1 - X_0^*}{X_0^*} \exp(-k_X t)} \quad (19)$$

gdzie

$$X_0^* = \frac{X_0'}{X_m} \quad (20)$$

Przykładowe przebiegi szybkości wydzielania dwutlenku węgla podczas hodowli w temperaturach  $28^\circ\text{C}$ ,  $34^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  przedstawione na rys. 1. Zmiany szybkości wydzielania dwutlenku węgla podczas hodowli są zgodne z równaniem krzywej logistycznej. Wyniki doświadczeń posłużyły do wyznaczenia parametrów modelu:  $k_X$ ,  $N_{m, \text{CO}_2}$ ,  $X_0^*$ ,  $\beta$ . Liniami ciągłymi zaznaczono na rys. 1



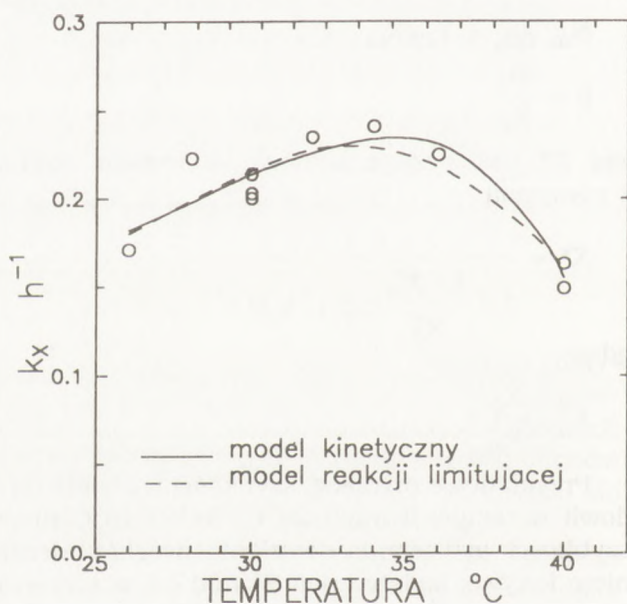
Rys. 1. Szybkość wydzielania dwutlenku węgla dla hodowli w różnych temperaturach.

wyniki aproksymacji teoretycznej. Uzyskano dobrą zgodność danych doświadczalnych z modelem teoretycznym. Średni błąd nie przekraczał 3%.

Zależność stałej szybkości przyrostu biomasy  $k_X$  od temperatury przedstawiono na rys. 2. W badanym zakresie wartość  $k_X$  wzrasta wraz z temperaturą dla temperatur poniżej 34 °C, po czym maleje przy dalszym jej wzro-

ście. Taki przebieg zależności jest zgodny z modelem kinetycznym dezaktywacji termicznej oraz z modelem reakcji limitującej.

Linia ciągłą, przedstawiono na rys. 2 przebieg zależności zgodnie z modelem kinetycznym dla parametrów:  $(k_g^0 A_0) = 4,5 \cdot 10^5 \text{ h}^{-1}$ ,  $(k_d^0 A_0) = 7,6 \cdot 10^{35} \text{ h}^{-1}$ ,  $E_g = 36,5 \text{ kJ/mol}$ ,  $E_d = 219 \text{ kJ/mol}$ , wyznaczonych metodą regresji nieliniowej. Średni błąd estymacji wyniósł 1,1%. Wartość energii aktywacji dla śmierci termicznej mikroorganizmów wynosi od 200 do 400 kJ/mol [7]. Wyznaczona w doświadczeniach wartość 219 kJ/mol jest zatem zgodna z danymi literaturowymi. Energia aktywacji wzrostu wg Wanga i in. [8] dla wglębnych hodowli mikroorganizmów

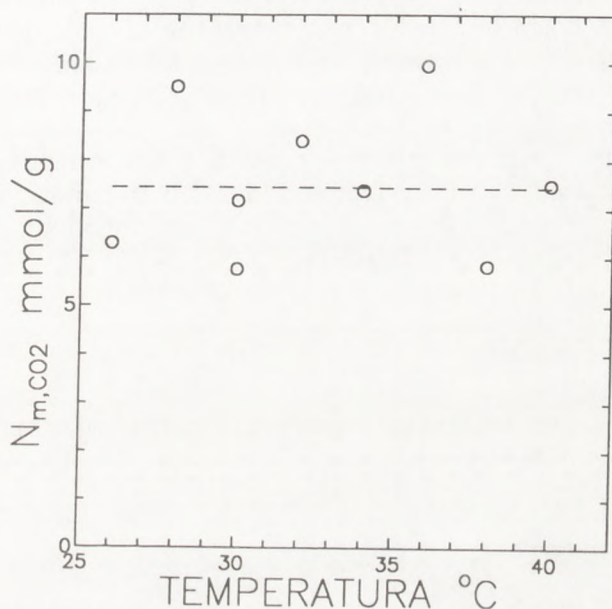


Rys. 2. Zależność stałej szybkości przyrostu biomasy od temperatury.

wynosi 60 – 80 kJ/mol. Wyznaczona w doświadczeniach wartość jest nieco mniejsza.

