ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN-POLONIA
VOL. XLIX, SUPPL. 28 SECTIO E 1994

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa Akademii Rolniczej w Lublinie

Eugenia PODGÓRSKA, Zdzisław TARGOŃSKI,
Jacek PIELECKI

Zastosowanie pianek poliuretanowych do unieruchamiania grzybni *Trichoderma reesei*

The Use of Polyuretane Foam in Immobilization of the Mycelium of *Trichoderma reesei*

W pracach biotechnologicznych istotnym problemem jest przejście od procesów prowadzonych okresowo do systemów ciągłych. Wielokrotne użycie tego samego enzymu lub komórek pozwala na obniżenie kosztów produkcji, ale niesie ze sobą wiele nowych problemów.

Jednym ze sposobów prowadzenia procesów biotechnologicznych metodą ciągłą jest unieruchamianie komórek lub enzymów na nośnikach stałych.

Z enzymatyczną hydrolizą celulozy i hemiceluloz wiązano i nadal wiąże się duże nadzieje na produkcję tanich cukrów z biomasy roślinnej. Proces ten wymaga jednak użycia znacznych ilości preparatów celulolitycznych po stosunkowo niskiej cenie.

Najlepszymi producentami celulaz są mutanty *T. reesei*, które namnaża się w bioreaktorach najczęściej metodami wgłębnymi. Proces ten jest jednak dość kosztowny, a cena otrzymanego preparatu ma decydujący wpływ na cenę glukozy produkowanej z celulozy. Dlatego też poszukuje się nowych, bardziej efektywnych metod produkcji celulaz przez szczepy *T. reesei*. Jedną z nich jest namnażanie *T. reesei* na inertnych nośnikach stałych, np. na piankach poliuretanowych nasyconych płynną pożywką mineralną z dodatkiem laktozy jako źródła węgla (7). Pozytywne wyniki wstępnych badań produkcji celulaz przez *T. reesei* D-78085 unieruchomionych na piankach poliuretanowych zachęciły autorów do dalszych prac w tym kierunku.

Celem badań było określenie zależności pomiędzy produkcją celulaz przez mutanty *T. reesei* a warunkami stworzonymi dla ich hodowli w specjalnie do tego typu skonstruowanym bioreaktorze.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Szczepy

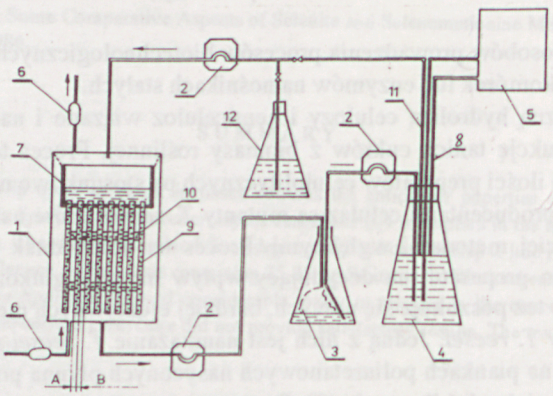
Do badań użyto 2 mutantów *Trichoderma reesei* o symbolach D-78085 i D-7912, otrzymanych z kolekcji szczepów VTT z Finlandii.

Podłoże hodowlane

Do hodowli szczepów *T. reesei* użyto pożywki wg Mandels, Weber (4), z tym że zamiast "protease peptonu" stosowano ekstrakt drożdżowy w stężeniu 0,05%, zaś źródłem węgla była laktoza (0,5%).

