

Halina ZASŁONA, Patryk DURAJ, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: halina.zaslona@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Warunki hodowli *Penicillium chrysogenum* do produkcji poligalakturonazy na surowcu odpadowym

Wstęp

Fermentacja na podłożu stałym *SSF* (*Solid State Fermentation*) jest jednym z systemów hodowli mikrobiologicznych. Głównym założeniem tego procesu jest wykorzystanie stałego surowca jako podłoża dla komórek mikroorganizmów oraz źródła wody i niezbędnych składników budulcowych i odżywczych [Pandey, 2003]. Biomasa roślinna spełnia powyższe wymagania ze względu na stosunkowo dużą zawartość zarówno wilgoci, jak i węgla organicznego w postaci m.in. z celulozy, hemicelulozy czy pektyn.

Wśród mikroorganizmów rosnących na stałej powierzchni najczęściej występują grzyby, które takie warunki preferują znacznie bardziej aniżeli hodowle węgłne. Dla mniej niż 1% izolowanych grzybów środowiskiem życia jest woda [Hölker i in., 2004].

Fermentacja na podłożu stałym może odnosić się do procesów zarówno tlenowych, jaki i beztlenowych. Hodowla prowadzona w *SSF* z natury przebiega jak proces okresowy, który kończy się po wyczerpaniu źródła węgla lub w wyniku braku innego składnika, w tym też wody. Na początku procesu woda występuje głównie w formie wilgoci w surowcu. W trakcie procesu uzupełniana jest z powietrza, co przy rozbudowanej grzybni jest nierzadko czynnikiem limitującym. Proces zachodzący w *SSF* rozpatruje się jako reakcję w układzie heterogenicznym z równoczesnym wieloskładnikowym transportem masy i ciepła [Szewczyk i in., 1989].

Często *SSF* prowadzi się w celu rozkładu ciekłych [Polak i Jarosz-Wilkotazka] oraz stałych odpadów z przemysłu spożywczego lub gorzelniczego z towarzyszącą produkcją użytecznych związków i enzymów. Nierzadko hodowle te cechuje wysoka produktywność oraz wyższa w stosunku do hodowli węglnych stabilność produktu [Hölker i in., 2004, Couto i Sanroman, 2006].

W pracy przedstawiono wyniki badań nad doborem warunków produkcji poligalakturonazy (PG) przez *Penicillium chrysogenum* w *SSF* na skórkach pomarańczy. Określono wpływ temperatury, aktywności wody oraz obecności soli nieorganicznych.

Dla uzyskanych korzystnych warunków hodowli w systemie okresowym wykonano badania mające na celu zaprojektowanie procesu szarżowego. Dotyczyły one sposobu zaszczepienia podłoża, wielkości inokulum i czasu wymaganego na zaszczepienie kolejnej szarży.

Badania doświadczalne

Mikroorganizm i przygotowanie inokulum

Organizm wykorzystywany w badaniach był dzikim szczepem pleśni wyizolowanym z rozkładającej się pomarańczy.

Identyfikację przeprowadzono na podłożach selekcyjnych oraz obserwacjach mikroskopowych dzięki uprzejmości Zakładu Fitopatologii i Mikologii w Katedrze Ochrony Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep zidentyfikowano jako *Penicillium chrysogenum*. Pleśń przechowywano w podłożu *Czapek-dox* z 0,1% pektynami w temperaturze otoczenia i rutynowo przesiewano co trzy tygodnie.

Zawiesinę spor do hodowli przygotowano w wodnym roztworze 0,1% Tween80®, przepłukując 12-14 dniową płytkę 30 cm³ roztworu. Kolby zaszczepiano w proporcji 1 cm³ inokulum – 15 g surowca.

Surowiec

Świeże skórki pomarańczy chińskiej (*Citrus sinensis*) zastosowano jako surowiec. Skórki pokrojono w kostkę o krawędzi ~5 mm i poddano sterylizacji w kolbach 250 cm³ przez 20 min. (121 °C).

