

УДК 579.841.222

О. В. КАРПЕНКО, В. А. ЄРОХІН, М. В. ПРИСТАЙ, О. М. ШУЛЬГА

ЗАСТОСУВАННЯ ВИХРОВОГО ФЕРМЕНТЕРА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОДУКТІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка
НАН України, м. Львів

Встановлено ефективність застосування ферментера з вихровою системою аерації для мікробного синтезу позаклітинних і клітинозв'язаних поверхнево-активних ліпідів, емульгаторів і ферментів. Показано можливість застосування біореактора даного типу для культивування мікроорганізмів, зростання яких супроводжується інтенсивним піноутворенням, без застосування піногасників.

Вступ

Важливим етапом створення сучасних технологій мікробного синтезу є масштабування ферментаційного процесу від лабораторних умов до об'ємів промислового виробництва. Першочерговою задачею при цьому є вибір оптимальної моделі біореактора. На даний час у промисловості використовується велика кількість ферментерів, які відрізняються за конструкцією, способами аерації та перемішування. Кожен із них має свої переваги та недоліки. Найчастіше застосовуються біореактори для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів, які традиційно поділяються на три групи (за способом підведення енергії на перемішування): з газовою фазою, з перемішувачем та комбіновані. Найбільш поширеними є комбіновані біореактори, в яких енергія передається як з газовою фазою (барботером), так і з перемішувачем (мішалкою) [1].

Основними критеріями при виборі системи ферментера є забезпечення достатнього масообміну за киснем та рідкою фазою. Крім того, важливою проблемою є піноутворення при культивуванні мікроорганізмів.

Останнім часом ведуться дослідження щодо можливості використання ферментерів нових конструкцій, які б були більш ефективними у порівнянні з класичними біореакторами. Сюди належать реактори з самовсмоктуючими мішалками, струменеві, плівкові, газо-вихрові, реактори з пористим днищем, із напівпроникними перегородками та інші [2–4]. Але на даний час вони, як правило, відрізняються складністю конструкції та вузькою сферою ефективного застосування, що обмежує їх широке промислове застосування.

У даній роботі виконувались дослідження з застосування біореактора з вихровою системою аерації для культивування мікроорганізмів. Принцип його дії полягає у створенні керованого тривимірного вихрового потоку всередині реактора, що забезпечує інтенсивне перемішування культурального середовища та насичення його киснем повітря [5]. Коефіцієнт масоперенесення за киснем у такій системі у кілька разів більший, ніж при барботажній аерації. Однією із основних переваг даної моделі ферментера є вирішення проблеми піногасіння. Завдяки наявності вихрового потоку піна, що утворилася на поверхні рідкої фази, миттєво

засмоктуються всередину вихору і рівномірно розподіляється по всьому об'єму середовища, насичуючи його киснем. Параметри потоку та вміст кисню у середовищі легко регулюються зміною швидкості обертів перемішуючого пристрою.

Метою даної роботи було дослідження ефективності культивування бактеріальних штабів — продуцентів поверхнево-активних речовин, емульгаторів та ферментів у біореакторі з вихровою системою аерації.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували бактеріальні штаби з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України: *Pseudomonas* sp. PS-17 — продуцент позаклітинних поверхнево-активних речовин (ПАР) — рамноліпідів [6], *Bacillus circulans* L1 — продуцент позаклітинного ферменту пектаттранселімінази [7], а також штаб *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, що є продуцентом клітиннозв'язаних ПАР — трегалозоліпідів та жирних кислот, а також позаклітинного емульгатора полісахаридної природи [8].

Для вирощування бактерій використовували поживні середовища наступного складу: для *Pseudomonas* sp. PS-17 (г/л): гліцерин — 30; натрію цитрат — 4,0; NaNO_3 — 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; KH_2PO_4 — 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 (рН 6,8–7,0). Для *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 (г/л): гексадекан — 25,0 (середовище № 1) або сахароза — 30,0 (середовище № 2); $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ — 1,5; дріжджовий екстракт — 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; KH_2PO_4 — 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; натрію цитрат — 1,0 (рН 6,8–7,0). Для *Bacillus circulans* L1 (г/л): сахароза — 30; натрію цитрат — 4,0; $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ — 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; KH_2PO_4 — 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; дріжджовий екстракт — 1,0 (рН 6,8–7,0).

