

TERESA JAMROZ
BARBARA SENCIO
STANISŁAW LEDAKOWICZ

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Proces biosyntezy lakazy w fermentorach różnej konstrukcji

Wprowadzenie

W ostatnich latach intensywnie badano oksydazy polifenolowe wytwarzane przez grzyby zaliczane do klasy *Basidiomycetes*, które odpowiedzialne są za biodegradację ligniny. Przykładem tak zwanych *niebieskich oksydaz* katalizujących utlenianie wielu organicznych i nieorganicznych substratów jest *para dwu* fenolowa oksydaza EC 1.10.3.2. będąca miedzioproteiną potocznie zwana lakazą. Biologiczna rola lakazy nie została jeszcze do końca poznana i wydaje się być różna w zależności od wytwarzającego ją organizmu. Źródłem jej pozyskiwania są głównie grzyby tak zwanej *białej zgnilizny drewna*. Najbardziej znane pod względem wytwarzania lakazy są gatunki: *Bjerkandera fumosa*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* i *Cerrena unicolor*. Grzyby te charakteryzują wytwarzanie kompleksu enzymatycznego, który uczestniczy w procesie biodegradacji ligniny, będącej nie hydrolizowaną częścią drewna [1].

W warunkach laboratoryjnych podejmuje się szereg prób z wieloma organizmami w celu zwiększenia ilości wytwarzania lakazy. Duże możliwości w tym zakresie stwarza dobór odpowiedniej konstrukcji aparatury zapewniającej korzystne warunki dla rozwoju aktywnej grzybni produkującej enzym w hodowli wgłębnej [2].

Celem niniejszej pracy była analiza warunków prowadzenia hodowli szczepu *Cerrena unicolor* w fermentorach różnej konstrukcji dla uzyskania najwyższej aktywności grzybni.

Metody i materiały

Badania biosyntezy lakazy przy udziale grzybów z gatunku *Cerrena unicolor* prowadzono w hodowli wgłębnej w zmodyfikowanym podłożu *Lindberga Holma* [3] przez okres 21 dni. Eksperymenty wykonywane były w trzech różnych typach fermentorów: w fermentorze mieszadłowym *Biostat ED* o objętości całkowitej 20 dm³, z mieszadłem łopatkowym, w fermentorze bezmieszadłowym z cyrkulacją wewnętrzną *Biostat ED* typu *air-lift* o objętości całkowitej 20 dm³, w fermentorze dyskowym o objętości całkowitej 10 dm³ wyposażonym w 12 dysków umieszczonych na poziomym wale.

Stężenie enzymu w płynie pohodowlanym oznaczano według metody *Leonowicza* [4].

Wyniki badań

Hodowle wgłębne szczepu *C. unicolor* wykazały intensywny wzrost grzybni w ciągu pierwszych 8–10 dni prowadzenia procesu, natomiast najwyższy poziom wytwarzanej lakazy uzyskiwano po 12–14 dniach. Po tym czasie następowało ob-

niżenie stężenia lakazy, co wskazywałoby na możliwość skrócenia czasu hodowli w przypadku tego szczepu.

W fermentorze mieszadłowym wyposażonym w mieszadła łopatkowe prowadzono hodowle *C. unicolor* przy różnych wariantach mieszania i napowietrzania. Zastosowana konstrukcja mieszadła umożliwiła zmniejszenie naprężeń ścinających dla rozwijającej się grzybni i zapewniła dobre warunki napowietrzania płynu hodowlanego. W badaniach zastosowano trzy szybkości obrotów wału mieszadła (100, 200, 300 min⁻¹) i dwie intensywności napowietrzania (0,05; 0,1 vvm).

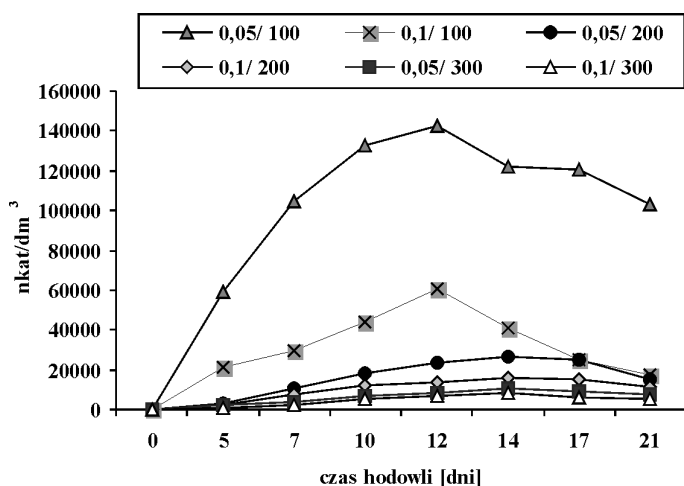
Dla porównania zdolności wytwarzania lakazy prowadzono badania w fermentorze bezmieszadłowym, przy różnej intensywności napowietrzania hodowli (0,5; 1,0; 1,5 vvm).

Kolejnym aparatem uwzględnionym w badaniach był fermentor dyskowy, gdzie procesy przeprowadzono przy trzech szybkościach wału mieszadła: 10, 20, 30 min⁻¹ oraz przy napowietrzaniu 0,5 i 1,0 vvm.

Tablica 1
Biosynteza lakazy przez *C. unicolor* w fermentorach różnej konstrukcji

Typ fermentora	Obroty	Napowietrzanie hodowli	Stężenie tlenu rozpuszczonego	Szybkość tworzenia lakazy
	[min ⁻¹]			
Mieszadłowy <i>Biostat ED</i>	100	0,05	<1	142 000
		0,10	<20	60 890
	200	0,05	60–70	26 250
		0,10	60–70	15 900
Bzmieszadłowy <i>Biostat ED</i>	300	0,05	>70	10 250
		0,10	>70	8 240
		0,5	<20	60 000
	10	1,0	30–40	39 000
		1,5	>70	14 350
		0,5	>45	4 840
Dyskowy (12 dysków)	20	1,0	>50	3 750
		0,5	>45	3 280
	30	1,0	>60	1 620
		0,5	>45	1 960
	10	1,0	>60	980
		0,5	>45	1 960

Na postawie wykonanych badań stwierdzono, że w zależności od zastosowanego typu aparatury uzyskano bardzo zróżnicowaną szybkość tworzenia enzymu (Tabl. 1). Najlepszym wariantem konstrukcyjnym dla wzrostu szczepu *C. unicolor*



Rys. 1. Dynamika tworzenia lakazy w fermentorze *Biostat ED* z mieszadłem łopatkowym w zależności od stopnia natleniania (vvm 0,05 i 0,1) i szybkości obrotów mieszadła (100, 200, 300 min⁻¹)

o wysokiej zdolności wytwarzania lakazy okazał się fermentor mieszadłowy *Biostat ED* z zamontowanymi mieszadłami łopatkowymi. Zaletą tego układu mieszającego było to, że obieg mieszanej cieczy był osiowy, co polepszało mieszanie w pobliżu dna i zapobiegało sedymentacji komórek grzybni, a także powodowało dobrą dyspersję powietrza nawet przy małych obrotach. Przy zastosowaniu najniższej szybkości mieszania 100 obrotów na minutę i napowietrzania hodowli na poziomie 0,05 vvm uzyskano po 14 dniach prowadzenia procesu najwyższe stężenie lakazy 142 000 nkat/dm³ w płynie pohodowlanym. Przy wyższym napowietrzaniu na poziomie 0,1 vvm otrzymano prawie o połowę mniej tego cennego enzymu, natomiast w przypadku zastosowania wyższych obrotów mieszadła stwierdzano obecność niewielkich ilości wytwarzanego enzymu niezależnie od intensywności napowietrzania. Zawartość tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym zmieniała się w tych warunkach w szerokim zakresie i wynosiła od 30–70%.

Jak wykazały wyniki przeprowadzonych badań w fermentorze mieszadłowym najlepsze rezultaty osiągnięto w hodowli, gdzie ilość tlenu rozpuszczonego była niewielka i nie przekraczała poziomu 1%. Obecność tlenu rozpuszczonego w płynie powyżej 20% działała już inhibitująco na proces tworzenia lakazy przez szczep *C. unicolor*.

