

Čtvrtprovozní fermentace *Streptomyces nigrificans*

579.14 663

Doc. Ing. KATEŘINA DEMNEROVÁ, CSc., Ing. BLANKA KRÁLOVÁ, CSc., Ing. IVO ŠAFAŘÍK, CSc., Ing. IVANA BENEŠOVÁ, katedra biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha
Ing. Ivan FORT, katedra chemických a potravinářských strojů, ČVUT Praha

Klíčová slova: glukosaisomerasa, fermentace, čtvrtprovozní fermentor, *Streptomyces nigrificans*, xylosa

Úvod

Pro kultivaci vláknitých mikroorganismů se obvykle používá newtonovských kapalin pseudoplastického typu [1]. Jejich reologické vlastnosti se mění během fermentace. Proto je nutno k udržení vhodných podmínek v průběhu vsádkové fermentace nastavit a řídit proměnnou frekvenci otáčení míchadla. Byla popsána dvě stadia růstové křivky:

a) růstová perioda (τ_1), b) fermentační perioda (τ_2). V průběhu růstu vláknitých mikroorganismů je třeba proces míchání a aerace vést tak šetrně, aby nebyl narušen difuzní růst mycelia. V produkční fázi je však třeba, aby frekvence otáčení i rychlost aerace byla nastavena na vyšší hodnoty, aby se dosáhlo dostatečně velké rychlosti oxidace.

Kritéria pro modelování submerzní fermentace vláknitých mikroorganismů jsou užívána v následujícím tvaru [2]:

1. konstantní obvodová rychlost míchadla,
2. konstantní zdánlivá stoupací rychlost plynu.

Obě kritéria jsou platná, když Reynoldsovo číslo pro míchání je vyšší než 10^4 , za předpokladu, že míchadlo není plynem zahlceno. Za těchto podmínek lze stanovit tyto provozní veličiny: frekvenci otáčení míchadla, objemový průtok vháněného oxidačního vzduchu a příkon míchadla.

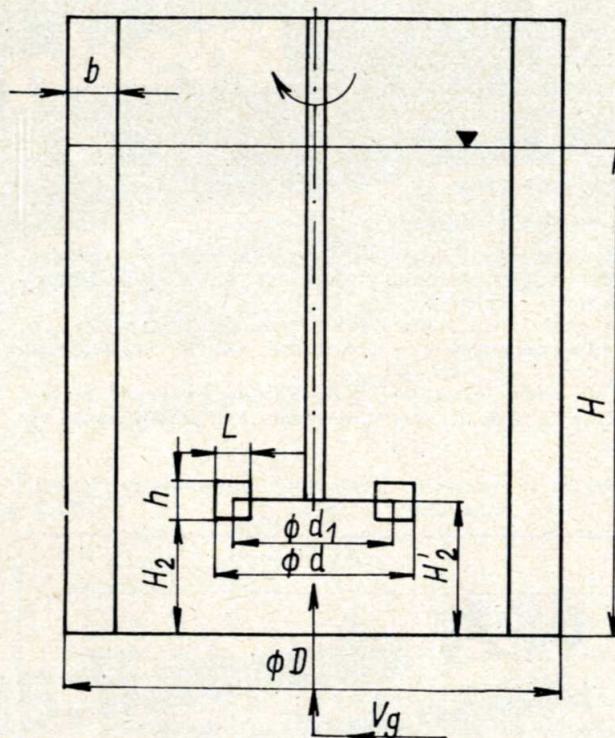
Materiál a metody

Hyperprodukční kmen *Streptomyces nigrificans* 82/20 byl získán z rodičovského kmene *Streptomyces nigrificans* 3014 po ozáření UV světlem. Složení média a kultivační podmínky pro vegetativní mycelium jsou uvedeny v předcházející publikaci [3].

Induktor tvorby glukosaisomerasy, D-xylosa, byl v produkčním médiu částečně nahrazen výluhem z pšeničných otrub (100 g pšeničných otrub v 1 000 cm³).

