

ANNA ANTECKA
STANISŁAW LEDAKOWICZ

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Biosynteza lakazy i wzrost *Cerrena unicolor* w hodowli wgłębnej

Wprowadzenie

Dobór odpowiednich warunków hodowli mikroorganizmów jest szczególnie istotny, gdyż od niego zależy wzrost biomasy i aktywność metabolitów. Wielokrotnie wykazano, że synteza grzybowych enzymów ligninolitycznych jest ściśle związana z ilością źródła węgla i azotu w podłożu [1–3]. Stwierdzono, że u grzybów przemiany metabolizmu wtórnego inicjowane są niedoborem tych substratów w podłożu hodowlanym [4]. Powodem wydzielania lakazy jest potrzeba znalezienia nowego substratu stanowiącego źródło łatwo przyswajalnego węgla. W warunkach naturalnych wiąże się to z procesem rozkładu ligninocelulozy. Natomiast w hodowlach na podłożach syntetycznych pojawienie się lakazy jest najczęściej związane ze zużyciem źródła węgla [5]. Jak wykazano uprzednio na podstawie procesów prowadzonych w kolbach wstrząsanych [5] w momencie wyczerpania glukozy następuje przyrost poziomu aktywności lakazy, czyli produkcja enzymów zewnątrzkomórkowych. Towarzyszy temu nagły spadek stężenia biomasy wskazujący na negatywną zależność pomiędzy wzrostem biomasy a produkcją enzymu.

Hodowle w 100 cm³ kolbach są jednak niewystarczające, aby móc w pełni ocenić i zbadać wpływ wszystkich parametrów warunkujących wzrost grzybni i biosyntezę enzymów. Aby tego dokonać należy powiększyć skalę procesu i przeprowadzić weryfikację otrzymanych zależności. Dlatego też celem niniejszej pracy było zbadanie procesu wzrostu *C. unicolor* i biosyntezy lakazy w hodowli wgłębnej w 15-sto litrowym reaktorze zbiornikowym. Ponadto przeprowadzono analizę porównawczą hodowli reaktorowej względem wcześniejszych wyników uzyskanych z procesów prowadzonych w kolbach wstrząsanych.

Materiały i metody

Hodowle prowadzono w bioreaktorze zbiornikowym BIO-STAT ED firmy *B-Braun* (Niemcy) sterowanym komputerowo. Bioreaktor miał objętość roboczą równą 15 dm³ i wyposażony był w mechaniczne mieszanie z zainstalowanym mieszadłem łopatkowym. Hodowle prowadzono na zmodyfikowanym podłożu wg *Lindeberg* i *Holm* [5, 6] sterylizowanym termicznie w bioreaktorze. Zaszczepiano homogenizowaną grzybnią (inokulum) w ilości 750 cm³. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C, przy początkowym natężeniu przepływu powietrza 0,5 Ndm³·min⁻¹, prędkość obrotowa mieszadła wynosiła 100 obr·min⁻¹. Podczas hodowli możliwy był pomiar on-line następujących parametrów: temperatury, pH podłoża, nasycenia podłoża tlenem (pO₂), prędkości obrotowej mieszadła wyrażonej w obrotach na minutę, natężenia przepływu doprowadzanego powietrza. Próbkę w ilości około

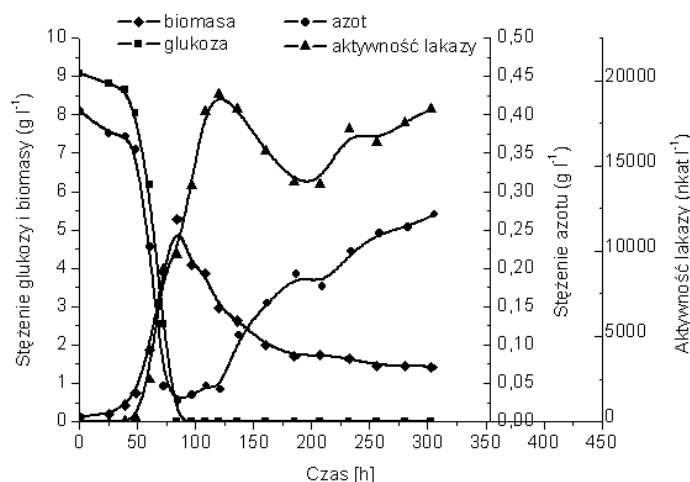
60 cm³ pobierano początkowo co 8 bądź 12 godzin, a następnie wraz ze zmniejszeniem szybkości procesu co 1–2 dni w dwóch powtórzeniach. Po oddzieleniu grzybni metodą filtracji na filtrach bibułowych 389 firmy *Filtrak* w otrzymanym przesączu pochodzonym oznaczano stężenie glukozy, azotu, aktywność lakazy, suchą masę oraz pH.

