

Andrzej BARANIAK, Bohdan ACHREMOWICZ,
Józef TREPIET

Produkcja kwasu mlekowego przez unieruchomione komórki bakteryjne

Производство молочной кислоты фиксированными клетками бактерий

The Production of Lactic Acid by Immobilized Bacterium Cells

W ostatnim dwudziestolecu poczyniono ogromne postępy w badaniach nad enzymami unieruchomionymi, jednak przemysłowa realizacja tych osiągnięć stwarza wiele problemów natury ekonomicznej. Największą trudnością jest wysoki koszt wydzielania wysokoaktywnych enzymów, ich oczyszczania i separacji oraz stosowania do unieruchamiania drogich matryc i nośników.

Zachęcającą alternatywą jest unieruchamianie całych komórek drobnoustrojów, co daje w efekcie duże korzyści (1, 7). Enzymy zawarte w komórkach nie wymagają izolowania i oczyszczania oraz zachowują znacznie dłużej swoją aktywność. Enzymy *in vivo* cechuje wysoka zdolność do zachowania strukturalnej integralności, są one także odporniejsze na denaturacyjne czynniki środowiskowe. Ponadto kompleksy enzymatyczne zawarte w komórkach pozwalają na prowadzenie procesów ciągłych. W porównaniu z tradycyjnymi metodami fermentacji ciągłej zaletą stosowania unieruchomionych komórek jest: wyższa wydajność produktu, możliwości prowadzenia procesu przy wysokich wartościach rozcieńczenia, wyższa szybkość i produktywność, wynikająca z wysokiej gęstości unieruchomionych drobnoustrojów. Stroną ujemną takiego procesu jest jego dodatkowy koszt związany z unieruchomianiem oraz ograniczenie aktywności komórek przez procesy dyfuzyjne (2).

W niniejszej pracy przebadano możliwości produkcji kwasu mlekowego przez unieruchomione w żelu poliakrylamidowym bakteryjne komórki *Lactobacillus bulgaricus*.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy: *Lactobacillus bulgaricus* otrzymano z Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie oznaczone symbolami 151 oraz 7046. Szczepy te przechowywano na mleku oraz w stanie zliofilizowanym.

Przygotowanie komórek do unieruchamiania. Hodowlę prowadzono na odbiałczonej serwatce, wzbogaconej dodatkami: 0,5% bulionu, 0,2 ekstraktu drożdżowego i 0,2 KH_2PO_4 w temperaturze 44°C , utrzymywano stałe pH 5,8 przez dodanie amoniaku. Po trzech dniach hodowlę przerywano schładzając do temperatury 5°C i pozostawiano na 24 godz. w celu dekantacji namnożonych komórek. Komórki bakteryjne odwirowywano, przemywano sterylną wodą i w roztworze fizjologicznym soli przechowywano w temperaturze 5°C .

Unieruchamianie komórek. Unieruchamianie komórek prowadzono w następujący sposób: do 15 cm^3 sterylnego akrylamidu o stężeniu 25% dodawano 15 cm^3 buforu fosforanowego pH = 6,5 i 20 cm^3 zawiesiny komórek. Roztwory te przenoszono do sterylnych strzykawek o poj. 25 cm^3 po czym polimeryzację inicjowano dodaniem 1 cm^3 roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Po okresie 20–25 min. zsięciowany żel rozdrabniano przeciskając przez otwór strzykawki do sterylnych roztworów pożywek lub wody.

Badanie fermentacyjnej aktywności unieruchomionych komórek.

1. Okresowa fermentacja.

Unieruchomione komórki (20 cm^3) umieszczano w 100 cm^3 pożywki, którą stanowiła wzbogacona serwatka i proces fermentacji prowadzono w temp. 44°C wymieniając pożywkę co 24 godz.

2. Ciągła fermentacja.

W fermentorach o poj. 1000 cm^3 wyposażonych w układ do regulacji pH umieszczano 20 cm^3 unieruchomionych komórek i 80 cm^3 pożywki, której przepływ stosowano w zakresie $2\text{--}9\text{ cm}^3/\text{h}$. Kwasowość utrzymywano na stałym poziomie pH 5,8 przy pomocy 12% roztworu amoniaku.