Fermentace byla prováděna v modelové válcové nádobě s rovným dnem (obr. 1), zhotovené z nerezavějící oceli, opatřené u stěny 4 radiálními narážkami. V ose nádoby rotovalo šestilopátkové standardní diskové turbínové míchadlo (podle ČSN 69 1021). Vzduch se přiváděl trubičkou bezprostředně pod rotující míchadlo. Výška klidové hladiny fermentační vsádky H byla rovna průměru nádoby D , vzdálenost spodních hran lopatek míchadla nad dnem H_2 byla rovna jeho průměru d . Na za-

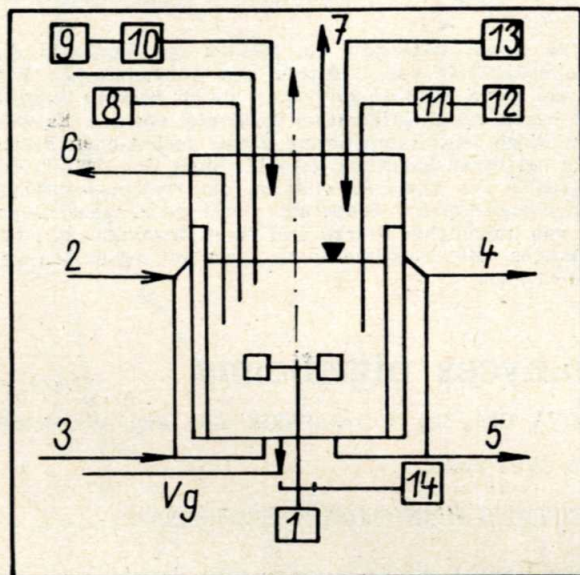
čátku fermentace vykazovala vsádka newtonské chování; s indexem newtonského chování $n \approx 1,0$; na konci fermentace stanoven index newtonského toku $n \approx 0,38$ a hodnota koeficientu konzistence $K = 0,1$ Pas.



Obr. 1. Schéma mechanicky promíchávaného modelového fermentoru (objem vsádky $V = 0,025$ m³)

veličina	ϕd	ϕD	ϕd_1	H	H_2	H_2'	h	L	b
rozměry (mm)	100	310	80	100	100	108	15	20	33

Schéma fermentace s přídatnými zařízeními je na obr. 2. *Dezintegrace*: buněčná suspenze byla homogenizována 3 minuty v homogenizátoru podle Elvehjem-Pottera s teflonovým pístem při 4 °C. V homogenizátoru byla stanovena glukosaisomerasová aktivita za použití „enzymového testu ke stanovení glukosy“ (výrobce Lachema), založeného na izomeraci fruktosy na glukosu a jejím následným stanovením enzymem glukosaoxidasy [4].



Obr. 2. Schéma zapojení fermentoru

1 — elektromotor, 2 — přívod páry, 3 — přívod chladicí vody, 4 — odvod chladicí vody, 5 — odvod kondenzátu, 6 — vzorkovač, 7 — odvod vzduchu, 8 — regulátor teploty, 9 — sonda pro odměňování, 10 — čerpadlo pro odměňovací olej, 11 — pH metr, 12 — regulátor pH, 13 — čerpadlo na NaOH, 14 — digitální otáčkoměr

Proteasová aktivita byla stanovena azokaseinovou metodou popsanou Šafaříkem [5]. Utilizace cukrů během fermentace byla měřena plynovou chromatografií s plameno-ionizační detekcí [F 21 Perkins Elmer]. Cukry byly analyzovány ve formě trimethylsilylderivátů [6].

Výsledky a diskuse

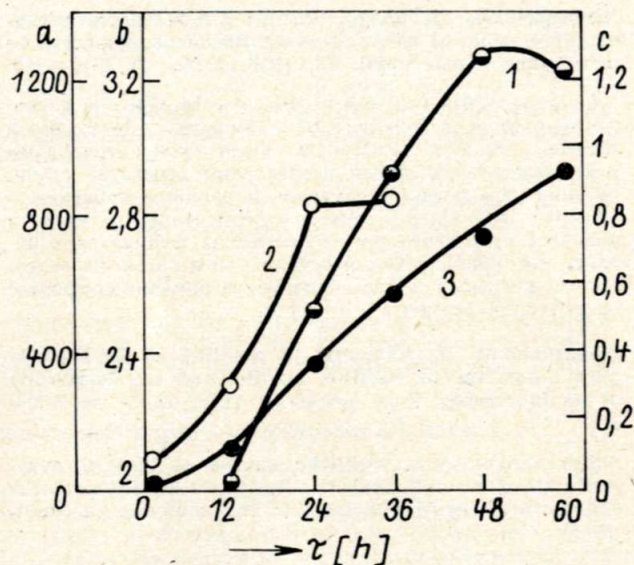
V popsaném fermentoru byly provedeny dva fermentační pokusy. Podmínky dvou fermentací jsou sumari-zovány v tabulce 1.