Warunki hodowli

Hodowlę mutantów *T reesei* prowadzono w specjalnie skonstruowanym bioreaktorze, którego schemat przedstawiono na ryc. 1. Bioreaktor 1 zestawiony był z pompami perystaltycznymi 2, filtrem 3 zatrzymującym biomasę, zbiornikiem 4 układu regulującego *pH*, pehametrem 5, filtrami powietrza 6 oraz zbiornikiem 12. W bioreaktorze u góry umieszczono zbiornik zasilający, w którym we wzdłużnych wycięciach 8 w dnie osadzone były płyty z pianki poliuretanowej. Piankę poliuretanową otrzymano z Zakładów "Polopren" w Zgierzu, typ pianki S-28 CC. Płyty 9 o grubości A = 10 mm osadzone były pionowo i oddalone od siebie o odległość B także 10 mm. Do zdystansowania płyt 9 służyły miejscowe przekładki 10. Przy takim oddaleniu płyt 9 i umiejscowieniu przekładek 10 osiągnięto optymalny przepływ powietrza, które doprowadzane było do bioreaktora 1 od dołu przez filtr 6 i odprowadzane przewodem do góry. Zasilanie bioreaktora 1 odbywało się przewodem przy użyciu pompy perystaltycznej 2 ze zbiornika 4 układu regulującego *pH*, połączonego z pehametrem 5. Okresowo od 10% do 50% płynu pohodowlanego usuwano z układu, a na jego miejsce ze zbiornika 12 wprowadzano gorącą pożywkę (temp. 90°C) w równoważnej ilości. Przewód zasilający 11 posiadał możliwość przesunięcia w górę lub w dół w celu uzyskania prawidłowego poziomu pożywki w zbiorniku 4. Zbiornik z kolei był zasilany spływającą grawitacyjnie z płyt 9 pożywką pompowaną pompą perystaltyczną 2 do zbiornika 3 filtratu, zatrzymującego biomasę, a stamtąd przy pomocy innej pompy perystaltycznej 2 do zbiornika 4. Szerokość C wzdłużnego wycięcia 8 w dnie zbiornika 7 wynosiła 5 mm (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat bioreaktora wraz z urządzeniami towarzyszącymi do ciągłej produkcji celulaz przez immobilizowaną na piankach poliuretanowych grzybni *T. reesei*; 1 – bioreaktor, 2 – pompy, 3 zbiornik filtrujący, 4 – zbiornik do kontroli *pH*, 5 – *pH*-metr, 6 – filtr powietrza ,7 – perforowany zbiornik, 8 – elektroda *pH*, 9 – płyta z pianki poliuretanowej, 10 – płytki dystansowe, 11 – wąż doprowadzający pożywkę, 12 – zbiornik zasilający świeżą pożywką

A scheme of the bioreactor together with the fittings in the production of cellulases by the *T. reseei* myceliummobilized on polyuretane foam: 1 – bioreactor, 2 – pumps, 3 – filtering container, 4 – *pH* control container, 5 – *pH*-meter, 6 – air filter, 7 – perforated container, 8 – *pH* electrode, 9 – polyuretane foam plate, 10 – distance plates, 11 – medium providing tube, 12 – container feeding the medium

W celu przeprowadzenia hodowli 3/4 objętości bioreaktora napełniano pożywką mineralną z 0,1% laktozy i sterylizowano przez 30 min. przy 0,075 MPa, a po ochłodzeniu szczepiono zawiesiną konidii i napowietrzano. Po 24 godz. pożywkę znajdującą się między płytami poliuretanowymi usuwano, a na jej miejsce wprowadzano świeżą pożywkę z dodatkiem laktozy, po czym uruchamiano obieg przy doprowadzeniu powietrza do bioreaktora celem natlenienia układu i usunięcia powstałego CO_2. Podczas przepływu pożywki regulowano *pH* w

zakresie 2,5 do 5,5. Z chwilą, gdy stężenie laktozy spadało do zera, wówczas od 10% do 50% pożywki usuwano, a na jej miejsce wprowadzano świeżą pożywkę z laktozą.

Okresowo przeprowadzono inaktywację termiczną grzybni przez doprowadzenie ogrzanej do temp. ok. 90°C pożywki do płyt z pianki poliuretanowej. Hodowle prowadzono w temp. 27°C przez kilka , a nawet kilkanaście tygodni.

Metody analityczne

Aktywność FPU (*filtr paper unit*) oznaczono wg metody opisanej przez UPAC (2). Aktywność proteaz oznaczano wobec azokazeiny (Sigma) wg Lovrien (3). Jedną jednostkę definiowano jako wzrost absorbancji o 1 jednostkę A_{366} w ciągu 1 min. w warunkach oznaczania. Aktywność chitynazy oznaczano w sposób następujący: 0,5 ml filtratu pohodowlanego mieszano z 0,5 ml 0,6 % zawiesiny koloidalnej chityny w 0,05 M buforze octanowym o *pH* 4,8 i inkubowano przez 1 godz. w temp. 50°C, po czym dodawano 3 ml odczynnika zawierającego kwas 3,5-dinitrosalicylowy, ogrzewano przez 5 min., a następnie oznaczano zawartość cukrów redukujących metodą kolorymetryczną. Aktywność chitynazy wyrażano w μmol/ml x min, w skrócie u/mol.