Oznaczanie ilości komórek. Liczbę komórek bakteryjnych w roztworach określano poprzez ich liczenie w komorze Fuchsa-Rosenthala (6). Komórki zawarte w żelu określano na podstawie zawartości białka stosując zmodyfikowaną przez Lee Huang (4) metodę Lowry (3).

Oznaczanie składników pożywek. Laktozę oznaczano metodą z kwasem dwunitrosalicylowym (DNS) (5). Kwas mlekowy powstały w fermentacji poprzez miareczkowanie 0,1 n NaOH.

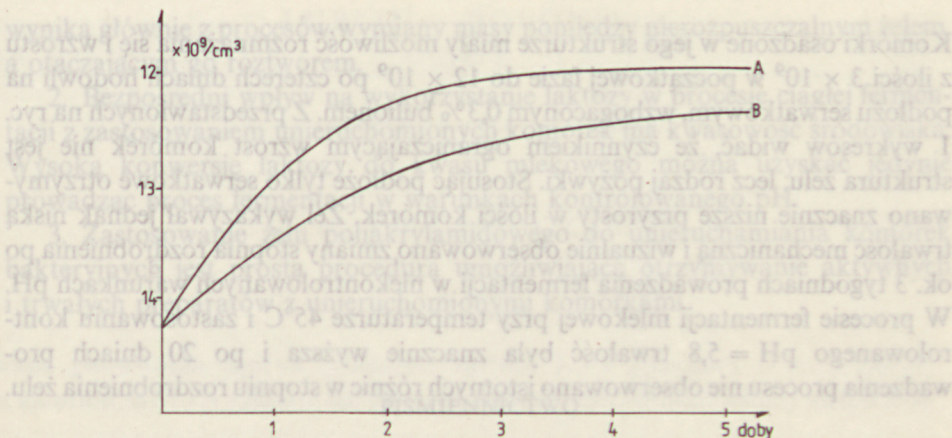
Wszystkie pożywki stosowane były uprzednio sterylizowane 0,5 atm. przez 20 min., a procesy fermentacyjne prowadzono z zachowaniem warunków sterylności.

WYNIKI BADAŃ

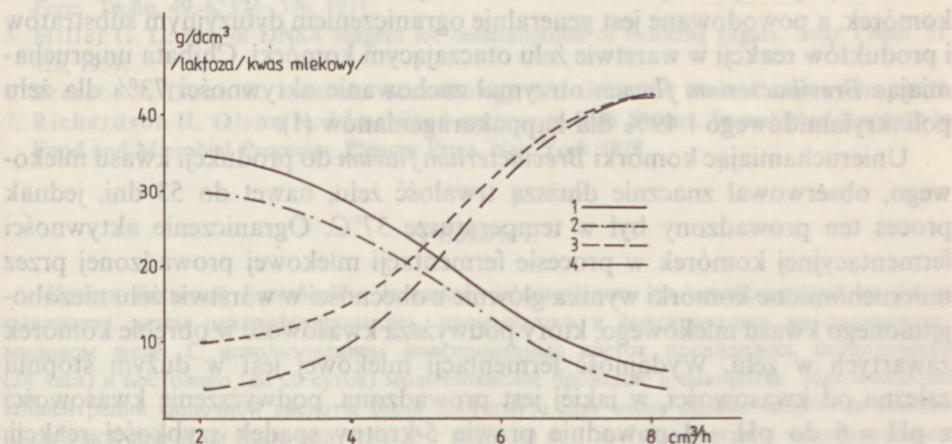
Ilość komórek zawartych w żelu wzrastała w czasie pierwszych trzech dni hodowli ponad trzykrotnie osiągając następnie stan równowagi pomiędzy komórkami zawartymi w żelu i w roztworze. Ilość komórek zawartych w roztworze rosła w początkowej fazie prowadzenia fermentacji do 4×10^7 i była wartością prawie stokrotnie niższą niż koncentracja komórek w żelu. Zależności pomiędzy ilością komórek i ich aktywnością fermentacyjną przedstawia ryc. 1.