Průběh první fermentace z hlediska tvorby biomasy, glukosaisomerasové a proteasové aktivity je zachycen na obr. 3.

Při druhé fermentaci byla zvýšena frekvence otáčení míchadla a do produkčního média byl přidán pouze vý-

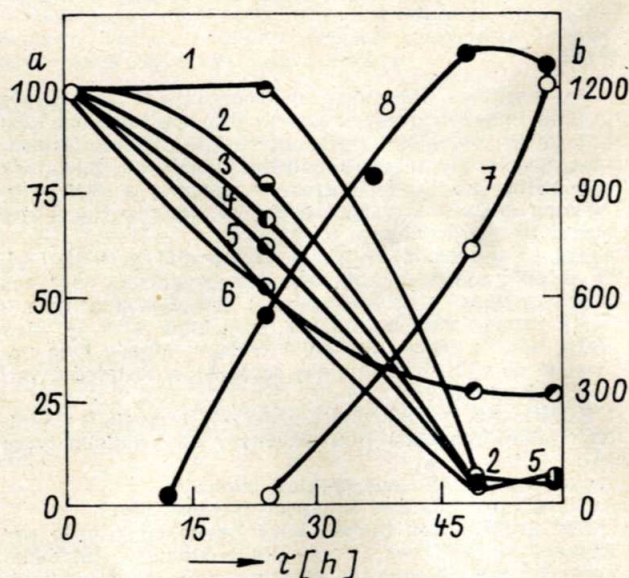
Tabulka 1. Podmínky fermentace *Streptomyces nigri-ficans* 82/20

	Pokus č. 1	Pokus č. 2
teplota	28 °C	28 °C
průtok vzduchu	$\dot{V}_{g1} = 1.10 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ $\dot{V}_{g2} = 2.10 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	$\dot{V}_{g1} = 1.10 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ $\dot{V}_{g2} = 2.10 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
pH	6,8–7,0	6,8–7,0
frekvence otáčení míchadla	$N_1 = 3,33 \cdot \text{s}^{-1}$ $N_2 = 6,67 \cdot \text{s}^{-1}$	$N_1 = 5,00 \cdot \text{s}^{-1}$ $N_2 = 8,33 \cdot \text{s}^{-1}$
koncentrace	0,2 %	—
D-xylosy v médiu	+D-xylosa obsažená ve výluhu z pšeničných otrub	pouze D-xylosa vázaná v pšeničných otrubách
doba kultivace	60 h $\tau_1 = 12 \text{ h}$ $\tau_2 = 48 \text{ h}$	50 h $\tau_1 = 12 \text{ h}$ $\tau_2 = 38 \text{ h}$



Obr. 3. Kinetika růstu a tvorby glukosaisomerasy *Streptomyces nigri-ficans* 82/20

a = aktivita GI (nkat.g⁻¹ sušiny) (1)
b = sušina mycelia (g.cm⁻³) (2)
c = proteolytická aktivita (ΔA₃₆₆.cm⁻³ kultivačního média) (3)



Obr. 4. Procentní vyjádření úbytku cukrů během fermentace *Streptomyces nigri-ficans* 82/20

a = pokles koncentrace cukrů (%)
b = aktivita glukosaisomerasy (nkat.g⁻¹ sušiny)
1 — α-D-glukosa, 2 — α-D-glukosa, 3 — α-D-xylosa, 4 — α-D-galaktosa, 5 — β-D-xylosa, 6 — α-D-mannosa, 7 — D-fruktosa, 8 — aktivita glukosaisomerasy

luh z pšeničných otrub, který podle již dříve zjištěných faktů byl popsán [7] jako zdroj xylanů a D-xylosy pro indukci glukosaisomerasy. Vzhledem k tomu, že během druhé fermentace nebyla detekována žádná glukosaisomerasová aktivita, došli jsme k závěru, že *Streptomyces nigri-ficans* 82/20 nemá xylanázovou aktivitu. Zatímco nárůst biomasy v obou fermentacích byl srovnatelný, proteasová aktivita během druhé fermentace vzrostla téměř 3krát.

