

Marta PAWLAK, Marcin BIZUKOJC

e-mail: m.pawlak85@o2.pl

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

Intensyfikacja biosyntezy lowastatyny przy użyciu laktozy i glicerolu jako źródeł węgla w procesach okresowych oraz *discontinuous fed-batch* i *continuous fed-batch*

Wstęp

Lowastatyna to powszechnie znana i wykorzystywana substancja lecznicza obniżająca poziom endogennego cholesterolu w organizmie człowieka. Związek ten wydzielany jest do podłoży hodowlanych przez grzyby strzępkowe, głównie *Aspergillus terreus*, w postaci rozpuszczalnego w wodzie β -hydroksykwasu.

Z wielu badań przeprowadzanych nad biosyntezą lowastatyny przez *Aspergillus terreus* wynika, iż jednym z istotnych czynników wpływających na przebieg procesu jest wybór odpowiedniego źródła węgla a najlepiej ich mieszaniny. Przy czym by uzyskać większą wydajność biosyntezy tego metabolitu należy użyć wolno przyswajalnych substratów, a do takich należą laktoza i glicerol [Casas Lopez i in., 2003; Bizukojć i Pecyna, 2011]. W procesach bioreaktorowych, gdzie panują odmienne warunki niż w kolbach wstrząsanych, należy dodatkowo zwrócić szczególną uwagę na takie parametry jak *pH* oraz stopień nasycenia podłoża tlenem [Lai i in., 2005; Bizukojć i Ledakowicz, 2008; Pawlak i Bizukojć, 2012]. Poza tym kluczowe znaczenie ma także typ zastosowanej hodowli, bowiem w procesach półciągłych uzyskuje się znacznie wyższe ilości pożądanego metabolitu w porównaniu z procesami okresowymi [Rodriguez Parceli in., 2007, 2008; Pecyna i Bizukojć, 2011].

Celem tej pracy jest opracowanie optymalnej strategii hodowli *A. terreus* ATCC 20542 przy jednoczesnym zastosowaniu laktozy i glicerolu, jako źródeł węgla dla maksymalizacji biosyntezy lowastatyny w procesach okresowych (*batch*) i półciągłych typu *discontinuous fed-batch* oraz *continuous fed-batch*. Hodowle prowadzone były zarówno w kolbach wstrząsanych, jak i w bioreaktorze.

Materiały i metody

Szczep i skład podłoży hodowlanych

Biosyntezę lowastatyny prowadzono przy użyciu podstawowego szczepu grzyba strzępkowego *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Eksperymenty prowadzone były w kolbach o objętości roboczej 150 ml i w bioreaktorze o objętości roboczej 5,3 litra, w temperaturze 30°C. Prędkość obrotowa wytrząsarki była stała i wynosiła 110 obr·min⁻¹. W procesach bioreaktorowych z zastosowaniem kontroli poziomu *pH* i *pO₂*, stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu kontrolowano za pomocą zmian szybkości napowietrzania oraz zmian szybkości obrotowej mieszadła. Początkowa szybkość napowietrzania wynosiła 1,5 l_{pow}·min⁻¹ natomiast prędkość obrotowa mieszadła 200 obr·min⁻¹. Stały poziom *pH* utrzymywano za pomocą roztworu wodorowęglanów sodu i potasu. W zależności od procesu *pH* wynosiło pomiędzy 6,9 a 7,9. Początkowe *pH* zaś ustalano na poziomie 6,5. W hodowlach wstrząsanych i bioreaktorowych jako początkowe źródło węgla stosowano laktozę lub mieszaninę laktozy i glicerolu. Substratem zasilającym w hodowlach wstrząsanych były roztwory laktozy i glicerolu, których stężenie wynosiło odpowiednio $c_{LAC,0} = 100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ i $c_{GLC,0} = 100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Zasilanie prowadzono co 24 h (zaczynając od 48 godziny procesu) dodając 10 ml odpowiedniego roztworu. W procesach *continuous fed-batch* w bioreaktorze prowadzono zasilanie glicerolem o stężeniu 500 g·l⁻¹. Podłoże zaszczipiano 24-godzinnym inokulum uzyskanym w wyniku zmycia spor wyrosłych na 10-dniowym skosie zawierających ekstrakt słodowy i pepton kazeinowy. Szczegółowy skład podłoża został przedstawiony

we wcześniejszej pracy [Pawlak i Bizukojć, 2012]. We wszystkich procesach jako jedyne źródło azotu użyto ekstraktu drożdżowego.

Lowastatyna była wyznaczana za pomocą UPLC (Waters, USA) przy użyciu kolumny typu RP18 1,7 μm (2×150 mm). Temperatura kolumny wynosiła 40°C, zaś przepływ fazy ruchomej 0,200 ml·min⁻¹ (gradient woda-acetonitryl). Oba podłoża zawierały 1% dodatek kwasu mrówkowego jako źródła protonów dla detektora masowego. Detekcja fotometryczna prowadzona była przy długości fali $\lambda = 238 \text{ nm}$ dla lowastatyny oraz 280 nm dla produktów ubocznych. Laktoza i glicerol były oznaczane za pomocą kolumny amidowej 1,7 μm (2,1×100 mm). W tym przypadku temperatura kolumny wynosiła 35°C zaś przepływ fazy ruchomej 0,290 ml·min⁻¹ (75% acetonitryl w wodzie z dodatkiem 2% trietyloaminy). Nieznane metabolity analizowano także za pomocą spektrometru masowego (kwadropol-czas przelotu) sprzężonego z UPLC. Parametry MS to: jonizacja dodatnia ESI+, napięcie na kapilarze 3 kV, napięcie na stożku dozującym 40 kV, napięcie na stożku ekstrakcyjnym 4 kV, temperatura źródła jonów 120°C, natężenie przepływu gazu desolwatacyjnego 500 l·h⁻¹, temperatura desolwatacji 200°C.

Wyniki i dyskusja

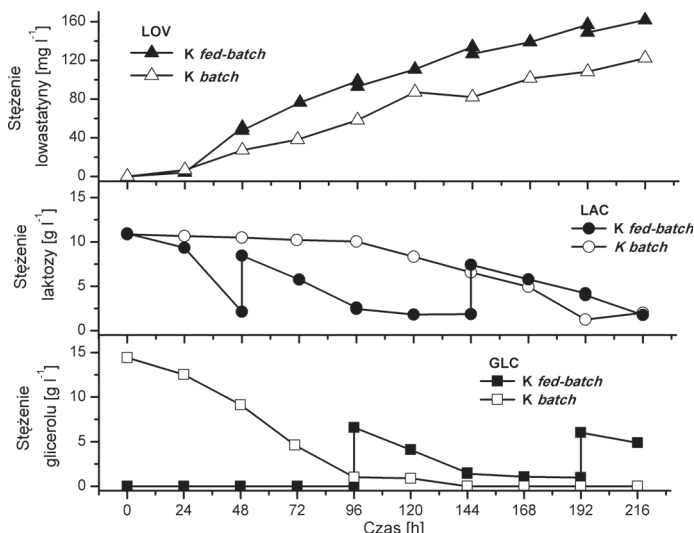
Biosynteza lowastatyny w procesach okresowych oraz *discontinuous fed-batch* w hodowli wstrząsanej

Jak wspomniano już we wstępie, istotny wpływ na wydajność biosyntezy lowastatyny odgrywa użycie właściwego wolno przyswajalnego źródła węgla. Do takich substratów zalicza się laktozę oraz glicerol. Dodatkowo wcześniej udowodniono, że jednoczesne zastosowanie tych dwóch substratów węglowych sprzyja intensyfikacji wydzielania pożądanego metabolitu. Przeprowadzając procesy okresowe, należy jednak zwrócić szczególną uwagę na początkowe stężenie źródła węgla. Zbyt niskie prowadzi bowiem do szybkiego wyczerpania substratu i tym samym do zahamowania wydzielania lowastatyny, natomiast zbyt wysokie stężenie, po pierwsze nie przekłada się na uzyskanie lepszych rezultatów, po drugie zaś substrat nie zostaje całkowicie zużyty [Bizukojć M. i Pecyna M., 2011].

W procesach półciągłych znaczącym czynnikiem wpływającym na przebieg całej biosyntezy jest rodzaj źródła węgla użyty na początku hodowli. Pomimo tego, że glicerol i laktoza zawierają taką samą ilość węgla, to drugi z wymienionych substratów jest bardziej preferowany w pierwszej fazie hodowli (trofofaza) [Pecyna i Bizukojć, 2011].

Porównując biosyntezę lowastatyny w procesie okresowym oraz *discontinuous fed-batch* (Rys 1.), widać znaczne polepszenie wydajności przy zastosowaniu zasilania substratem węglowym w trakcie trwania biosyntezy. W procesie oznaczonym jako K *batch* użyto mieszaninę laktozy i glicerolu ($c_{LAC,0} = 10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $c_{GLC,0} = 15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). W przypadku dwóch substratów, z których jeden ma bardziej złożoną budowę cząsteczki (laktoza) od drugiego (glicerol), jako pierwszy utylizowany jest ten mniej skomplikowany. Doskonale to widać na krzywych zmian stężeń źródeł węgla, bowiem rozpoczęcie zużycia laktozy miało miejsce dopiero w 96. godzinie procesu, kiedy to glicerol został już niemal całkowicie wyczerpany.

Takiego zjawiska nie zaobserwowano w procesie K *fed-batch*, w którym obydwa związki były wykorzystywane jednocześnie, przy czym substrat zasilający (laktoza po 48. godzinie i glicerol po 96. godzinie procesu) był zużywany znacznie szybciej. W procesie tym jako począt-

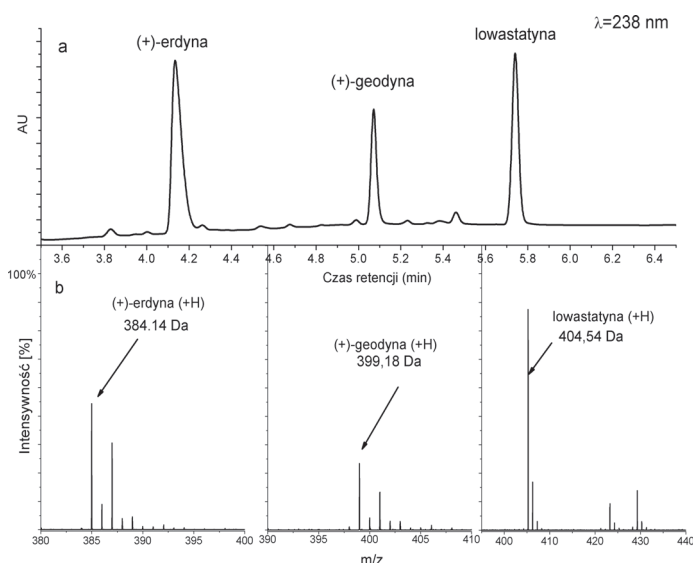


Rys 1. Porównanie biosyntezy lowastatyny w procesie batch i discontinuous fed-batch w hodowli wstrząsanej [Pecyna, Bizukojć, Ledakowicz, 2012]

kowe źródło węgla zastosowano laktozę ($c_{LAC,0} = 10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), następnie w odpowiednich odstępach czasu zasilano zarówno laktozą (w 48. i 144. godzinie) jak i glicerolem (w 96. i 192. godzinie), przy czym roztwory te o stężeniu $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dodawano po 10 ml co 24 godziny.

Znacznie lepsze wyniki uzyskane w procesie półciągłym (discontinuous fed-batch) są rezultatem dwóch zjawisk, mających w nim miejsce. Po pierwsze w trakcie trofofazy wykorzystywanym substratem węglowym była laktoza, która jest preferowanym źródłem węgla dla *A. terreus* szczególnie na tym etapie biosyntezy lowastatyny. W wyniku tego w 96. godzinie trwania procesu, wykroty w podłożu już znaczne ilości tego metabolitu, niemal $100 \text{ mg LOV}\cdot\text{l}^{-1}$, co było o prawie 40% więcej w porównaniu z procesem okresowym. Po drugie stosowanie naprzemiennego zasilania laktozą i glicerolem znacznie wydłużyło aktywność mikroorganizmu, bowiem szybkość zużycia laktozy pomiędzy 48. a 96. godziną, a szybkość zużycia glicerolu we wczesniej idiofazie, pomiędzy 96. a 144. godziną, była podobna i wynosiła około $0,12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Jednakże prowadząc hodowle wstrząsane, w których stosowano zasilanie glicerolem, zaobserwowano, iż w podłożu hodowlanym pojawiały się dodatkowe produkty uboczne: (+)-erdyna oraz jej ester metylowy zwany (+)-geodyną (Rys. 2). Prowadzenie hodowli w bioreaktorze, gdzie możliwa jest kontrola pH pozwoliło na wyeliminowanie tych związków.



Rys 2. (a) Chromatogram produktów ubocznych: (+)-erdyny i (+)-geodyny oraz lowastatyny otrzymany dla $\lambda=238 \text{ nm}$ (b) Widma masowe (+)-erdyny, (+)-geodyny oraz lowastatyny wraz z masami cząsteczkowymi

Biosynteza lowastatyny w procesach okresowych oraz continuous fed-batch w procesach bioreaktorowych

Dla prawidłowego przebiegu biosyntezy lowastatyny w procesach bioreaktorowych niezbędna staje się kontrola takich czynników jak pH oraz stopień nasycenia podłoża tlenem. Tylko w taki sposób wydajności lowastatyny uzyskiwane w bioreaktorze stają się porównywalne do tych z hodowli wstrząsanych. Stosowanie stałego v_{vm} podczas hodowli bioreaktorowych powoduje bardzo szybki spadek poziomu tlenu rozpuszczonego w podłożu, co przekłada się na niskie zużycie substratów, powolny przyrost biomasy i w konsekwencji na niską wydajność lowastatyny. Wygląda zatem na to, że warunki jakie wytwarzają się w kolbach są jak najbardziej korzystne dla wzrostu *A. terreus*, jak i dla wydzielania pożądanego metabolitu.

Kontrola pH przy biosyntezie lowastatyny ma podwójne znaczenie. Po pierwsze pozwala na wyeliminowanie z podłoża produktów ubocznych biosyntezy lowastatyny, jakimi jest (+)-geodyna oraz (+)-erdyna. Powstawanie tej pierwszej szerzej omówiono w poprzednich pracach [Bizukojć i Pecyna, 2011; Pecyna i Bizukojć, 2011]. Z drugiej strony, w wyniku kontroli pH za pomocą mieszaniny wodorowęglanów sodu i potasu, do układu trafiają niezbędne dla biosyntezy lowastatyny jony wodorowęglanowe, wspomagające wytwarzanie malonylo-CoA biorącego udział w reakcji wydłużania łańcuchów poliketydowych [Bizukojć i Ledakowicz, 2008].

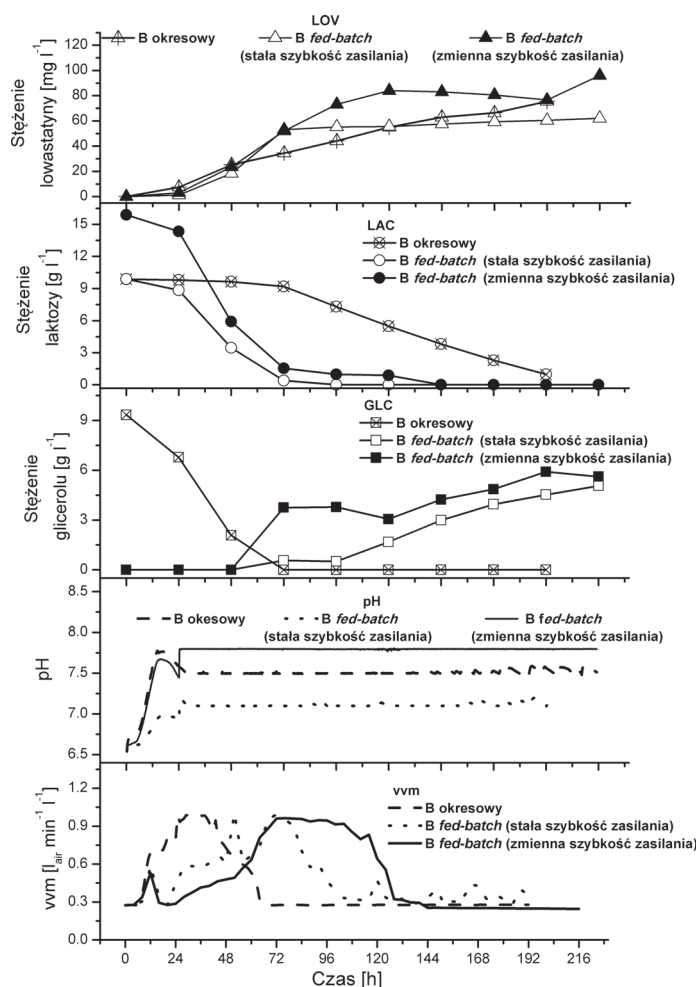
Warto tu wspomnieć, że wcześniejsze badania nad wpływem pH na biosynteze lowastatyny nie były tak obiecujące [Lai in., 2005]. W eksperymentach Lai i inni stosowali kontrolę pH na trzech różnych poziomach tj. 5,5; 6,5 i 7,5 używając 1 N roztworów HCl i NaOH. Wyniki za każdym razem okazywały się gorsze w porównaniu z procesem bez kontroli pH. Autorzy ci, dlatego zasugerowali, iż zmieniając naturalne pH hodowli może dochodzić do aktywacji enzymów biorących udział w rozkładzie lowastatyny. To spostrzeżenie nie wydaje się jednak prawdziwe.