Analiza przebiegu procesów biosyntezy lakazy prowadzonych w fermentorze bezmieszadłowym typu *air-lift* wykazała, iż pomimo tego, że konstrukcja aparatu zapewniała łagodne warunki mieszania, nie uzyskano wysokiej wydajności produkcji lakazy. W przypadku tego aparatu najwyższe uzyskane stężenie enzymu wynosiło ok. 60 000 nkat/dm³. Ilość tlenu rozpuszczonego w płynie hodowlanym utrzymywała się na poziomie ok. 20%, podobnie jak w przypadku fermentora mie-

szadłowego z zastosowaniem 100 obr/min i napowietrzanie 0,1 vvm. W pozostałych hodowlach, gdzie zawartości rozpuszczonego tlenu były wyższe produkcja lakazy była znacznie mniejsza.

W oparciu o wyniki kontroli hodowli szczepu *C. unicolor* w fermentorze dyskowym, można stwierdzić, że aparat tego typu nie stwarzał korzystnych warunków dla wzrostu i rozwoju szczepu. Pomimo utrzymywania warunków łagodnego mieszania, jakie zapewniała konstrukcja tego aparatu, szczep wytwarzał lakazę w niewielkiej ilości. Wydajność produktu oraz szybkość tworzenia lakazy w tym przypadku charakteryzowały najniższe wartości jakie otrzymano dla procesów prowadzonych w fermentorze mieszadłowym i bezmieszadłowym. Jak potwierdziły badania w pierwszej fazie procesu następowało obrastanie dysków przez grzybnię, po czym w miarę trwania hodowli obserwowano odrywanie się biomasy od dysków i opadanie na dno zbiornika. Ilość rozpuszczonego tlenu w podłożu w czasie prowadzenia hodowli utrzymywała się na poziomie 45–60%. Konstrukcja tego fermentora nie spełniła założonych oczekiwań, gdyż w hodowlach trudno następował rozwój grzybni, której aktywność była najniższa i nie przekraczała 5000 nkat/dm³.

Wnioski

Możliwości przemysłowego wykorzystania enzymów związane są ściśle z opracowaniem korzystnych technik ich wytwarzania. W procesie otrzymywania enzymów przy udziale mikroorganizmów ważną rolę odgrywa typ bioreaktora. Podstawowym jego zadaniem jest zapewnienie optymalnych warunków w każdej fazie życia szczepu produkcyjnego

1. Proces biosyntezy lakazy przy udziale szczepu *Cerrena unicolor* przebiegał z różną wydajnością w zależności od konstrukcji aparatu i warunków prowadzenia hodowli.
2. Istotnym parametrem w procesie hodowli szczepu *C. unicolor* okazało się utrzymywanie odpowiednio niskiej ilości tlenu rozpuszczonego w płynie hodowlanym.
3. Najlepszym typem aparatu dla biosyntezy lakazy przez badany szczep był fermentor mieszadłowy, gdzie stężenie enzymu osiągnęło wartość 142000 nkat/dm³.
4. W fermentorze bezmieszadłowym typu *air-lift* otrzymano ok. 2,5 razy mniej lakazy niż w fermentorze mieszadłowym.
5. Fermentor dyskowy nie nadaje się do biosyntezy lakazy, gdyż nie zapewnia warunków odpowiednich dla wzrostu grzybni *C. unicolor*.

LITERATURA

1. A. Jarosz-Wilkotłazka, A. Michniewicz, E. Malarczyk, S. Leonowicz: Inż. Ap. Chem. 41, nr 3s, 59 (2002).
2. T. Jamroz, Z. Żakowska, B. Sencio: Inż. Chem. i Proc., 26, Łódź (1999).
3. T. Jamroz, B. Sencio: Proc. of 11th ECB P 206, 84 (2003).
4. A. Leonowicz, K. Grzywnowicz: Enzyme Microb. Technol., 3, 55 (1981).