Zawartość glukozy oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (*Waters* 600, USA) w warunkach izokratycznych. Stężenie azotu oznaczano alkacymetrycznie po uprzedniej mineralizacji i oddestylowaniu próby z parą wodną przy użyciu aparatu do destylacji B 324 firmy *Büchi* (Szwajcaria) zgodnie z metodą podawaną przez firmę (*Büchi*, 2000). Biomassę oznaczano metodą grawimetryczną jako suchą masę. Aktywność lakazy oznaczano metodą spektrofotometryczną z 0,5 mM syryngaldazyną [7] w buforze *McIlvaine'a* pH 5,6 przy długości fali 525 nm w temperaturze 25°C używając spektrofotometru firmy UNICAM. Czas reakcji wynosił 60 sekund. Tak wyznaczoną aktywność lakazy wyrażano w nkat/l.

Dyskusja wyników

Warunki hodowli reaktorowej zostały tak dobrane, aby odpowiadały optymalnym parametrom wyznaczonym dla hodowli w kolbach wstrząsanych [5]. Pozostałe parametry, jak szybkość obrotów mieszadła, czy ilość dostarczanego powietrza, zostały przyjęte na podstawie wyników eksperymentów prowadzonych uprzednio w *Katedrze Inżynierii Bioprocessowej* [8].

Zmiany stężeń substratów, produktu i wzrostu biomasy przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Zmiany stężenia glukozy, azotu, biomasy i aktywności lakazy w czasie hodowli *C. unicolor*

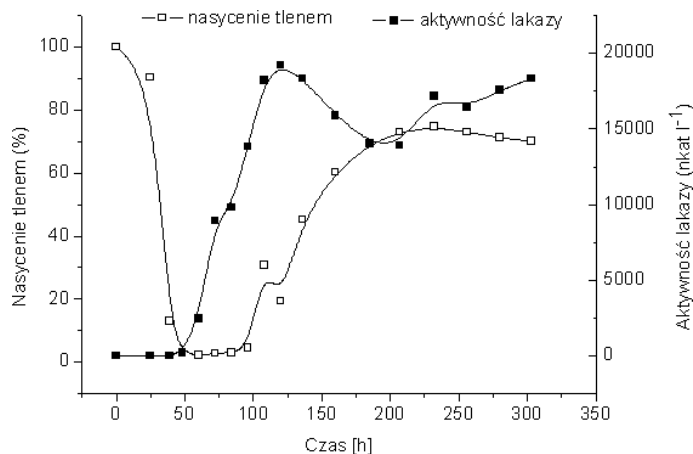
Wzrost *C. unicolor* (Rys. 1) rozpoczynała wyraźna faza adaptacji (lag-faza) trwająca około 48 godz., podczas której nie następował ani wzrost grzybni, ani asymilacja substratów. Faza ta, w przypadku opisywanej hodowli reaktorowej, była dwukrotnie dłuższa niż to miało miejsce dla hodowli wstrząsanych w kolbach. Świadczy o to tym, iż zwiększenie objętości hodowli powoduje wydłużenie czasu adaptacji organizmu do środowiska. Po tym okresie następowała typowa faza wykładniczego wzrostu biomasy, podczas której obserwowano równomierne zużycie źródeł węgla i azotu. W 84 h procesu wraz z wyczerpaniem się substratów nastąpił koniec fazy wzrostu i równocześnie był to moment bardzo wyrazistego maksimum stężenia biomasy, które wyniosło $5,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Po tym czasie stężenie biomasy gwałtownie malało, żeby w ok. 200 h procesu osiągnąć wartość poniżej $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Krzywa obrazująca stężenie azotu do chwili osiągnięcia wartości minimalnej odzwierciedla zużycie L-asparaginy a ponowny jej wzrost reprezentuje produkcję enzymu.

