

Ing. VLADIMÍR FARKAŠ, CSC., Ing. MÁRIA LIŠKOVÁ, Ing. MIROSLAV GREŠÍK, Chemický ústav, CCHV SAV, Bratislava

Ing. IRENA SOLDÁNOVÁ, Enzymová poloprevádzka, Slovenské škrobárne, n. p., Trnava, závod Dolná Krupá
Dr. GERHARD KERNS, Ústav pre technickú chémiu AV NDR, Lipsko, NDR

Kľúčové slová: celulóza, fermentácia, *Trichoderma reesei*

ÚVOD

Jednou z podmienok ekonomickej produkcie celulózy je optimalizovanie fermentačného procesu tak, aby sa získala maximálna produktivita enzýmov za jednotku času na jednotkový objem. Okrem kvality produkčného kmeňa a živného média tu hrá nemalú úlohu zvolenie správneho fermentačného režimu (vsádková, prietoková, fed-batch kultivácia, profilácia teploty a pH atď.).

V 1. poloprevádzkovom pokuse o produkciu celulózy, ktorý sa konal v januári 1984 v Dolnej Krupej, sme si overili schopnosti nášho produkčného kmeňa *Trichoderma reesei* CC II pri submerznej kultivácii vsádkovým spôsobom na 3% mikrokryštalickej celulóze ako substráte v 1500 l fermentore. Dosiahnutá maximálna celulózová aktivita 7.5 FPU (115 nkat) · ml⁻¹ za 140 hodín kultivácie zodpovedá produktivite 53 FPU (820 nkat) · h⁻¹ · l⁻¹ a je zrovnateľná s výsledkami dosiahnutými na iných pracoviskách vo svete. Okrem toho sa pri 1. poloprevádzkovom pokuse odskúšal aj spôsob spracovania vyfermentovanej tekutiny a finalizácia enzýmu sušením v rozprašovacej sušičke.

Jednou z perspektívnych metód produkcie celulózy sa ukazuje byť tzv. fed-batch spôsob fermentácie [1, 2]. Ide tu v podstate o postupné dávkovanie jednotlivých živín do fermentora v priebehu kultivácie, v závislosti na fyziologickom stave kultúry. Tento je indikovaný rýchlosťou rastu, produkciou CO₂, intracelulárnym obsahom ATP, samovoľnou zmenou pH a inými parametrami. Postupné dávkovanie živín, hlavne uhľohydrátov a dusíkatých látok v priebehu fermentácie umožňuje konštantne vytvárať optimálne podmienky pre produkciu zvoleného metabolitu v priebehu celej kultivácie. Tohto spôsobu fermentácie sa dá s výhodou využiť hlavne v prípadoch, keď pre optimálnu produkciu je žiadúca tzv. limitácia substrátom. Limitovaním množstva substrátu v kultúre sa dá odstrániť katabolická represia tvorby

niektorých metabolitov a enzýmov, čo umožňuje pri celulózových fermentáciách využiť aj ľahko využiteľné cukry ako zdroje uhlíka.

Cieľom 2. poloprevádzkového pokusu produkcie celulózy, ktorý sa uskutočnil v januári 1985 a ktorý je predmetom tohto referátu, bolo odskúšať fed-batch spôsob kultivácie huby *Trichoderma reesei* s postupným dávkovaním uhlíkatého zdroja. Ako modelové substráty sme použili mikrokryštalickú celulózu a laktózu. Na monitorovanie fyziologického stavu mycélia sme použili stanovenie hladiny ATP v kultúre [3]. Ďalšími sledovanými parametrami boli rýchlosť poklesu pH kultúry, koncentrácia substrátu, hladina celulólytických enzýmov, hladina extracelulárnych bielkovín, koncentrácia biomasy, morfológia mycélia a mikrobiologická čistota kultúry.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimenty sa robili na 150 l fermentačnej aparatúre fy Elektrolux (Švédsko). Ako základné živné médium sme používali modifikovanú pôdu podľa Mandelsovej et al. [4]. Fermentor sa plnil 50 l média obsahujúceho 1% laktózy, resp. 1% mikrokryštalickú celulózu ako substrát a po sterilizácii a ochladení sa zaočkoval cca 10¹⁰ spórami katabolicky deprimovaného mutantu *Trichoderma reesei* CC II, suspendovanými 1 l 1% Tween 80. Fermentácia prebiehala pri nasledovných kontrolovaných parametroch:

teplota: 30 °C, po 48 h kultivácie znížená na 28 °C,

otáčky miešadla: 5 Hz,

vzdušenie: 50 dm³ · min⁻¹,

pH: 5,6, po samovoľnom poklese udržiavané na 3,5 prípravkom 20% NH₄OH, resp. 20% H₃PO₄.