Ilości produkowanego kwasu mlekowego w zależności od szybkości przepływu pożywki oraz jej rodzaju przedstawia ryc. 2. Najwyższe stężenia kwasu mlekowego uzyskiwano przy bardzo niskich szybkościach przepływu wynoszących $2\text{ cm}^3/\text{h}$ uzyskując 35 g kwasu z 1 dcm^3 serwatki wzbogaconej 0,3% bulionu.

Zastosowany w przedstawionych doświadczeniach żel poliakrylamidowy do unieruchamiania komórek *Lactobacillus bulgarius* był dość dobrym nośnikiem.



Ryc. 1. Zmiany ilości komórek zawartych w żelu w zależności od ich początkowej ilości oraz rodzaju pożywki; A — ilość komórek w żelu przy stosowaniu serwatki wzbogaconej 0,3% bulionu, B — ilość komórek w żelu przy stosowaniu serwatki odbiałczonej; początkowa ilość komórek $3,2 \times 10^9/\text{cm}^3$
 Changes in the number of cells contained in the gel depending on their initial number and the medium type; A — number of cells in the gel when whey enriched with 0,3% broth is used, B — number of cells in the gel when whey devoid of albumin is used; the initial number of cells $3,2 \times 10^9/\text{cm}^3$



Ryc. 2. Zmiany zawartości kwasu mlekowego i laktozy w zależności od wielkości przepływu oraz rodzaju pożywki (pH = 5,8)

- zmiany laktozy dla serwatki odbiałczonej,
- zmiany kwasu mlekowego dla serwatki odbiałczonej,
- zmiany laktozy dla serwatki wzbogaconej 0,3% bulionu,
- zmiany kwasu mlekowego dla serwatki wzbogaconej 0,3% bulionu.

Changes in the content of lactic acid and lactose depending on the value of the flow and the medium type (pH = 5,8)

- changes in lactose for whey devoid of albumin,
- changes in lactic acid for whey devoid of albumin,
- changes in lactose for whey enriched with 0,3% broth,
- changes in lactic acid for whey enriched with 0,3% broth.

Komórki osadzone w jego strukturze miały możliwość rozmnażania się i wzrostu z ilości 3×10^9 w początkowej fazie do 12×10^9 po czterech dniach hodowli na podłożu serwatkowym, wzbogaconym 0,3% bulionem. Z przedstawionych na ryc. 1 wykresów widać, że czynnikiem ograniczającym wzrost komórek nie jest struktura żelu, lecz rodzaj pożywki. Stosując podłoże tylko serwatkowe otrzymywano znacznie niższe przyrosty w ilości komórek. Żel wykazywał jednak niską trwałość mechaniczną i wizualnie obserwowano zmiany stopnia rozdrobnienia po ok. 3 tygodniach prowadzenia fermentacji w niekontrolowanych warunkach pH. W procesie fermentacji mlekowej przy temperaturze 45°C i zastosowaniu kontrolowanego $\text{pH} = 5,8$ trwałość była znacznie wyższa i po 20 dniach prowadzenia procesu nie obserwowano istotnych różnic w stopniu rozdrobnienia żelu.

DYSKUSJA

Aktywność fermentacyjna unieruchomionych komórek *L. bulgaricus* wynosiła 54–58% aktywności wolnych komórek. Ograniczenia aktywności jest charakterystyczną cechą dla unieruchomionych zarówno enzymów, jak i całych komórek, a powodowane jest generalnie ograniczeniem dyfuzyjnym substratów i produktów reakcji w warstwie żelu otaczającym komórki. Chibata unieruchamiając *Brevibacterium flavum* otrzymał zachowanie aktywności 73% dla żelu poliakrylamidowego i 49% dla kappakaragenianów (1).