Utilizace cukrů během první fermentace je znázorněna na obr. 4.

Z výsledků je patrný značný pokles obsahu cukrů v médiu již po 24 hodinách fermentace a jejich téměř úplné vyčerpání po 50 hodinách kultivace. Z cukrů byla

nejrychleji využívána β -D-xylosa. Po 25 h byl v médiu detektován další monosacharid, D-fruktosa, pravděpodobně jako produkt působení glukosaisomerasy. Množství D-fruktosy vzrůstalo až do ukončení fermentace (50 h).

Z těchto výsledků lze vyvodit, že by bylo výhodnější přidávat cukr během fermentace 2krát, a to na začátku a v 25. hodině fermentace.

Maximální produkce glukosaisomerasy byla zjištěna v 50. hodině fermentace.

Na závěr lze konstatovat, že použité vzdušnění, zrovna tak i rotační rychlost míchadla (tab. I) velmi dobře odpovídají koncepci dvoufázové fermentace u vláknitých mikroorganismů. Z uvedených výsledků lze zjistit vhodné podmínky pro fermentaci *Streptomyces nigrificans* 82/20 v provozním fermentoru.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

Literatura

- [1] MACHOŇ, V., FORT, I., VLČEK, J., FENCL, Z., SEICHERT, L., MUSÍLKOVÁ, M.: Biotech. Bioeng. **20**, 1978, 1879—1883.
- [2] NAGATA, S.: Mixing, Principles and Applications, John Wiley, New York, 1975.
- [3] DEMNEROVÁ, K., POSPÍŠIL, S., VALENTOVÁ, O., KÁŠ, J.: Biotech. Lett. **1**, 1979, 293—298.
- [4] DEMNEROVÁ, K., ŠAFAŘÍK, I., KRÁLOVÁ, B.: Biotech. Lett. **4**, 1982, 431—435.
- [5] SWELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M., WELLS, W. W.: J. Am. Chem. Soc. **85**, 1963, 2497—2507.
- [6] ŠAFAŘÍK, I.: J. Chrom. **261**, 1983, 138—141.
- [7] TAKASAKI, I.: Arg. Biol. Chem. **38**, 1974, 667—674.

Demnerová, K. — Fort, I. — Králová, B. — Šafařík, I. — Benešová, I.: Čtvrtprovozní fermentace *Streptomyces nigrificans*. Kvas. prům. **32**, 1986, č. 9, s. 215—217.

Byly stanoveny optimální podmínky pro růst vláknité bakterie *Streptomyces nigrificans* 82/20 a produkci

glukosaisomerasy a proteasové aktivity během její kultivace ve čtvrtprovozním fermentoru. Při fermentaci bylo použito dvou různých frekvencí míchání.

Демнерова, К., Форшт, И., Кралова, Б., Шафаржик, И., Бенешова, И.: Модельная ферментация микроорганизмов *Streptomyces nigrificans*. Квас. прум. **32**, 1986, № 9, стр. 215—217.

Были определены оптимальные условия культивирования бактерии *Streptomyces nigrificans* в ферменторе (50 л) для роста и продукции ферментов — глюкозаизомеразы и протеаз. Ферментации проводили при двух различных частотах мешалки.

Demnerová, K. — Fort, I. — Králová, B. — Šafařík, I. — Benešová, I.: Pilot-Plant Fermentation of *Streptomyces nigrificans*. Kvas. prům. **32**, 1986, No. 9, pp. 215—217.

The optimal conditions for *Streptomyces nigrificans* growth, yields of glucose isomerase and protease activity, during the fermentation in mechanically agitated pilot plant fermentor were tested. Fermentations were carried out using two different frequencies of the impeller rotational speed.

Demnerová, K. — Fort, I. — Králová, S. — Šafařík, I. — Benešová, I.: Kleinbetriebliche Fermentation von *Streptomyces nigrificans*. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 9, S. 215—217.

Es wurden die optimalen Bedingungen für das Wachstum der faserigen Bakterie *Streptomyces nigrificans* 82/20 und die Produktion der Glukoso-Isomerase- und Protease-Aktivität während ihrer Kultivierung in einem Kleinfärmentor bestimmt. Bei der Fermentation wurden zwei verschiedene Mischungsfrequenzen benutzt.