Культивування бактерій виконували у колбах Ерленмейєра (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland), швидкість обертів 220 об./хв, за температури 30°C. Як інокулянт використовували 24-годинну культуру (титр клітин $2 \cdot 10^8$ кл/мл), вирощену на відповідному поживному середовищі. Посівний матеріал вносили у кількості 10% від об'єму поживного середовища.

Культивування мікроорганізмів здійснювали також у лабораторному ферментері з вихровою системою аерації об'ємом 5 л. Умови культивування (склад поживного середовища, кількість посівного матеріалу, температура, рН) були аналогічними процесу вирощування у колбах. Стерилізацію ферментера виконували разом з поживним середовищем (40 хв, температура 132°C).

У процесі ферментації контролювали такі параметри: біомасу, концентрацію цільового продук-

ту, рН середовища, температуру, вміст розчиненого кисню у культуральній рідині. Значення рН середовища, температури визначали на автоматичному аналізаторі «Експерт-001-4.0.1» (ООО «Эконикс-Эксперт», Росія) за допомогою відповідних електродів, у режимі реального часу.

Аерацію культурального середовища здійснювали за допомогою компресора (SERA air550R, “Sera”, Germany) з витратою повітря $1 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{хв}$. та контролювали із застосуванням лабораторного ротаметру.

Параметри утворення вихору, перемішування та швидкість перенесення кисню у культуральній рідині регулювали за допомогою дволопатевої турбінної мішалки з нижнім приводом, змінюючи швидкість обертання в межах 100–1000 об./хв.

Біомасу бактерій визначали гравіметричним методом [9]. Питому швидкість зростання мікроорганізмів розраховували, як описано в роботі [10]. Тривалість лаг-фази визначали за методом Лоджа — Хіншельвуда [11].

Концентрацію розчиненого кисню у поживному середовищі визначали за допомогою кисневого електрода ДКТП-02.4 (ООО «Эконикс-Эксперт», Росія). Швидкість розчинення кисню у середовищі, коефіцієнт масопередачі $K_{L,a}$ у реакторі та швидкість поглинання кисню в процесі культивування визначали за методом [12].

Концентрацію рамноліпідів у культуральній рідині штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 визначали після їх попередньої екстракції сумішшю хлороформ-ізопропанол (2:1) за орциновим методом на спектрофотометрі Shimadzu-1250UV (“Shimadzu”, Japan) [13].

Концентрацію клітинних ліпідів штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 визначали гравіметричним методом після екстракції сумішшю хлороформ-ізопропанол (2:1) [10].

Активність пектаттранселімінази у супернатанті культуральної рідини штаму *B. circulans* L1 визначали спектрофотометричним методом [14].

Результати та обговорення

Основною умовою функціонування вихрової системи аерації є досягнення певної критичної швидкості перемішування $N_{\text{крит.}}$, за якої вихор досягає дна реактора, що сприяє утворенню зони від'ємного тиску всередині вихору. Завдяки цьому відбувається всмоктування повітря з атмосфери у культуральне середовище і різке зростання коефіцієнту масопереносу $K_{L,a}$. Величина $N_{\text{крит.}}$ залежить від геометричних параметрів реактора та в'язкості культурального середовища [15]. Для даного реактора критична швидкість перемішування становила 450 об./хв, коефіцієнт заповнення — 0,8. Принципова схема та зовнішній вигляд реактора з вихровою системою аерації наведені на рис. 1.

Здійснено порівняння параметрів масоперенесення кисню у поживному середовищі при культи-

уванні бактерій у колбах, у ферментері з барботером і перемішуючим пристроєм та у ферментері з вихровою системою аерації. Результати наведені в табл. 1.

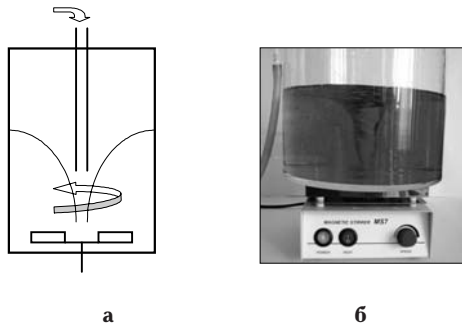


Рис. 1. Принципова схема (а) та зовнішній вигляд (б) вихрового біореактора

Аналіз даних показав, що при культивуванні мікроорганізмів у ферментері з вихровою системою аерації було досягнуто більш високих показників масопереносу, ніж у біореакторі із барботером та мішалкою, а також при вирощуванні у колбах. При цьому знижується витрата аераційного повітря, що зменшує інтенсивність піноутворення і, таким чином, дозволяє ефективніше використовувати об'єм реактора.