Metody analityczne

Stężenie białka określono za pomocą metody Lowry'ego [Lowry i in., 1951], wykorzystując krzywą standardową dla albuminy wołowej o równaniu:

$$\text{Abs}(750) = 2,273 C_{\text{białko}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}] \quad (1)$$

Aktywność PG badano analizując stężenie produktu hydrolizy kwasu poli-*D*-galakturonowego za pomocą odczynnika DNS [Miller, 1959]. Substrat o stężeniu 8,0 g·dm⁻³ przygotowano zgodnie z opisaną procedurą [Worthington Biochemical Corp., 2015]. Reakcję prowadzono w proporcji objętości preparatu i substratu 1:1, w 37°C, *pH* 5,0 przez 15 min. Postęp reakcji – ilość uwalnianych grup redukujących określono, wykonując pomiary absorbancji przy $\lambda = 550$ nm. Stężenie cukrów skorelowano z krzywą standardową wykonaną dla kwasu *D*-galakturonowego o równaniu:

$$\text{Abs}(550) = 0,634 C_{\text{produkt}} - 0,0654 [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}] \quad (2)$$

Za jednostkę aktywności przyjęto: 1 U·cm⁻³ = uwolnienie 1 µg kwasu galakturonowego w czasie 1 min przez 1 cm³ preparatu w warunkach reakcji.

Odczyn fermentującej biomasy badano w odstępach dobowych przez 5 dni, na podstawie pomiarów *pH* wodnych ekstraktów hodowli za pomocą elektrody wodorowej. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach.

Wilgotność surowca zmierzono wykorzystując zestaw sondy *HydroClip2* do pomiaru aktywności wody a_w połączonej z miernikiem *HP23-AW-A Rotronic*. Pomiary wykonano w trzech powtórzeniach dla 3,0÷3,5 g skórek bezpośrednio po sterylizacji oraz dla skórek o zwiększonej wilgotności, do których na 3,0 g dodano 1 cm³ wody lub roztworu soli (10 g·dm⁻³ (NH₄)₂SO₄, MgSO₄). Przed pomiarem skórki o zwiększonej wilgotności pozostawiono na 120 min do nasiąknięcia w zamkniętej kolbie okresowo wstrząsając.

Warunki hodowli i izolacja produktu

Przeprowadzono 5 serii hodowlanych *Penicillium chrysogenum* zgodnie z warunkami podanymi w Tab. 1. Hodowle prowadzono w szerokoszyjnych kolbach płaskodennych (250 cm³) zamkniętych korkami celulozowymi. Masa degradowanego surowca wynosiła 15 g. Hodowle monitorowano w odstępach dobowych przez 5 dni.

Biomasę ługowano buforem *Mcllvaina* o *pH* 5,0 (6 cm³ na 1 g świeżego podłoża). Ekstrakcję prowadzono w 24°C w mieszalniku przy 230 rpm przez 60 min. Następnie zawartość kolby przesączano przez jałową gazę. Tak uzyskany ekstrakt odwirowano przy 9000 rpm przez 30 min. w temperaturze 4°C w celu usunięcia stałych pozostałości. Uzyskany supernatant poddano dializie (*MEMBRACEL MD 44* – 14×100 CLR, 14 kDa) wobec tego samego buforu przez 10 h, wymieniając bufor co najmniej 2-krotnie.

Tab. 1. Warunki prowadzonych hodowli okresowych

Hodowla	a_w	Temperatura. [°C]
1	0,997	30
2	0,997	24
3	0,997	37
4	0,973	24
5	0,997 (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , roztwór 10 g·dm ⁻³	24

Sposób zaszczepienia podłoża

Przeprowadzono eksperymenty z trzema szklanymi cylindrami ponumerowanymi I-III (50 cm³), w objętości których badano stopień porostania surowca grzybnia *P. chrysogenum*. W cylindrach usypano skórki z pomarańczy (23,4 g) i poddano sterylizacji, następnie zaszczepiono 1 cm³ inokulum: I. od góry, II. w całej objętości i III. od dołu. Hodowle monitorowano przez 7 dni, po tym czasie cylindry opróżniono, podłoże ługowano (230 rpm, 60 min) buforem *McIlvaina* o pH 5,0 w celu określenia masy białka i jego aktywności w dializowanym ekstrakcie.

Objętość inokulum

W celu dobrania objętości inokulum wykorzystano 4 dniową hodowlę o znacznym stopniu kolonizacji podłoża i obecności zarodników. Na sterylne podłoże (15 g) przeniesiono 1,1 g, 2,1 g lub 4,3 g hodowli. Zaszczepione kolby pozostawiono na 3 dni, wizualnie monitorując stopień porostania skórek. Następnie hodowle ługowano (230 rpm, 60 min) buforem *McIlvaina* o pH 5,0 w celu oznaczenia masy białka i jego aktywności w dializowanym ekstrakcie.

Proces szarżowy

Eksperyment przeprowadzono w dwóch etapach. I etap odnosił się do określenia czasu hodowli i masy podłoża do przenoszenia inokulum na następną szarżę. II etap obejmował przeprowadzenie cyklu w zadanych odstępach dobowych. Aby określić poprawność wyników, prowadzono przynajmniej trzy kolejne szarże.

Wyniki i dyskusja

W trakcie prowadzonych doświadczeń przebieg poszczególnych hodowli monitorowano na podstawie wizualnych obserwacji oraz oznaczeń dwóch wielkości – zawartości białka ogólnego w dializowanych preparatach, wyrażonej w mg białka z 1 g podłoża oraz zawartości w mieszaninie reakcyjnej produktu hydrolizy enzymatycznej, wyrażonej w jednostkach aktywności enzymatycznej w 1 cm³ preparatu.

Dobór warunków hodowli

Spośród parametrów hodowli największy wpływ na produkcję PG ma temperatura (Tab. 2). Zakres temperatury 24-37 °C przyjęto na podstawie prac eksperymentalnych nad hodowlami *Penicillium* sp. na surowcu stałym, w których stosowano temperatury 28÷30°C [Diaz i in., 2007, Silva i in., 2002]. W badanym zakresie 24÷37°C, najniższa temperatura wpływa najkorzystniej na produkcję PG. W przeciwieństwie do cytowanych publikacji, powyżej 30 °C obserwowano zahamowanie zarówno wzrostu szczepu, jak i produkcji PG.

W tab. 2 pokazano, że wilgotność surowca ma również znaczny wpływ na przebieg hodowli. Świeże skórki z pomarańczy są dobrym podłożem do prowadzenia hodowli w SSF ze względu na znaczną dostępność węgla (substancje pektynowe), źródła azotu (5,3 mg białka /g podłoża) oraz wody. Aktywność wody w skórkach bezpośrednio po sterylizacji wynosiła 0,973. Aktywność wody wymagana dla podłoża do hodowli *Penicillium chrysogenum* powinna być zawarta w przedziale od 0,970 do 0,995. Wraz ze wzrostem wartości-

Tab.2. Wpływ temperatury i wilgotności surowca na aktywność PG.

Dzień	24°C, $a_w = 0,997$	30°C $a_w = 0,997$	37°C $a_w = 0,997$	24°C $a_w = 0,973$	24°C $a_w = 0,997$, sole
	jednostka aktywności PG [U·cm ⁻³]				
0	0	0	0	0	0
1	24,7	25,5	17,0	23,1	22,6
2	158,8	100,8	22,5	96,0	189,9
3	120,3	81,7	17,3	96,4	148,8
4	117,4	46,2	10,6	102,5	146,6
5	57,0	33,5	0	81,6	111,7

parametru a_w , zaobserwowano bardziej intensywny wzrost mikroorganizmu [Burgain i in., 2013]. W omawianych hodowlach zauważono podobną zależność w produktywności białka. Hodowle z dodatkową porcją wody lub roztworu soli wykazywały $a_w = 0,997$. W hodowlach tych obserwowano o około 40% większą produkcję białka w tym białka enzymatycznego. Obecność soli (NH₄)₂SO₄ oraz MgSO₄ dodatkowo polepsza produktywność o stabilność preparatu. Podobną zależność przedstawiono w pracy [Rajmane i Korekar, 2012], gdzie badano wpływ różnych źródeł węgla i azotu na wzrost produkcji pektynaz m.in. przez *P. chrysogenum*.

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano temperaturę 24 °C i zwiększoną wilgotność podłoża z solami nieorganicznymi.

Jak zaprezentowano w tab. 2, prawie we wszystkich hodowlach największa aktywność PG została oznaczona w drugiej dobie. Dłuższe prowadzenie hodowli skutkuje spadkiem aktywności enzymatycznej, prawdopodobnie na skutek inaktywacji enzymu (masa białka w tym czasie praktycznie nie ulega zmianie). Podążając za tym stwierdzeniem, przez 5 dni wykonywano pomiary odczynu hodowli w odstępach dobowych. Z oznaczeń pH wynika, że odczyn świeżych skórek z pomarańczy waha się w granicach 4,0÷4,4. Po 2 dobie widoczny jest jego największy spadek do wartości ~3,3, odczyn ten utrzymuje się względnie stałym poziomie i w dniu 5 osiąga wartość pH 3,0.

Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznej preparatu PG pokazują, że enzym wykazuje niewielką aktywność w pH 3,0. W tym pH po 72 h inkubacji (w pH 3,0) traci w przybliżeniu 40% wyjściowej aktywności (badanej w pH 5,0). Wartość ta bardzo dobrze koreluje z aktywnością uzyskaną w piątym dniu hodowli (111,7 U cm⁻³ wobec 189,9 U cm⁻³ w dobie drugiej). Na podstawie tych wyników ustalono, że pH jest krytycznym parametrem hodowli *P. chrysogenum* i przeprowadzono eksperyment, w którym w drugim dniu hodowli wprowadzono bufor *McIlvaina* o pH 6,5 pozwalający na doprowadzenie odczynu podłoża do wartości 4,0. Wyniki pomiarów jednoznacznie wskazują, że podniesienie odczynu podłoża pozwoliło na wydłużenie produkcji białka do piątej doby i uzyskanie w tym dniu 4,76 mg białka na 1 g podłoża przy aktywności PG 474,8 U·cm⁻³. W kolejnych etapach badań prowadzono hodowle ze zmianą pH podłoża w drugim dniu.

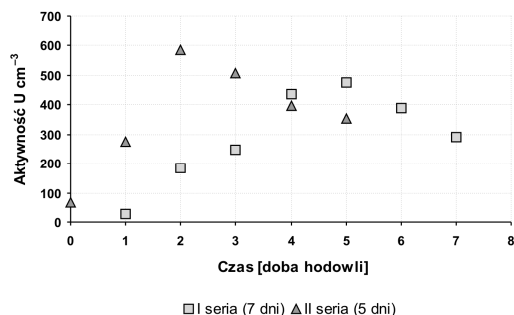
Szarżowa produkcja PG

Hodowle na podłożu stałym są z natury procesami okresowymi i przeprowadzenie ich w procesie ciągłym, w sposób analogiczny dla hodowli węglnych, jest znacznie ograniczone. Niemniej jednak podjęto próbę przeprowadzenia procesu szarżowego z pominięciem czasu na adaptację mikroorganizmów dzięki podawaniu części medium z szarży poprzedniej na nowe podłoże.