Unieruchamiając komórki *Brevibacterium flavum* do produkcji kwasu mlekowego, obserwował znacznie dłuższą trwałość żelu, nawet do 53 dni, jednak proces ten prowadzony był w temperaturze 37°C . Ograniczenie aktywności fermentacyjnej komórek w procesie fermentacji mlekowej prowadzonej przez unieruchomione komórki wynika głównie z obecności w warstwie żelu niezobojętnionego kwasu mlekowego, który podwyższa kwasowość w obrębie komórek zawartych w żelu. Wydajność fermentacji mlekowej jest w dużym stopniu zależna od kwasowości, w jakiej jest prowadzona, podwyższenie kwasowości z $\text{pH} = 6$ do $\text{pH} = 4$ powoduje prawie 5-krotny spadek szybkości reakcji. Wpływ kwasowości roztworu na aktywność komórek był widoczny szczególnie w procesach prowadzonych bez kontroli i stabilizacji pH. Uzyskiwano w tych procesach bardzo niskie wyniki — ok. 7 g/cm^3 kwasu mlekowego, co odpowiada tylko 17% wykorzystaniu laktozy. Stosując natomiast taką samą ilość unieruchomionych komórek, lecz prowadząc proces w $\text{pH} = 5,8$ uzyskiwano ok. 35 g/cm^3 kwasu mlekowego i ok. 85% wykorzystanie laktozy.

WNIOSKI

1. Aktywność fermentacyjna unieruchomionych komórek *Lactobacillus bulgaricus* wynosiła ok. 60% aktywności wolnych komórek, jej ograniczenie

результата главным образом с процессов обмена массы между неразрешимым гелем, а окружающим его раствором.

2. Прямое влияние на использование лактозы в процессе непрерывной ферментации с применением иммобилизованных клеток имеет кислотность среды. Высокую конверсию лактозы в молочную кислоту можно получить только проводя процесс ферментации в условиях контролируемого pH.

3. Применение геля полиакриламидового для иммобилизации клеток бактериальных является простой процедурой позволяющей получать активных и устойчивых препаратов с иммобилизованными клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ichiro Chibata: Immobilized Microbial Cells, Edited K. Venkatasubramanian American Chemical Society, ACS, 1979.
2. Jack R., Zaij J.: The immobilization of whole cells. Adv. in Biochem. Eng. 126-145 vol. 5. 1976.
3. Lowry O., Rosenbriought N.: Protein measurement with Folin-Phenol reagent. J. of Biol. Chem. 193 (1951).
4. Lee Huang: Application of the Lowry Methods for determination of cells concentration. J. of Ferm. Techn. 49, 6, 574-576, 1971.
5. Miller G. L.: Use of DNSA reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426, 1959.
6. Prescott S., Dunn C.: Industrial Microbiology, Mc Graw-Hill Book Company Inc. 1959.
7. Richardson H., Olson N.: Immobilized enzymes in Milk System. Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes, Plenum Press, New York 1978.

РЕЗЮМЕ

Клетки бактерий *Lactobacillus bulgaricus* размножались на освобожденной от белка сыворотке, затем центрифугировались, промывались и фиксировались на полиакриламидовом желе. С использованием фиксированных клеток проводилось периодически (24 часа) и постоянно (до 20 суток) молочнокислое брожение в сыворотке. Максимальная концентрация молочной кислоты была достигнута при очень низких скоростях течения (2 см³/час); при этом было получено 35 г кислоты из 1 дм³ сыворотки, с использованием лактозы около 85%. Бродительная активность фиксированных клеток *L. bulgaricus* составила 54-58% активности свободных клеток.

SUMMARY

The cells of *Lactobacillus bulgaricus* were multiplied on whey devoid of albumin, then centrifuged, washed, and immobilized on polyacrylamid gel. Using these immobilized cells, lactic fermentation was carried out in whey using the periodical (24 hrs) and permanent (up to 20 days) systems. The highest concentration of lactic acid was obtained with very low speeds of the flow, 2 cm³/hr, obtaining 35 g of the acid from 1 dcm³ of whey, with approximately 85% utilization of lactose. The fermentative activity of the immobilized cells of *L. bulgaricus* was 54-58% of the activity of free cells.