Для дослідження ефективності вихрового біореактора було обрано бактеріальний штаб *Pseudomonas* sp. PS-17 — продуцент позаклітинних поверхнево-активних речовин. Відомо, що культиву-

вання даного штаму супроводжується інтенсивним піноутворенням, що створює значні технологічні проблеми у виробництві.

Досліджено динаміку процесу періодичного культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у колбах та ферментері з вихровою системою аерації. Дані надані на рис. 2.

Отже, при культивуванні штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 як на качалці, так і у вихровому біореакторі, стаціонарна фаза зростання досягається через 72 год. При цьому максимальна концентрація АСБ при зростанні у біореакторі була на 26% більшою, ніж у колбах. Максимальна питома швидкість зростання в обох варіантах спостерігалася у середині експоненційної фази росту (30–40 год) і становила 0,18 год⁻¹ та 0,20 год⁻¹ відповідно. При зростанні у колбах активне накопичення продукту починається через 24 год і досягає максимуму після 120 год культивування. У ферментері біосинтез ПАР починається вже з перших годин та досягає максимуму через 100 год після початку ферментації. Отже, тривалість культивування у вихровому біореакторі можна скоротити на 20 год, що є важливим з точки зору економічної ефективності процесу. Крім цього, вихід цільового продукту при культивуванні у даному ферментері збільшувався на 87%. Максимальна продуктивність культури в обох варіантах спостерігалася після 72 год зростання і становила 0,082 г/л·год⁻¹ та 0,141 г/л·год⁻¹ відповідно. Порівняння основних показників культивування шта-

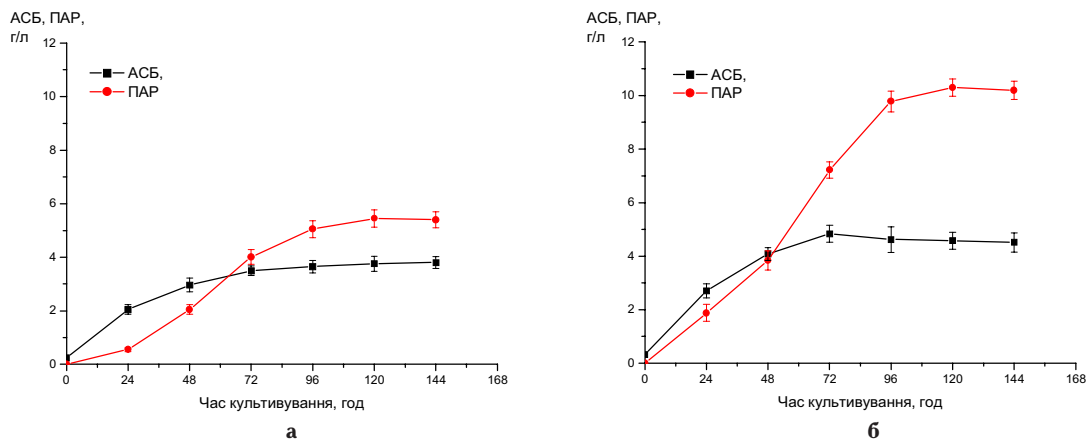


Рис. 2. Динаміки культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на колбах (а) та ферментері з вихровою системою аерації (б); АСБ — абсолютно суха біомаса; ПАР — поверхнево-активні речовини

Таблиця 1

Порівняння показників аерації при різних системах ферментації

Показник	Культивування у колбах на качалці	Ферментер з барботером і мішалкою*	Вихровий ферментер
Швидкість перенесення кисню, кг/м ³ ·год	0,2–0,6	1–5	2–8
Об'ємний коефіцієнт масоперенесення, год ⁻¹	20–140	325–1000	1000–2000
Витрата повітря на аерацію, м ³ /м ³ ·хв	—	1–4	0,4–1,0
Коефіцієнт заповнення	0,2	0,6	0,8

Примітка: * — дані з [2, 16].