Linia przerywaną przedstawiono na rys. 2 przebieg zależności zgodnie z modelem reakcji limitującej dla parametrów:  $k_x^0 = 2,9 \cdot 10^7 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_d^0 = 7,2 \cdot 10^{36} \text{ h}^{-1}$ ,  $E_E = 46,8 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta h_d^0 = 220 \text{ kJ/mol}$ , wyznaczonych metodą regresji nieliniowej. Względny błąd estymacji wyniósł 1,2%. Uzyskana wartość entalpii dezaktywacji jest zbliżona do wartości podawanych w literaturze przez Elsnera i in. [1] dla hodowli wgłębnej (288 kJ/mol). Wyznaczona wartość energii aktywacji dla wzrostu (46,8 kJ/mol) jest prawie dwa razy mniejsza od wartości wyznaczonej dla wzrostu bakterii *Klebsiella pneumoniae* na glicerolu (86,5 kJ/mol) [1].

Zależność parametru  $N_{m, CO_2}$  od temperatury przedstawiono na rys. 3. Wartość tego parametru jest proporcjonalna do maksymalnej ilości biomasy. Wyznaczone wartości  $N_{m, CO_2}$  dla różnych temperatur wahają się wokół pewnej wartości przeciętnej. Można przyjąć, że parametr  $N_{m, CO_2}$  nie zależy od temperatury, a zatem, że również maksymalna ilość biomasy mikroorganizmów  $X_m$  nie jest zależna od temperatury. Wynik ten jest zgodny z modelem reakcji limitującej.



Rys. 3. Zależność parametru  $N_{m, CO_2}$  od temperatury.

## 5. Wnioski

Przedstawiono analizę wpływu temperatury na szybkość przyrostu biomasy w hodowli w podłożu stałym. Przedyskutowano trzy możliwe modele ujmujące efekt termicznej dezaktywacji komórek: równowagowy, reakcji limitującej oraz kinetyczny. Wyprowadzono, dla nich, zależności parametrów modeli od temperatury. Wykazano, że przyrost biomasy w warunkach niezotermicznych może być opisywany równaniem krzywej logistycznej. Wyniki badań wzrostu

grzybów mikroskopowych *Aspergillus niger* w podłożu stałym są zgodne z przewidywaniami reakcji limitującej. W modelu kinetycznym dobrze opisane są zmiany wartości stałej szybkości przyrostu biomasy ( $k_X$ ), zaś uzyskane wartości energii aktywacji dla procesów wzrostu i dezaktywacji są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi hodowli wglębnej. Dane doświadczalne wskazują, że w badanym przedziale temperatur, maksymalna ilość biomasy mikroorganizmów jest niezależna od temperatury.

### Wykaz oznaczeń

A — ilość dostępnego substratu; E — energia aktywacji;  $\Delta h_d^0$  — standardowa entalpia dezaktywacji;  $K_d$  — stała równowagi dezaktywacji;  $K_d^0$  — parametr, równanie (9);  $k_d$  — stała szybkości dezaktywacji biomasy;  $k_d^0$  — parametr;  $k_g$  — stała szybkości;  $k_g^0$  — parametr, równanie (7);  $k_X$  — stała szybkości przyrostu biomasy w równaniu krzywej logistycznej;  $k_X^0$  — parametr; R — stała gazowa;  $m_X$  — współczynnik szybkości przemiany podstawowej (podtrzymania funkcji życiowych);  $N_{CO_2}$  — ilość wydzielanego dwutlenku węgla;  $N_{m, CO_2}$  — parametr modelu;  $\Delta S_d^0$  — standardowa entropia dezaktywacji; T — temperatura; t — czas; X — ilość biomasy mikroorganizmów;  $X^*$  — bezwymiarowa ilość biomasy mikroorganizmów;  $Y_{AX}$  — współczynnik proporcjonalności;  $Y_{CX}$  — współczynnik proporcjonalności;  $\beta$  — względny współczynnik przemiany podstawowej

### Indeksy:

0 — wartość początkowa; d — dezaktywacja; E — reakcja enzymatyczna; g — wzrost.

### Literatura

1. Elsner A.A., Roels J.A., Kossen N.W.F., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 14 – 1405.
2. Szewczyk K.W., (1987), *Prace Inst. Inż. Chem.*, XVI, 141–160.
3. Szewczyk K.W., Mroczek J., Mysza L., Kot M., (1989), *Prace Inst. Inż. Chem. PW*, XVIII, 37 – 47.
4. Okazaki N., Sumaga S., Tanaka T., (1980), *J. Ferment. Technol.*, 50, 471 – 476.
5. Szewczyk K.W., Mroczek J., (1992), *Materiały XIV Ogólnopolskiej Konferencji Inżynierii Chemicznej i Procesowej*, Kraków, 132 – 138.
6. Pirt S.J., (1975), *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific Publication, London.
7. Bailey J.E., Ollis D.F., (1987), *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw Hill, New York, 443.
8. Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., A.E. Humphrey, Lilly M.D., (1979), *Fermentation and Enzyme Technology*, J. Wiley&Sons, New York.



## The influence of temperature on solid state culture of *Aspergillus niger*

### Summary

Models of temperature effects on solid state fermentation kinetics are discussed. It was shown that logistic curve equation describes fungi growth also in nonisothermal conditions. Cultivation of *Aspergillus niger* on mixture of wheat bran and beet pulp was investigated in the temperature range of 26 – 40 °C. Models were compared with experimental results and energy of activation and deactivation were calculated.

### key words:

growth models, solid state fermentation, *Aspergillus niger*.

### Adres do korespondencji:

Krzysztof W. Szewczyk, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej, ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa.