

Joanna GONCIARZ, Marta PAWLAK, Marcin BIZUKOJĆ

e-mail: joanna.gonciarz@wp.pl

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Wymuszanie zmian formy morfologicznej grzybni *Aspergillus terreus* poprzez dodatek nieorganicznych mikrocząstek

Wstęp

Aspergillus terreus jest producentem lowastatyny. Ten wtórny metabolit jest wykorzystywany jako lek obniżający poziom endogennego cholesterolu w organizmie człowieka. Z różnych źródeł literaturowych wynika, że *Aspergillus terreus* podczas biosyntezy lowastatyny rośnie w postaci makroskopowych peletek o średnicy kilku milimetrów. Dowiedzono, że wielkość peletek w hodowli, a także sama forma morfologiczna ma wpływ na produktywność grzyba. [Bizukojć i Ledakowicz, 2009]. W tym kontekście interesującym zagadnieniem jest możliwość sterowania wielkością peletek.

Dotychczas badania mające na celu sterowanie wielkością peletek grzybów strzępkowych prowadzono z *Aspergillus niger* [Driouch i in., 2011] oraz z *Caldariomyces fumago* [Kaup i in., 2007]. Badano wpływ na wielkość peletek różnych czynników m.in. lepkości podłoża [O'Cleirgh i in., 2005], szybkości napowietrzania [Kelly i in., 2004], a także dodatku nieorganicznych mikrocząstek. Stosowanie nieorganicznych mikrocząstek jako czynnika wymuszającego zmianę wielkości peletek w ostatnich latach stało się przedmiotem badań i zapoczątkowało dziedzinę wiedzy zwaną inżynierią morfologii. Zaobserwowano, że użycie nieorganicznych mikrocząstek powoduje zmniejszenie średnicy peletek, aż do uzyskania wolnej grzybni [Driouch i in., 2011]. Najczęściej stosowano cząsteczki talku oraz tlenku glinu o średnicy rzędu 10 µm do modyfikacji morfologii grzybni. [Kaup i in., 2007] prowadzili hodowlę *Caldariomyces fumago* z dodatkiem mikrocząstek talku oraz tlenku glinu w zakresie stężeń od 0,05 do 25 g/l. W poszczególnych eksperymentach analizowali aktywność chloroperoksydazy *Caldariomyces fumago* i odnosili otrzymane wyniki do zastosowanego stężenia mikrocząstek w podłożu. Najlepsze wyniki otrzymali dla 10 g/l talku oraz 15 g/l Al₂O₃. Podobne badania prowadzili [Driouch i in., 2009] używając talku w zakresie stężeń od 0,01 do 30 g/l. Autorzy ci badali wytwarzanie fruktofuranozydazy. Największą jej aktywność wykazywały próby z hodowli zawierających 10 g/l Al₂O₃. Przy tym stężeniu tlenku glinu średnica peletki zmalała z ok. 1,8 mm (hodowla bez mikrocząstek) do ok. 0,9 mm. Przy stężeniu 30 g/l Al₂O₃ zaobserwowano rozpad peletek do wolnej grzybni. [Driouch i in., 2011] dodawali do hodowli *Aspergillus niger* krzemian tytanu (TiSiO₄) w stężeniu od 2,5 do 50 g/l. Przy stężeniu 2,5 g/l talku peletki osiągały rozmiar ok. 0,9 mm a już przy 5 g/l nastąpił rozpad peletek. Driouch i in. również prowadzili prace z talkiem i tlenkiem glinu w hodowli *Aspergillus niger*. Dla obu rodzajów mikrocząstek stosowali stężenia od 0 do 30 g/l. Maksymalną aktywność fruktofuranozydazę zauważono dla 10 g/l talku oraz 20 g/l tlenku glinu. We wszystkich wymienionych pracach zaobserwowano wzrost suchej masy wraz z dodatkiem mikrocząstek nieorganicznych, co jest zrozumiałe ze względu na jednoczesne oznaczanie suchej masy organicznej grzybni i wbudowanych w nią organicznych mikrocząstek.

Celem tej pracy jest zbadanie wpływu dodatku nieorganicznych mikrocząstek o średnicy ok. 10 µm talku (Mg₃(OH)₂Si₄O₁₀) oraz tlenku glinu (Al₂O₃) na wielkość peletek *Aspergillus terreus* ATCC 20542 oraz wydajność biosyntezy lowastatyny

Materiały i metody

Szczep i podłoże

Do badań wykorzystano szczep *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Hodowle prowadzono w wstrząsanych kolbach o objętości roboczej

150 ml w temperaturze 30°C. Prędkość obrotowa wyrząsarki była stała i wynosiła 110 obr/min.

Prekultura została przygotowana z 10-dniowych skosów. Zarodniki były zmywane sterylnym podłożem inokulacyjnym i zawieszane w tymże podłożu, aby osiągnąć ich stężenie na poziomie około 10⁹ zarodników na litr. Tak przygotowanym inokulum po 24 godzinach wytrząsania sześciono właściwe podłoże.

Podłoże hodowlane miało skład identyczny z opisanym w pracy [Pawlak i in., 2012] z tą różnicą, że laktoza była jedynym źródłem węgla (20 g/l). Kolejne eksperymenty różniły się między sobą stężeniem oraz rodzajem dodawanych mikrocząstek, a także momentem ich dodania. Szczegóły przedstawia tab. 1. Próby dla procesów 1 i 2 pobierano co 48 a, dla procesu 3 co 24 godziny.

Tab. 1 Schemat prowadzenia poszczególnych procesów

Nr procesu	Rodzaj dodanych mikrocząstek	Zakres stężeń mikrocząstek w podłożu	Moment dodania mikrocząstek
1	talk Mg ₃ (OH) ₂ Si ₄ O ₁₀	0 g/l, 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,6 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 5 g/l	Na początku hodowli do właściwego podłoża hodowlanego
2	tlenek glinu Al ₂ O ₃	0 g/l, 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,6 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 5 g/l	Na początku hodowli do właściwego podłoża hodowlanego
3	talk Mg ₃ (OH) ₂ Si ₄ O ₁₀	0 g/l, 0,1 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l	W trakcie inokulacji do podłoża inokulacyjnego

Metody analityczne

Stężenie lowastatyny (LOV) było oznaczane za pomocą UPLC (Waters, USA). Warunki analizy opisano poniżej. Kolumna chromatograficzna była typu RP18 1,7 µm (2×150 mm). Temperatura kolumny wynosiła 40°C, zaś przepływ fazy ruchomej 0,200 ml/min. (gradient woda-acetonitryl). Oba eluenty zawierały 1% dodatek kwasu mrówkowego. Detekcję lowastatyny wykonano przy pomocy detektora fotiodiodowego przy długości fali λ = 238 nm. Wszystkie próbki przed analizą UPLC przesączono przez filtry strzykawkowe z membranami wykonanymi z regenerowanej celulozy o średnicy por 0,2 µm.

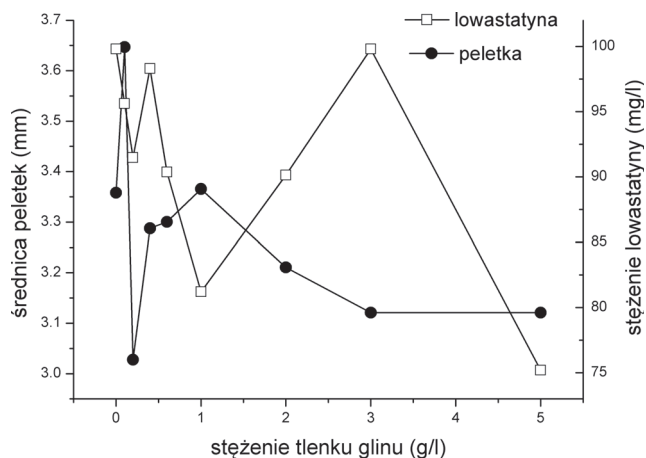
Biomasę (X) oznaczano jako suchą masę. Dokładnie 40 ml zawiesiny przesączano przez filtry bibułowe i przemywano 10-krotną ilością wody destylowanej. Biomasa suszono w temperaturze 105°C do stałej masy.

Średnice peletek określano pobierając 40 ml z każdej próby i następnie wykonując cyfrowe zdjęcia peletek rozłożonych na szalce Petriego. Na podstawie zdjęć dokonywano pomiaru średnicy 50 losowo wybranych peletek za pomocą oprogramowania do cyfrowej analizy obrazu *MicroImage 4.0* (Media Cybernetics, USA), a następnie otrzymane wyniki uśredniano.

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badano wpływ mikrocząstek dodawanych do podłoża właściwego na rozmiar peletek *Aspergillus terreus*. Przy tak prowadzonym eksperymencie rozmiar peletek ulegał zmianie wraz ze wzrostem stężenia talku oraz tlenku glinu. Zmiany te były jednak stosunkowo niewielkie (Rys. 1.) Średnice peletek wahały się w zakresie od 2,6 do 3,8 mm. Wraz ze wzrostem stężenia tlenku glinu w podłożu nie zaobserwowano znaczącego zwiększenia stężenia lowastatyny. Przykładowo dla procesu z Al₂O₃ w 144 godzinie przy stężeniu Al₂O₃ 3 g/l stężenie lowastatyny było na poziomie 100 mg/l., gdy w próbie bez

dodatku mikrocząstek stężenie lowastatyny jest również ok. 100 mg/l. Podczas zwiększania stężenia mikrocząstek zarówno w przypadku talku jak i tlenku glinu (Tab. 2) sucha masa *Aspergillus terreus* rosła.

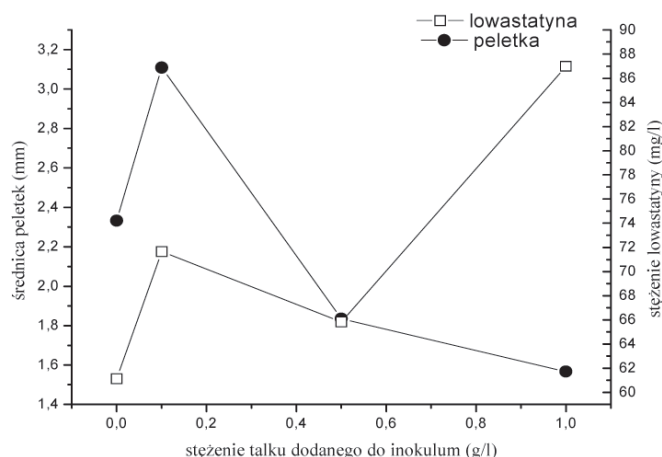


Rys. 1. Wpływ dodatku Al_2O_3 do podłoża właściwego na średnicę peletek *Aspergillus terreus* oraz stężenie lowastatyny (144 h)

Tab. 2. Sucha masa *Aspergillus terreus* dla procesu prowadzonego z dodatkiem Al_2O_3

t [h]	Stężenie Al_2O_3 [g/l]								
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	1	2	3	5
48	3,37	4,23	3,91	4,5	5,15	4,4	5,16	6,29	3,10
96	8,25	8,22	8,55	8,04	9,06	8,75	8,71	9,97	16,55
144	8,17	9,13	8,36	7,91	8,96	11,76	9	15,27	17,77

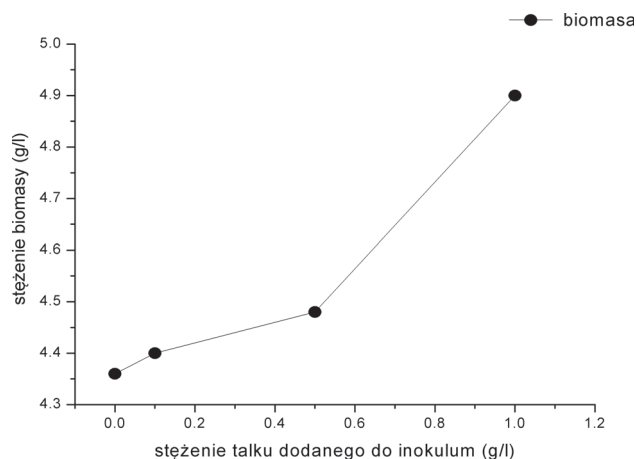
W drugim etapie zbadano wpływ dodatku cząstek mineralnych (talku) podczas inokulacji. Oznacza to, że cząstki mineralne dodawano do prekultury wraz z zarodnikami. W tym wypadku zmiany średnicy peletek są znaczące, gdyż zmalały one od ponad 3 do 1,5 mm. Warto również zwrócić uwagę na skokowy wzrost średnicy peletek przy stężeniu 0,1 g/l. Tu, co zdumiewające, średnica peletek był większa niż w wolnej od talku kontroli. Dalej oczywiście średnica peletek uległa znaczącemu zmniejszeniu (stężenie talku 0,5 oraz 1 g/l) (Rys. 2).