Penenie sa potláčalo mechanicky, resp. dávkovaním odpeňovadla Dehysan. Každé 4 h sa z fermentora odberali vzorky na kontrolu jednotlivých ukazovateľov.

Z enzymových aktivit sme stanovovali celkovú celulózu aktivitu na filtračný papier ako substrát (FPA), endo-1,4- β -glukanázovú aktivitu na hydroxyetylcelulózu (HEC) a β -glukozidázovú aktivitu na 4-nitrofenyl- β -D-glukopyranozid ako substrát (BG) [5].

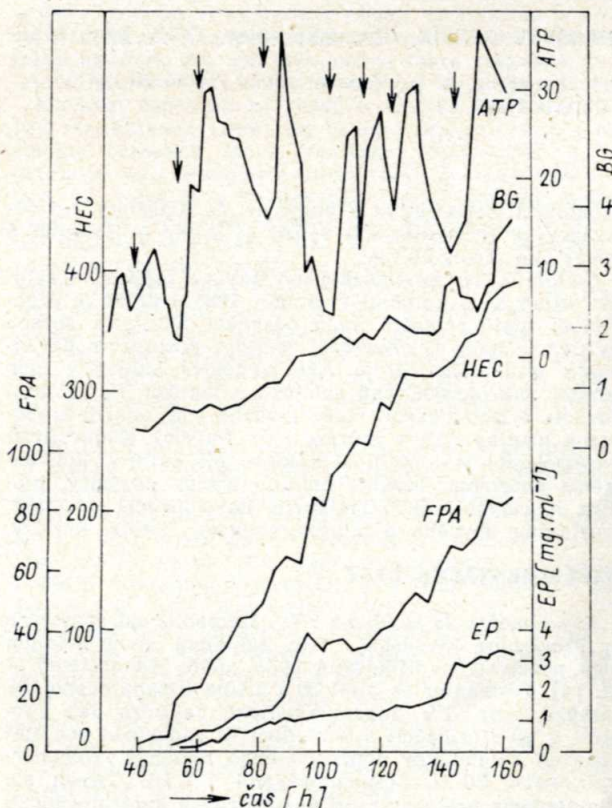
a) Fermentácia s laktózou

V dôsledku spotrebúvania substrátu z média a prudkého rastu mycélia sa do 30 h kultivácie neustále znižovala koncentrácia laktózy v médiu a narastala hladina ATP v kultúre. Po dosiahnutí maxima začala hladina ATP klesať. V tomto okamžiku sa do fermentora pridali 2 litre sterilného 10% roztoku laktózy. Pridavok substrátu vyvolal okamžitý nárast hladiny ATP, ktorá sa po dosiahnutí maxima opäť začala znižovať. Nasledoval ďalší pridavok laktózy a cyklus sa neustále opakoval až do ukončenia fermentácie.

Fermentácia trvala 160 h, pričom sa dosiahla maximálna celulózová aktivita (FPA) v médiu $85 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$, čo zodpovedá produktivite $530 \text{ nkat} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Výsledná aktivita endo-1,4- β -glukanázy bola $400 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ a β -glukozidázy $4,1 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ a myceliálna sušina bola $8,4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Objem kultúry vzrástol v dôsledku pridávania laktózy z 50 l na 72 l. Celkovo sa spotrebovalo 1,6 kg laktózy. Pribeh fermentácie s vyznačením hlavných parametrov je znázornený na obr. 1.

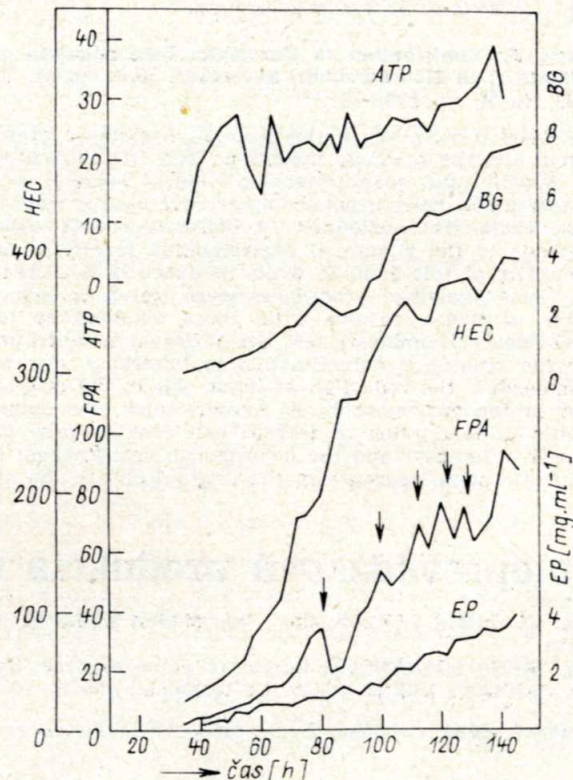
b) Fermentácia s mikrokryštalickou celulózą