му *Pseudomonas* sp. PS-17 наведено у табл. 2.

Отже, при застосуванні біореактора з вихровою системою аерації для біосинтезу ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 вдалося підвищити вихід цільового продукту та зменшити тривалість процесу.

Досліджено ефективність застосування вихрового біореактора для одержання інших продуктів мікробного синтезу: клітиннозв'язаних ліпідів і позаклітинного емульгатора штаму *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122, а також ферменту пектат-транселімінази штаму *Bacillus circulans* L1.

Штам *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 синтезує клітиннозв'язані ліпіди (трегалозоліпіди і жирні кислоти), а також каротиноїди і позаклітинний емульгатор полісахаридної природи. Вказані продукти мікробного синтезу є перспективними для біотехнологічного виробництва [8]. Однак низький вихід обмежує їх використання у промисловості. Отже, оптимізація біосинтезу даних речовин є актуальним завданням.

Досліджено процес культивування штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 у колбах на качалці і у вихровому ферментері (рис. 3).

Даний штам вирощували на поживному середовищі №1, що є оптимізованим для синтезу клітиннозв'язаних ліпідів. Показано, що при культивуванні у біореакторі максимальний вихід біомаси спостерігається через 120 год, що на 24 год пізніше, ніж у колбах. У той же час, вихід біомаси зростає на 79% порівняно зі зростанням у колбах. В обох варіантах синтез продукту починається у фазі експоненційного зростання і досягає максимуму че-

рез 120 год. При культивуванні у ферментері продукується 9,85 г/л клітиннозв'язаних ліпідів, що на 84% більше, ніж у колбах.

Результати показують, що при використанні вихрового біореактора досягалося практично двократне підвищення виходу АСБ та ПАР від субстрату (табл. 3). При цьому продуктивність біомаси за ліпідами практично не змінювалася. Це свідчить, що аерація, можливо, є лімітуючим фактором процесу і безпосередньо впливає на вихід біомаси, а відповідно і цільового продукту.

Досліджено також динаміку культивування штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 у колбах та вихровому ферментері на середовищі № 2, яке застосовується для синтезу позаклітинного емульгатора. Результати показали зростання його виходу на 17% (з 7,82 до 9,15 г/л) при культивуванні у ферментері.

Отримані дані свідчать про перспективність застосування вихрового біореактора для виробництва ПАР та емульгатора штамом *G. rubripertincta* УКМ Ас-122.

Штам *Bacillus circulans* L1 синтезує комплекс різних ферментів, основним з яких є пектат-транселіміназа. Даний ферментний комплекс широко використовується у сільському господарстві для підвищення ефективності засвоєння кормів у тваринництві. Тому удосконалення технології біосинтезу для збільшення виходу даного продукту є актуальною проблемою біотехнології.

Результати дослідження динаміки зростання та біосинтезу цільового продукту штамом *Bacillus circulans* L1 при культивуванні у колбах та у фер-

Таблиця 2

Показники процесу культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17

Показник	Культивування у колбах на качалці	Культивування у ферментері
АСБ _{max} , г/л	3,80±0,16	4,80±0,18
ПАР _{max} , г/л	5,50±0,14	10,30±0,20
Вихід АСБ від субстрату $Y_{x/s}$, г/г	0,147	0,171
Вихід ПАР від субстрату $Y_{p/s}$, г/г	0,229	0,363
Вихід ПАР від АСБ $Y_{p/x}$, г/г	1,447	2,137