Rys. 2. Wpływ dodatku $Mg_3(OH)_2Si_4O_{10}$ do podłoża inokulacyjnego na rozmiar peletek oraz produktywność *Aspergillus terreus* (144 h)

Produkcja lowastatyny w hodowli modyfikowanej podczas inokulacji także znacząco różni się od wyników otrzymanych z hodowli, w której mikrocząstki dodawano do podłoża hodowlanego. W porównaniu z próbą kontrolną (bez talku) obserwujemy znaczny wzrost stężenia lowastatyny (Rys. 2) z 60 do 85 mg/l w 144 godzinie procesu. Wraz z zmniejszaniem średnicy rosła produkcja lowastatyny. Potwierdziło to znany fakt, że mniejsze peletki wykazują większą zdolność produkcji lowastatyny. Zarówno w eksperymentach, w których talk był doda-

wany do inokulum, jak w tych, w których mikrocząstki dodawano do właściwego podłoża hodowlanego wraz ze wzrostem stężenia dodanej substancji nastąpił wzrost suchej masy (Tab. 2, Rys. 3) W żadnym też eksperymencie nie obserwowano wolnych cząstek mineralnych w podłożu, co może oznaczać, że łączyły się one ze sporami czy też strzępkami grzybni.



Rys. 3. Wpływ stężenia talku dodanego na etapie inokulacji na suchą masę ($t = 144$ h)

Wnioski

Dodatek mikrocząstek nieorganicznych umożliwia sterownie wielkością peletek *Aspergillus terreus* przyczyniając się do zmniejszenia ich średnicy.

Znaczące sterowanie wielkością peletek z jednoczesną poprawą produktywności *Aspergillus terreus* możliwe jest jedynie, gdy mikrocząstki dodawane są na etapie prekultury do podłoża inokulacyjnego.

LITERATURA

- Bizukojć M., Ledakowicz S., 2009, The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, nr 1, 41–54. DOI: 10.1007/s11274-009-0140-1
- Driouch H., Hamsch R., Wucherpfenning T., Krull R., Wittmann Ch., 2011, Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*. Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, nr 7, 462–471. DOI 10.1002/bit.23313
- Driouch H., Sommer, B. Wittmann C. 2009, Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, nr 6, 1058–1068. DOI 10.1002/bit.22614
- Driouch H., Roth A., Dersch P., Wittmann C., 2011, Filamentous fungi in good shape. Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioengineered. Bugs* 2, 2, 100–104. DOI: 10.4161/bbug.2.2.13757
- Kaup B., Eherich K., Pescheck M., Schrader J., 2007, Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol. Bioeng.*, 99, nr 3, 491–498. DOI 10.1002/bit.21713
- Kelly S., Grimm L. H., Hengstler J., Schultheis E., Krull R., Hempel D.C., 2004, Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 26, 315–323. DOI 10.1007/s00449-004-0368-y
- O'Cleirgh C., Casey J.T., Walsh P. K., O'Sheya P.G., 2005, Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 305-310. DOI 10.1007/s00253-004-1883-0
- Pawlak M., Bizukojć M., Ledakowicz S., 2012, Impact of bioreactor scale on lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in batch culture. *Chemical and Process Engineering*, 33, 1, 71-84. DOI: 10.2478/v10176-012-0007-0