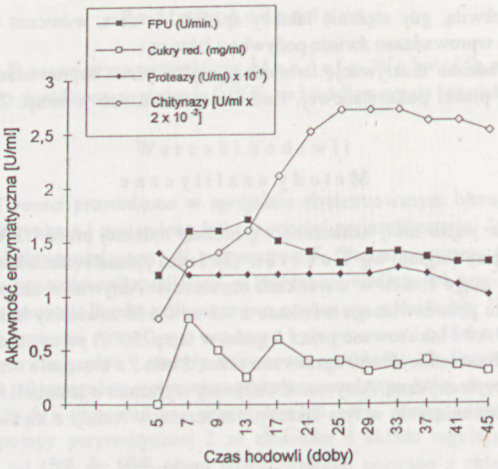
Zawartość cukrów redukujących, w tym laktozy, oznaczano w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym wg Millera (5).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania nad biosyntezą enzymów zewnątrzkomórkowych, w tym i celulaz, koncentrują się na ogół wokół hodowli okresowych, rzadziej spotyka się publikacje na temat wielodobowych hodowli w systemie półciągłym lub ciągłym. Problemy hodowli ciągłej muszą uwzględniać nie tylko proces narastania grzybni i syntezę wydzielanych do podłoża enzymów, ale też zagadnienia związane z autolizą grzybni. Dlatego też w niniejszej pracy, oprócz oznaczania aktywności celulaz, badano jeden z kluczowych enzymów biorących udział w lizie grzybni, a mianowicie chitynazę.

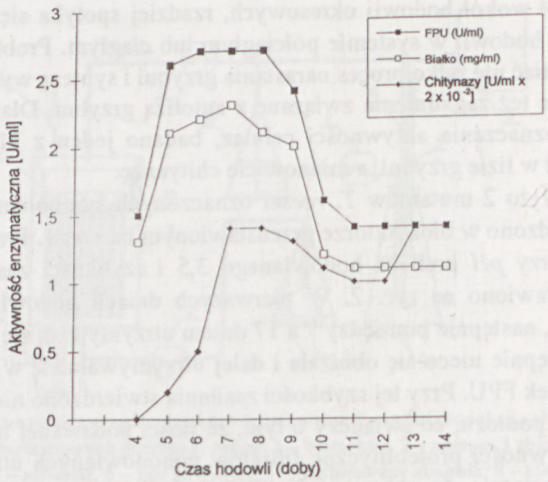
Do badań użyto 2 mutantów *T. reesei* oznaczonych symbolem D-78085 i D-7912. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze przedstawionym na ryc. 1. Przebieg hodowli *T. reesei* D-78085 przy *pH* podłoża hodowlanego 3,5 i szybkości zasilania pożywką 500 ml/dobę przedstawiono na ryc. 2. W pierwszych dniach hodowli aktywność celulaz (FPU) wzrastała, następnie pomiędzy 7 a 17 dniem utrzymywała się w granicach 1,5±0,1 jednostki, a następnie nieco się obniżała i dalej utrzymywała się w miarę stałym poziomie 1,27 jednostek FPU. Przy tej szybkości zasilania stwierdzono niewielką ilość cukrów redukujących w podłożu, co świadczy o tym, że ilości podawanej laktozy były nieco za duże. O ile aktywności proteolityczne filtratów pohodowlanych utrzymywały się na w miarę stałym poziomie, to aktywności chitynazy wzrastały do 25 dnia hodowli, aby dopiero po tym czasie ustabilizować się. Świadczy to o narastających procesach litycznych związanych z autolizą starej grzybni nagromadzonej na piankach poliuretanowych. W kolejnej hodowli *T. reesei* D-75085 podwyższono *pH* hodowli do 4,0 (ryc. 3), co wpłynęło pozytywnie na ilość nagromadzonych celulaz w filtratach pohodowlanych, gdyż w najkorzystniejszym okresie hodowli aktywność FPU wynosiła 2,6 jedn. FPU, a w podłożu nie stwierdzono laktozy. Natomiast filtraty pohodowlane wykazywały niższą aktywność chitynolityczną.