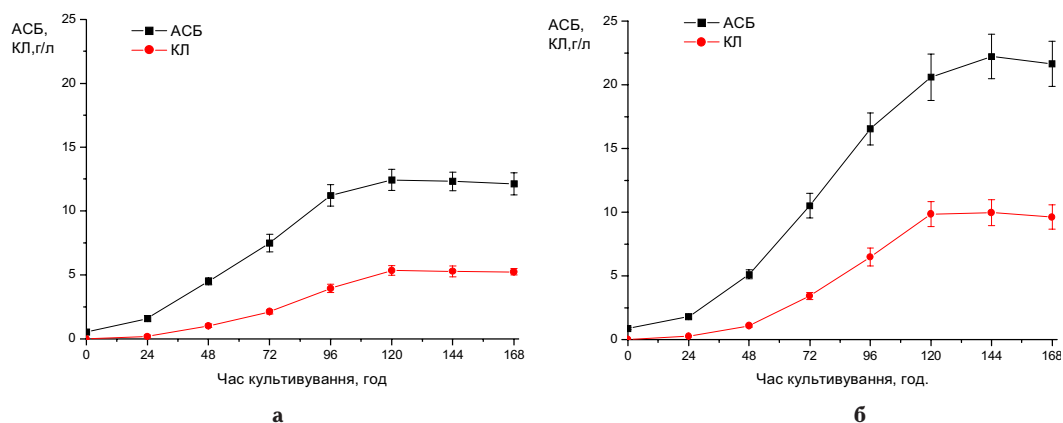


Рис. 3. Динаміки культивування штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 у колбах (а) та ферментері з вихровою системою аерації (б); АСБ — абсолютно суха біомаса; КЛ — клітинно-зв'язані ліпіди

Показники процесу культивування штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122

Показник	Культивування у колбах на качалці	Культивування у ферментері
АСБ _{max} , г/л	12,4±0,5	22,2±0,5
ПАР _{max} , г/л	5,35±0,14	9,85±0,18
Вихід АСБ від субстрату $Y_{x/s}$, г/г	0,496	0,888
Вихід ПАР від субстрату $Y_{p/s}$, г/г	0,214	0,399
Вихід ПАР від АСБ $Y_{p/x}$, г/г	0,431	0,450

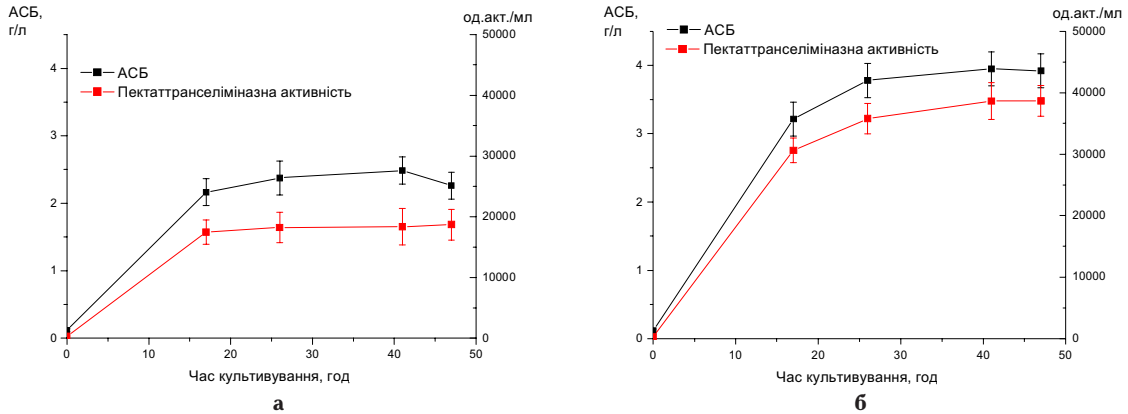


Рис. 4. Динаміки культивування штаму *Bacillus circulans* L1 у колбах на лабораторній качалці (а) та ферментері з вихровою системою аерації (б)

Показники процесу культивування штаму *Bacillus circulans* L1

Показник	Культивування у колбах	Культивування у ферментері
АСБ _{max} , г/л	2,49±0,10	3,95±0,12
Активність пектаттранселімінази E_{max} , $\times 10^{-3}$ од. акт./мл	18,7±0,4	38,7±0,5
Вихід АСБ від субстрату $Y_{x/s}$, г/г	0,083	0,132
Активність пектаттранселімінази на одиницю субстрату $Y_{p/s}$, од. акт./г	0,623·10 ⁶	1,290·10 ⁶

ментері з вихровою системою аерації надані на рис. 4.

Одержані дані показують, що при вирощуванні культури у вихровому біореакторі вихід біомаси був на 59% більший, ніж у колбах на качалці (рис. 4). Зростання пектаттранселіміназної активності узгоджувалися зі значенням біомаси і досягали максимуму у стаціонарній фазі. Максимальна ферментативна активність культуральної рідини штаму *Bacillus circulans* L1, вирощеного у вихровому ферментері, була у 2,1 рази більшою, ніж у колбах. Порівняння показників процесу культивування наведено в табл. 4.