W przeprowadzonej hodowli reaktorowej zaobserwowano dużo wcześniejsze niż dla hodowli w kolbach pojawienie się zewnątrzkomórkowej lakazy. Produkcja enzymu rozpoczęła się już w 60 h procesu i dalej aktywność lakazy gwałtownie wzrastała aż do osiągnięcia w 120 h hodowli wartości maksymalnej równej około $20000 \text{ nkat} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Zaskakująco wydzielanie lakazy rozpoczęło się w momencie, kiedy oba substraty były jeszcze obecne w podłożu. Taka obserwacja wydaje się być niezgodna z wnioskami wysnutymi na podstawie hodowli wstrząsanych, gdzie lakaza była wydzielana w momencie braku substratów, a głównie glukozy w podłożu [4, 5]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że moment rozpoczęcia wydzielania lakazy do układu koreluje się dokładnie z chwilą, gdy w podłożu ma miejsce nagły spadek stężenia tlenu (Rys. 2).

Nasylenie podłoża tlenem spadło gwałtownie w drugiej dobie tak, że w 60 godzinie trwania procesu osiągnęło wartość około 2% (Rys. 2). Prawdopodobnie fakt ten stanowi dla grzyba stres, następuje zakłócenie metabolizmu i odpowiedzią na to jest wydzielanie zewnątrzkomórkowej lakazy.

W hodowlach wstrząsanych w kolbach, gdzie objętość była 150 razy mniejsza, problem napowietrzenia hodowli w ogóle nie występował. Uznawano w nich, że stężenie tlenu jest na wystarczającym poziomie. Dlatego też nie dało się zaobserwować wpływu odpowiedniego natlenienia na hodowlę, a pierwszym czynnikiem stymulującym produkcję lakazy był brak substratów głównie źródła węgla w podłożu.



Rys. 2. Zmiany natlenienia podłoża i aktywności lakazy w czasie hodowli *C. unicolor*

Podsumowanie

Szczep z gatunku *Cerrena unicolor* należący do grzybów z klasy *Basidiomycetes* jest wrażliwy na warunki wzrostu w hodowli wglębnej.

Wyniki otrzymane z hodowli w reaktorze z mieszadłem łopatkowym ukazały kolejny czynnik przyspieszający wydzielanie zewnątrzkomórkowej lakazy, a mianowicie niską zawartość tlenu rozpuszczonego w podłożu hodowlanym. Parametr ten, nie uwzględniany w hodowlach wstrząsanych, okazał się zatem bardzo istotny dla wzrostu mikroorganizmu i produkcji metabolitów wtórnych. Ponadto, w hodowli reaktorowej otrzymano wyższe aktywności lakazy, niż w hodowlach wstrząsanych.

LITERATURA

1. G. Janusz, J. Rogalski, J. Szczodrak: World J. Microbiol. Biotechnol. **23**, 1459 (2007).
2. A.P.M. Tavares, M.A.Z. Coelho, J.A.P. Coutinho, A.M.R.B. Xavier: J. Chem. Technol. Biotechnol. **80**, 669 (2005).
3. T. Mester, M. Pena, J.A. Field: Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**, 778 (1996).
4. C. Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich: Enz. Microb. Tech. **30**, 529 (2002).
5. A. Anteck, M. Bizukojć, S. Ledakowicz: Biotechnologia **2**, 81, 90 (2008).
6. G. Lindeberg, G. Holm: Physiol. Plant **5**, 100 (1952).
7. A. Leonowicz, K. Grzywnowicz: Enz. Microbiol. Technol. **3**, 55 (1981).
8. T. Jamroz, B. Sencio, S. Ledakowicz: J. Biotechnol. **131**, 161 (2007).