Na rys. 3 przedstawiono porównanie trzech procesów bioreaktorowych: procesu okresowego, gdzie substratem węglowym była mieszanina laktozy i glicerolu, z dwoma procesami continuous fed-batch, w których najpierw zastosowano laktozę, natomiast po jej wyczerpaniu rozpoczęto zasilanie glicerolem o stężeniu $500 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ze stałą ($1 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$) i ze zmienną szybkością zasilania.

W każdym przypadku kontrolowano pH, w procesie okresowym było to na poziomie 7,1, w procesie fed-batch ze stałą szybkością zasilania – 7,5, natomiast w procesie fed-batch ze zmienną szybkością zasilania – 7,8. Różnica ta wynika z faktu, iż poziom ten ustalano indywidualnie dla każdego procesu, zgodnie z maksimum, jakie obserwowano mniej więcej w około 20 godziny hodowli. Kontrolę pH w hodowlach bioreaktorowych rozpoczynano zazwyczaj w 24 godzinie trwania procesu, ze względu na to, że po tym czasie następował z reguły znaczny spadek wartości tego parametru, utrzymujący się już do końca hodowli [Pawlak i Bizukojć, 2012]. Kontrolę stężenia tlenu w podłożu na poziomie 20% stosowano już od początku procesu. Spadek to poziomu 20% trwał z reguły krócej niż 12 godzin.

W hodowli okresowej w bioreaktorze nie zaobserwowano zmian, w stosunku do hodowli wstrząsanej, jeśli chodzi o pierwszeństwo zużycia substratów. Zatem najpierw był asymilowany glicerol później laktoza. Jednakże w procesie tym uzyskano znacznie (o 30%) mniej lowastatyny (w 192. godzinie procesu) w porównaniu z hodowlą wstrząsaną. Ten rezultat jest o tyle zaskakujący, że szybkość objętościowa zużywania glicerolu, jak i laktozy w tych dwóch procesach była niemal identyczna. Zatem mimo kontroli dwóch parametrów (pH i pO_2) w bioreaktorze okazało się trudno osiągnąć tak sprzyjające warunki, jakie panują w kolbach.

W procesach continuous fed-batch zasilanie glicerolem rozpoczęto w okolicach 52 godziny procesu. W tym czasie w podłożu laktoza była już na poziomie około $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Jak się okazuje jest to odpowiedni moment, by dostarczyć substrat węglowy mikroorganizmowi tak, aby nie dopuścić do niskiego poziomu stężenia substratu węglowego w podłożu, w wyniku czego może następować zahamowanie wydzielania lowastatyny. Kluczowym zagadnieniem w tego typu procesach pozostaje również określenie optymalnego profilu zasilania. W procesie B



Rys 3. Porównanie biosyntezy lowastatyny w procesie okresowym i *continuous fed-batch* (stała oraz zmienna szybkość zasilania glicerolem) w hodowli bioreaktorowej

fed-batch (zmienny profil zasilania) zastosowano szybkości zasilania zestawione w tab. 1.

Tab. 1 Profil zasilania glicerolem w procesie B *fed-batch* (zmienna szybkość zasilania)

Przedział czasu [h]	Szybkość zasilania, liniowa zmiana [ml·h ⁻¹]
52 – 72	1,8 – 1,2
72 – 96	1,2 – 1
96 – 120	1 – 1
120 – 144	1 – 0,8
144 – 168	0,8 – 0,8
168 – 192	0,8 – 0,5
192 – 216	0,5 – 0,4