Dalsze podwyższanie *pH* do 4,5 sprawiało duże trudności w zakresie utrzymania sterylności układu i powtarzalności wyników w hodowlach wielodobowych, dlatego też wyniki tych badań nie są przedstawione w niniejszej pracy.



Ryc. 2. Przebieg produkcji celulaz, proteaz i chitynazy przez *T. reesei* D-78085 w bioreaktorze z pianką poliuretanową. Zasilanie bioreaktora 500 ml pożywki/dobę, *pH* pożywki 3,5

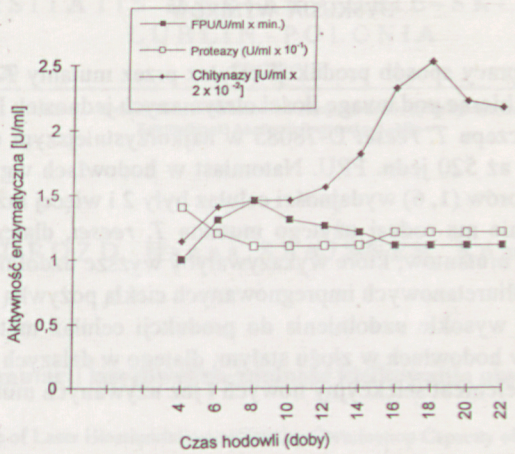
The course of the production of cellulase, proteases and chitinase sine by *T. ressei* D-78085 in a bioreactor with polyuretane foam. Bioreactor feed 500 ml of the medium/24 hrs, *pH* medium 3,5



Ryc. 3. Przebieg produkcji białka zewnątrzkomórkowego, celulaz i chitynaz przez *T. reesei* D-78085 w bioreaktorze z pianką poliuretanową. Zasilanie bioreaktora; 500 ml pożywki/dobę, *pH* pożywki 4,0

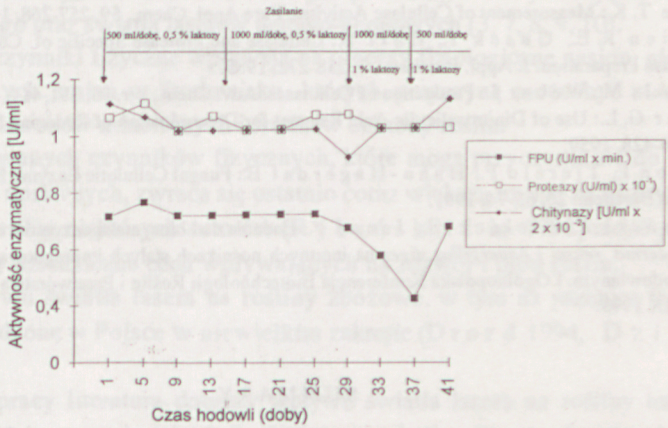
The course of the production of extracellular protein, celulases and chitinases by *T. reesei* d-78085 in a bioreactor with polyuretane foam. Bioreactor feed 500 ml of the medium/24 hrs, medium *pH* 4,5

W dalszej części pracy badano uzdolnienia drugiego mutanta *T. reesei* oznaczonego symbolem D-79124 do produkcji celulaz na piankach poliuretanowych. Uzyskane filtraty pohodowlane wykazywały jednak niższe aktywności celulolityczne niż w przypadkach szczepu *T. reesei* D-78085 i wahały się w granicach do 1,0-1,4 jedn. FPU (ryc. 4). Zwiększenie ilości podawanego roztworu laktozy z 500 ml/dobę do 1000 ml/dobę nie spowodowało istotnych zmian w aktywności celulaz (ryc. 5), podobnie jak wzrost stęże-



Ryc. 4. Przebieg produkcji celulaz, proteaz i chitynazy przez *T. reesei* D-79 124 w bioreaktorze z pianką poliuretanową. Zasilanie bioreaktora 500 ml pożywki/dobę *pH* pożywki 4,0