Wstępne badania dotyczyły określenia wpływu sposobu inokulacji złoża oraz masy podłoża przenoszonego do kolejnej szarży. W celu określenia sposobu zaszczepienia podłoża, przez 7 dni prowadzono obserwacje wizualne wzrostu pleśni w trzech cylindrach. W każdym cylindrze biała grzybnia widoczna była w 2 dobie. Dla cylindrów zaszczepionych na powierzchni i od spodu, w ciągu 7 dni nie doszło do całkowitej kolonizacji surowca. Hodowla zaszczepiona w całej objętości charakteryzowała się równomiernym wzrostem na powierzchni skórek. Po 7 dobach masa wyprodukowanego białka (mg białka/1 g podłoża) oraz aktywność PG (U/cm³) wynosiły odpowiednio: zaszczepienie od góry – 2,85 i 164,2, w objętości – 2,56 i 163,8 oraz od dołu – 2,37 i 147,2. Wartości te pokazują, że sposób zaszczepienia podłoża nie ma bardzo istotnego wpływu na ilość białka aktywnego. Fakt ten został wykorzystany w następnych doświadczeniach, w których podłoże w kolejnej szarży zaszczepiano na powierzchni warstwy surowca, co jest najprostszym rozwiązaniem w skali przemysłowej. W następnym etapie określono, w sposób ilościowy, wielkość inokulum potrzebną do zapoczątkowania kolejnej szarży. Porównano efekt zaszczepienia 7,0, 13 i 27% wag. masy w stosunku do masy podłoża. Na podstawie wizualnych obserwacji określono, że między 14 i 27% nie ma widocznej różnicy w pokryciu podłoża, dla najmniejszej ilości pokrycie było zauważalnie mniejsze.

Pomiary ilości białka [mg g^{-1}] i aktywności preparatów [$\text{U}\cdot\text{cm}^{-3}$] wyniosły odpowiednio: 7,0% – 3,9 i 229,5; 13% – 3,7 i 293,3 oraz dla 27% – 4,4 i 313,7. Różnice między uzyskanymi wartościami przy 13 i 27% są nieznaczne. Stąd w dalszych badaniach przyjęto innokulum o 13% wag. masy podłoża, jako odpowiednią dla zaszczepienia następných szarzy.

Celem poniższych badań było przeprowadzenie produkcji PG w systemie szarżowym SSF. Kluczowym zagadnieniem było zatem określenie interwału czasu przenoszenia innokulum do następných szarzy, który umożliwił z jednej strony uzyskanie białka o stałej wysokiej aktywności katalitycznej, z drugiej – na względnie wysoki stopień wykorzystania surowca. Na rys.1 porównano wyniki dla dwóch serii hodowli.



Rys.1. Aktywność PG preparatów z hodowli zaszczepianej klasycznie (I seria) i innokulum z hodowli poprzedniej (II seria)

I seria przedstawia pierwszą szarżę zaszczepianą klasycznie (innokulum z płytki) monitorowaną przez 7 dni z dodaniem buforu w 2. dobie. W porównaniu z danymi zawartymi w tab. 2 ($24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,997$, sole), I seria różni się dodatkiem buforu w drugim dniu hodowli. Skutkuje to wzrostem aktywności PG z maksimum w 5. dniu ($474,8\text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$). II seria odpowiada drugiej szarzy, która została rozpoczęta poprzez zaszczepienie podłożem z 5 dnia hodowli serii I. Jak przedstawiono na rys. 1 hodowla zaszczepiona podłożem z poprzedniej szarzy (seria II) charakteryzuje się odmiennym przebiegiem aktywności PG, w porównaniu z hodowlą zaszczepianą klasycznie (seria I). W II serii, zaszczepienie podłoża innokulum złożonym ze złoża z poprzedniej szarzy pozwoliło na uzyskanie wysokiej aktywności PG już w drugim dniu hodowli ($584,5\text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$). Na wartość tę ma wpływ białko enzymatyczne przeniesione z pierwszej szarzy (ok. $66,5\text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$), stąd można uznać, że produktywność w drugim dniu 2 szarzy, była porównywalna z produktywnością w 5. dniu pierwszej szarzy.

Na rys.2 przedstawiono symulację ciągów technologicznych dla dwóch wariantów, wyrażoną w jednostkach aktywności PG. Oznaczenia 5-2-2-2 i 5-5-5-5 odnoszą się do dni przenoszenia innokulum na następnę szarżę.