Таким чином, завдяки умовам, що створюються у біореакторі з вихровою системою аерації, вихід біомаси зростає у 1,5 рази, активність пектаттранселімінази — у понад 2 рази. На основі експериментальних даних можна зробити висновок про перспективність використання вихрового біореактора для одержання ферментних препаратів.

Висновки

1. Експериментально доведено, що застосування біореактора з вихровою системою аерації забезпечує суттєве збільшення виходу позаклі-

тинних та клітиннозв'язаних поверхнево-активних ліпідів, емульгаторів і ферментів, а також зменшення тривалості культивування продуцентів у порівнянні з процесом у колбах.

2. Показано, що у біореакторі даного типу коефіцієнт масоперенесення за киснем є значно більшим, ніж у ферментерах із барботажною системою аерації, що дозволяє зменшити витрати повітря на аерацію, а відповідно й енергетичні витрати. Інтенсивність аерації легко регулюється шляхом зміни швидкості перемішуючого пристрою.

3. Завдяки застосуванню системи вихрової аерації вирішується проблема піногаєння, що дозволяє збільшувати коефіцієнт заповнення реактора до 0,8. Отже, ферментер даної конструкції може бути рекомендований для культивування мікроорганізмів, ріст яких супроводжується інтенсивним піноутворенням, зокрема, продуцентів ПАР.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Про-

цеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Навчальний посібник. — Львів: Інтеллект-Захід” 2008. — 736 с.

2. *Войнов Н.А.* Улучшение экологичности и повышение эффективности биохимических производств // Химия растительного сырья. — 1998. — № 1 — С.33-43.

3. *Мертвецов Н.П.* Газовихревые биореакторы «Биок». Использование в современной биотехнологии. — Новосибирск: Наука, 2002. — 118 с.

4. *Kronemberger F., Santa Anna L., Fernandes A.* Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor // Appl. Biochem. Microbiol. — 2008. — № 147. — P.33-45.

5. *Chisti Y., Moo-Young M.* Aeration and mixing in vortex fermenters // J. Chem. Tech. Biotechnol. — 1993. — № 58. — P.331-336.

6. Патент України № 71792 А Поверхнево-активний біопрепарат // Карпенко О.В., Мартинюк Н.Б., Шульга О.М., Вільданова Р.І., Покинсьброда Т.Я., Цеглова Н.С. — № 20031212346, Опубл. 15.12.2004. — Бюл. № 12. — 4 с.

7. Біогенні поверхнево-активні речовини для підвищення ефективності кормів сільськогосподарських тварин / О.М. Шульга, О.В. Карпенко, В.В. Гуменюк, М.Д. Петрів // Наук. вісн. Львівського нац. університету вет. медицини та біотехнологій. — 2010. — Т.12. — № 2 (44). — Ч.3. — С.270-274.

8. *Пристай М.В., Карпенко О.В.* Вплив джерел

азоту на синтез гліколідів, екзополісахаридів і каротиноїдів бактеріальним штамом *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122. // Вісник НУ «Львівська політехніка». Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. — 2009. — № 644. — С.120-122.

9. *Методы общей бактериологии / Ред. Ф. Герхардта и др.* — М.: Мир, 1983. — Т.1. — 535 с.

10. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М: Мир, 1978. — 331 с.

11. *Lodge R.M., Hinshelwood C. N.* // J. Chem. Soc. — 1943. — 213.

12. *Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A.* Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source // Appl. Environ. Microbiol. — 1984. — Vol.48. — P.301-305.

13. *Folch J., Lees M., Sloane G.H.S.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol.226. — P.497-509.

14. ГОСТ 20264.3-81. Препараты ферментные. Методы определения пектолитического комплекса. — М.: Изд-во стандартов, 1981. — 15 с.

15. *Rao A.R.* Vortex behavior of an unbaffled surface aerator // Science Asia. — 2009. — № 35 — P.183-188.

16. *Ozbek B., Gayik S.* The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor // Process Biochemistry. — 2001. — № 36. — P.729-741.

Надійшла до редакції 1.11.2011