The course of the production of celulases, proteases and chitinase by *T. reesei* D-79124 in a bioreactor with polusyretane foam. Changeable bioreactor feed, medium *pH* 4



Ryc. 5 Przebieg produkcji celulaz, proteaz i chitynazy przez *T. reesei* D-79124 w bioreaktorze z pianką poliuretanową. Zasilanie bioreaktora zmienne, *pH* pożywki 4,0

The course of the production of cellulases, proteases and chitinase by *T reesei* D-79124 in a bioreactor with polyuretane foam. Bioreactor feed 500 ml of the medium/24hrs. medium *pH* 4,0

nia laktozy z 0,5% do 1,0%, co stanowi pewne zaskoczenie, gdyż należało się spodziewać wyższych aktywności. Być może, nawet niewielkie obniżenie aktywności celulaz filtratów pohodowlanych związane było z represją syntezy celulaz, powodowaną przez nadmiar produktów hydrolizy laktozy, tj. glukozy i galaktozy.

Na podstawie przedstawionych danych można stwierdzić, że na tym etapie badań lepszym szczepem produkującym celulazy na piankach poliuretanowych okazał sie mutant *T. reesei* D 78085 i z tym szczepem powinny być prowadzone dalsze badania optymalizacyjne.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Przedstawiony w pracy sposób produkcji celulaz przez mutanty *T. reesei* okazał sie niezwykle efektywny, biorąc pod uwagę ilości otrzymanych jednostek FPU z 1 g laktozy, gdyż w przypadku szczepu *T. reesei* D-78085 w najkorzystniejszym okresie hodowli z 1 g laktozy uzyskano aż 520 jedn. FPU. Natomiast w hodowlach wgłębnych opisywanych przez innych autorów (1, 6) wydajności celulaz były 2 i więcej razy niższe. Niewątpliwie istotne znaczenie ma rodzaj użytego mutanta *T. reesei*, dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych mutantów, które wykazywałyby wyższe uzdolnienie do produkcji celulaz na piankach poliuretanowych impregnowanych ciekłą pożywką z laktozą. Mutanty, które wykazywały wysokie uzdolnienia do produkcji celulaz metodą wgłębną, nie muszą być najlepsze w hodowlach w złożu stałym, dlatego w dalszych badaniach należy zwrócić uwagę na ten element selekcyjny nowych i już używanych mutantów i rekombinantów.

PIŚMIENNICTWO

1. Esterbauer H., Steiner W., Labudowal. Herman A., Hayn M.: Production of *Trichoderma* Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. Bioresaurce Technology, 36, 51065,1991.
2. Ghose T. K.: Measurement of Cellulase Activites. Pure Appl. Chem., 59, 257-268, 1987.
3. Lovrien R. E., Gusek T., Hart B.: Cellulase and Protease Specific of Commercially Available Cellulase Preparation. J. Appl. Biochem., 7, 258-272, 1985.
4. Mandels M., Weber J.: Production of Cellulases. Adv. Chem., ser. 95, 391-414, 1969.
5. Miller G. L.: Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. Annal. Chem,. 31, 426-428, 1959.
6. Persson I., Tjereld F., Hahn-Hagerdal B.: Fungal Cellulotic Enzyme Production: A Review, Process Biochem. 26, 65-74, 1991.
7. Targoński Z., Pielecki J., Janas P.: Badania nad biosyntezą enzymów celulolitycznych przez *Trichoderma reesei* i *Aspergillus niger* na inertnych nośnikach stałych impregnowanych płynnym podłożem hodowlanym. I Ogólnopolska Konferencja Biotechnologii Roślin i Przetwórstwa Żywności, Warszawa 27-28 IX 1993.

SUMMARY

The studies examined the effect of pH of the medium and the rate of providing the nutrient medium to bioreactor built of the plates of polyuretane foam impregnated with a mineral medium with lactose on cellulase production by mutants *T. reesei* labelled the symbols of D-78085 and D-79124. The studies found out high productivity of celulases from 1 g of lactose. It was up to 520 units of FPU. The optimum *pH* of the culture was 4.0. The production of celulases could be continued, when the proper supply of the mineral medium with lactose was maintaned.