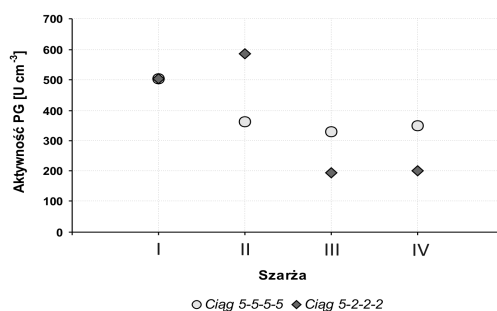
Dla każdego cyklu wykonano cztery szarże. Wyniki z dalszych szarzy nie były już tak zadawalające jak przy dwóch szarzach. W cyklu 5-2-2-2 jeszcze tylko w szarzy II udało się uzyskać wysoką aktywność preparatu. W przypadku ciągu 5-5-5-5 w dalszych cyklach uzyskano zbliżone względnie wysokie aktywności PG, $350\text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Wnioski

Na podstawie badań sformułowano następujące wnioski:

- Skórki z pomarańczy są surowcem o korzystnych właściwościach podłoża do produkcji pektynaz w hodowli SSF ze względu na znaczną dostępność substratu pektynowego, białek oraz dużą wilgotność.

W badanym zakresie temperatury ($24\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) i aktywności wody ($0,973\pm 0,997$) najkorzystniejszymi warunkami hodowli *P. chrysogenum* do otrzymywania PG jest temperatura $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,997$ i obecność soli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, i MgSO_4 .



Rys.2. Aktywność PG preparatów w cyklach technologicznych o interwałach czasowych 2 lub 5 dni

- Odczyn podłoża jest kluczowym parametrem hodowli *P. chrysogenum* i jego utrzymanie na poziomie $\text{pH} \sim 4,0$ jest konieczne do uzyskania białka o wysokiej aktywności poligalakturonazowej.
- Sposób zaszczepienia podłoża i wielkość innokulum mają istotny wpływ na szybkość utylizacji podłoża i wytwarzanie białek enzymatycznych. W przeprowadzonych eksperymentach uzyskano najlepsze wyniki dla podłoża zaszczepionego na powierzchni stosując innokulum 13% mas. w stosunku do początkowej masy surowca.
- Proces szarżowy z 5-dniowymi interwałami czasu pozwolił uzyskać stosunkowo wysokie aktywności PG oraz niemalże pełne wykorzystanie surowca odpadowego.

LITERATURA

- Burgain A., Bensoussan M., Dantigny P., 2013. Effect of inoculum size and water activity on the time to visible growth of *Penicillium chrysogenum* colony. *Int. J. Food Microb.*, **163**, 180-183. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.021
- Couto S.R., Sanroman M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *J. Food Eng.*, **76**, 291-302. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022
- Diaz A., Caro I., Ory I., Blandino A., 2007. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enz. Microb. Techn.*, **41**, 302-306. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.02.006
- Hölker U., Höfer M., Lenz J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 175-186. DOI: 10.1007/s00253-003-1504-3
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-273
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428
- Mitchell D., Berovič M., Krieger N. (Eds), 2006. *Solid-State fermentation bioreactors: Introduction and overview*. Springer, Berlin-Heidelberg, 1-12
- Pandey A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**, 81-84. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3
- Polak J., Jarosz-Wilkolażka A., 2009. Synteza barwników przez unieruchomioną biomasa grzybową. *Inż. Ap. Chem.*, **48**, nr 3, 87-88
- Rajmane S.D., Korekar S.L., 2012. Impact of carbon sources on Pectinase production of post-harvest fungi. *Current Botany*, **3**(3), 1-3.
- Silva D., Martins E., Silva R., Gomes E., 2002. Pectinase production by *penicillium viridicatum* rfc3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Braz. J. Microb.*, **33**, 318-324.
- Szewczyk W.K., Mroczek J., Mysza L., 1989. Hodowla grzybów mikroskopowych w grubej warstwie stałego podłoża. *Inż. Chem. Proc.*, **3**, 511-519.
- Worthington Biochemical Corporation, *Pectinase Assay*. <http://www.worthington-biochem.com/PASE/assay.html> (odczyt z dn. 25.03.2015).

Projekt współfinansowany ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.