Ten profil został wyznaczony eksperymentalnie korzystając z procesu ze stałą szybkością zasilania. Okazuje się, że szybkość objętościowa zużycia substratu węglowego (glicerolu) na początku dostarczania do układu jest znacznie wyższa niż na dalszym etapie. Widać to doskonale po bardzo niskim poziomie stężenia glicerolu w procesie B *fed-batch* (stała szybkość zasilania) pomiędzy 72 a 120 godziną procesu. Zaważyło to na całym eksperymencie, powodując zahamowanie biosyntezy lowastatyny. Z drugiej strony podobny efekt uzyskuje się, gdy mamy do czynienia ze zbyt dużą ilością źródła węgla w podłożu w wyniku zbyt wysokiej szybkości zasilania. Stosując zaś zmienną szybkość zasilania

utrzymywano stężenie glicerolu na poziomie około 5 g·l⁻¹, co jak się okazało było właściwym stężeniem dla utrzymania biosyntezy lowastatyny. Efekt jaki wywołuje zasilanie hodowli dobrze jest widoczny na krzywych *vvm* (Rys. 3), gdzie wyraźnie widać wzrost zapotrzebowania na tlen w hodowli ze zmienną szybkością zasilania, a więc i aktywność grzybnia utrzymywała się w takiej hodowli znacznie dłużej niż w dwóch pozostałych procesach. Ostatecznie w procesie ze zmienną szybkością zasilania uzyskano około 100 mg LOV·l⁻¹. Niemniej zastosowanie jedynie samego glicerolu jako substratu zasilającego może nie dawać tak dobrych rezultatów, jak zastosowanie zarówno glicerolu i laktozy, co pokazano na rys. 1 i wcześniej dowiedziano [Pecyna i Bizukojć, 2011].

Podsumowując, aby doprowadzić do intensyfikacji produkcji lowastatyny w bioreaktorze przy zastosowaniu mieszaniny laktozy i glicerolu należy prowadzić hodowlę *continuous fed-batch* zamiast okresowej. Dodatkowo wydaje się, że zasilanie powinno być prowadzone za pomocą zarówno glicerolu i laktozy. Takie przesłanki wynikają ze wcześniejszych procesów w kolbach wstrząsanych. Zasilanie dwoma substratami jednocześnie prowadzi do wzmożonego pobierania obu tych substratów przez dłuższy czas, a w efekcie do polepszenia biosyntezy.

Wnioski

Zarówno w hodowlach wstrząsanych jak i bioreaktorowych znacznie lepsze rezultaty w biosyntezie lowastatyny uzyskuje się przy zastosowaniu procesu *fed-batch* zamiast okresowego.

W hodowlach bioreaktorowych należy stosować podczas przeprowadzania biosyntezy kontrolę *pH* oraz *pO₂*, prowadzi to do uzyskania lepszej wydajności biosyntezy lowastatyny oraz zmniejszenia wydzielania produktów ubocznych.

Przy stosowaniu procesu *continuous fed-batch* dla biosyntezy lowastatyny najważniejsze są czas rozpoczęcia zasilania oraz opracowanie optymalnego profilu zasilania tak, by nie zakłócał wydzielania tego metabolitu.

LITERATURA

- Bizukojć M., Ledakowicz S., 2007b., Simultaneous biosynthesis of (+)-geodin by a lovastatin-producing fungus *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* 132, 453-460. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.06.017
- Bizukojć M., Ledakowicz S., 2008., Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by *Aspergillus terreus* in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng.* 42, 198-207. DOI:10.1016/j.bej.2008.06.022
- Bizukojć M., Pecyna M., 2011. Lovastatin and (+)-geodin formation by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in a batch culture with the simultaneous use of lactose and glycerol as carbon sources. *Eng. Life Sci.* 11, 272-282. DOI: 10.1002/elsc.201000179
- Lopez C.J.L., Perez S.J.A., Sevilla F.J.M., Fernandez A.F.G., Grima M.E., Chisti Y., 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of C:N ratio and principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 270-277. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00130-3
- Lai L-S T., Tsai T-H, Wang T.C., Cheng T.Y. 2005., The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Enz. Microb. Technol.* 36, 737-748. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.12.021
- Pawlak M., Bizukojć M., Ledakowicz S., 2012. Impact of bioreactor scale on lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in a batch culture. *Chemical and Process Engineering*, 33, (1), 71-84. DOI: 10.2478/v10176-012-0007-0
- Pecyna M., Bizukojć M., 2011. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture, *Journal of Biotechnology*, 151, 77-86
- Porcel R.E.M., Lopez C.J.L., Perez S.J.A., Chisti Y., 2007. Enhanced production of lovastatin in a bubble column by *Aspergillus terreus* using a two-stage feeding strategy. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 58-64. DOI: 10.1002/jctb.1636
- Porcel R.E.M., Lopez C.J.L., Perez S.J.A., Chisti Y., 2008. Lovastatin production in a two-stage feeding operation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1236-1243. DOI: 10.1002/jctb.1932