V tomto prípade sme nenašli takú jednoznačnú koreláciu medzi poklesom koncentrácie substrátu a nárastom hladiny ATP v kultúre ako v prípade laktózy. Periodické pridávanie substrátu sa riadilo rýchlosťou poklesu pH, ktorá bola indikovaná spotrebou NH_4OH . Pri poklese



Obr. 1. Pribeh jed-batch fermentácie v 150 l fermenteri s laktózou ako substrátom. Šípky označujú pridávanie 2 l 5% roztoku laktózy. Enzymové aktivity sú vyjadrené v $\text{nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$. FPA — aktivita na filtračný papier; HEC — endoglukanázová aktivita na hydroxyetylcelulózu; EP — extracelulárny proteín; BG — β -glukozidázová aktivita; ATP — koncentrácia ATP v kultúre ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$).

rýchlosti spotreby NH_4OH sme do fermentora dávkovali po 2 l 10% suspenzie mikrokryštalickej celulózy v bazálnom médiu. Ako vidno z obr. 2, pridavok substrátu mal vždy za následok čiastočný pokles celulózovej aktivity (FPA) v médiu, čo si možno vysvetliť adsorpciou časti enzýmov na nerozpustný substrát [6]. Kolísanie enzymovej aktivity v dôsledku pridávania substrátu sa neprejavilo u endo-1,4- β -glukanázovej aktivity (HEC).



Obr. 2. Pribeh jed-batch fermentácie v 150 l fermenteri s mikrokryštalickou celulózą (MKC) ako substrátom. Šípky označujú pridávanie 300 g MKC v 10% suspenzii do fermentéra. Symboly a jednotky sú rovnaké ako v obr. 1.

Fermentácia trvala 150 h, pričom sa do fermentora v priebehu kultivácie pridalo 1,9 kg mikrokryštalickej celulózy. Objem kultivačnej zmesi vzrástol z pôvodných 50 l na 72 l. Maximálna dosiahnutá celulózová aktivita (FPA) bola $91 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$, čo zodpovedá produktivite $650 \text{ nkat} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$, endoglukanázová aktivita (HEC) bola $400 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ a maximálna β -glukozidázová aktivita bola $10,6 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$. Koncentrácia extracelulárnych bielkovín na konci kultivácie bola $3,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

DISKUSIA

Výsledky popísaných experimentov ukázali, že pri jed-batch spôsobe fermentácie môže byť laktóza ako zdroj uhlíka zrovnateľná s mikrokryštalickou celulózą. Tieto výsledky dávajú dobré perspektívy pre využitie sladkej srvátky ako substrátu, čo bude overené v ďalších pokusoch. Použitie srvátky, resp. laktózy ako substrátov má okrem ekonomických výhod aj ďalšie prednosti oproti rôznym formám čistej celulózy. Je to predovšetkým uľahčené dávkovanie substrátov do fermentora počas fermentácie a možnosť použitia vysokých koncentrácií zásobných roztokov. Pri mikrokryštalickej celulóze je použitie viac ako 15% suspenzií problematické, dochádza k sedimentácii celulózy a k zapchávaniu potrubia. Použitie riedkych suspenzií má za následok neželateľné zvyšovanie objemu fermentačných zmesí. Ideálne by bolo dávkovanie sterilného substrátu v suchom stave [1], čo by si však vyžadovalo konštrukciu špeciálneho

Tabuľka 1. Charakterizácia enzýmového preparátu celulózy DK 85/1

Sušina	98,8 %
Bielkoviny	34 %
FPA-aktivita	5,9 nkat . mg ⁻¹
HEC-aktivita	32,5 nkat . mg ⁻¹
CMC-aktivita (C _x)	147 kat . mg ⁻¹
β-glukozidáza	0,43 nkat . mg ⁻¹

zariadenia. Z parametrov, ktoré bude treba pri budúcich fermentáciach sledovať, je koncentrácia CO₂ v odplyne, ktorá je spolu s hladinou ATP dôležitým ukazovateľom metabolickej aktivity mycélia. Oproti hladine ATP má ukazovateľ koncentrácie CO₂ v odplyne tú výhodu, že sa dá kontinuálne automaticky monitorovať počas celej fermentácie.

V tejto časti práce sme sa nezaoberali problematikou izolácie celulózy z vyfermentovanej pôdy. V minulých pokusoch sa nám osvedčila filtrácia mieda cez bubnový vákuový filter, zahustenie filtrátu ultrafiltráciou na 1/20 pôvodného objemu a sušenie enzýmu v rozprašovacej sušičke. Enzýmové preparáty získané takýmto spôsobom nestrácajú viac ako 15 % pôvodnej aktivity počas 1-ročného skladovania pri izbovej teplote a prakticky k žiadnym stratám aktivity nedochádza počas skladovania pri 4°C. Hlavné charakteristiky technického celulóзовého preparátu pripraveného uvedeným postupom uvádza tab. 1.

Literatúra

- [1] HENDY, N. A., WILKE, C. R., BLANCH, H. W.: Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C-30. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 1984, s. 73–77
- [2] GOTTFALDOVÁ, M., KUČERA, J., PODRAZKY, V.: Enhancement of cellulase production by *Trichoderma viride* using carbon/nitrogen double fed-batch. *Biotechnol. Lett.* **4**, 1982, s. 229–232
- [3] COCHET, N., TYAGI, R. D., GHOSE, T. K., LEBEAULT, J. M.: ATP measurement for cellulase production control. *Biotechnol. Lett.* **6**, 1984, s. 155–160
- [4] MANDELS, M., WEBER, J.: The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.* **95**, 1969, s. 391–414
- [5] Measurement of cellulase activities. Commission on Biotechnology IUPAC, Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, Delhi, New Delhi, India (T. Ghose, ed.), 1984
- [6] PEITERSEN, N., MEDEIROS, J., MANDELS, M.: Adsorption of *Trichoderma cellulase* on cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1977, s. 1091–1094

Farkaš, V. - Lišková, M. - Grešík, M. - Soldánová, I. - Kerns, G.: Poloprevádzková produkcia celulózy. *Kvas. prům.* **32**, 1986, č. 10, s. 241–243.

Na 150 l fermentačnom zariadení fy Elektrolux (Švéd-

sko) sme odskúšali kultiváciu huby *Trichoderma reesei* vo fed-batch režime s dávkovaním uhlíkatého zdroja. Ako substráty sme porovnávali laktózu a mikrokryštalickú celulózu. Dosiahnuté hladiny celulózy (FPA) sa pohybovali okolo 85 nkat.ml⁻¹ (5 IU.ml⁻¹) po 140 h kultivácie s obidvomi substrátmi, nárast aktivity bol však rýchlejší pri použití mikrokryštalickej celulózy.

Фаркаш, В., Лишкова, М., Грешик, М., Солданова, И., Кернс, Г.: Полупромышленное производство целлюлозы. *Квас. прум.* **32**, 1986, № 10, стр. 241–243.

V 150-litrovom fermentačnom zariadení firmy Elektrolux (Švédsko) bolo provedeno kultivovanie huby *Trichoderma reesei* v režime fed-batch s dozovaním zdroja uhlíka. V kvalite substrátov sa porovnávali laktóza a mikrokryštalická celulóza. Dostignuté úrovne aktivity celulózy (FPA) nahodili sa okolo 85 nkat.ml⁻¹ (5 IU.ml⁻¹) po 140 h kultivovania pri oboch substrátoch, rast aktivity bol, avšak, rýchlejší pri použití mikrokryštalickej celulózy.

Farkaš, V. - Lišková, M. - Grešík, M. - Soldánová, I. - Kerns, G.: Pilot Scale Production of Cellulase. *Kvas. prům.* **32**, 1986, No. 10, pp. 241–243.

A 150-liter fermentor from Elektrolux (Sweden) was used to test the production of cellulases from *Trichoderma reesei* in fed-batch regime using the stepwise additions of carbon source. As substrates, lactose and microcrystalline cellulose were compared. The obtained levels of cellulase activities (FPA) were around 85 nkat.ml⁻¹ (5 IU.ml⁻¹) after 140 h cultivation with both substrates used, however the increase of cellulase activity with microcrystalline cellulose was faster as that with lactose.

Farkaš, V., Lišková, M., Grešík, M., Soldánová, I., Kerns, G.: Produktion der Cellulase in Pilotmaßstab. *Kvas. prům.* **32**, 1986, Nr. 10, S. 241–243.

Ein 150-l Fermentor von der Firma Elektrolux (Schweden) wurde zum Testen der Cellulase produktion mit *Trichoderma reesei* in fed-batch Regime mit stufenweiser Addition der Kohlenstoffquelle benutzt. Als Substraten haben wir Laktose und mikrokrySTALLINE Cellulose verglichen. Die erreichten Cellulaseaktivitäten (FPA) waren um 85 nkat.ml⁻¹ (5 IU.ml⁻¹) nach 140 h Kultivation mit beiden Substraten. Jedoch, mit mikrokrySTALLINEN Cellulose war der Anstieg der Cellulaseaktivität im Medium schneller als mit Laktose.