



Monitorowanie aktywności metabolicznej *A. niger* w procesie sterowania biotransformacją glukozy do kwasu glukonowego w systemie *on-line*

Waldemar Podgórski

Katedra Biotechnologii Żywności, Instytut Chemii i Technologii Żywności, Akademia Ekonomiczna, Wrocław

On-line monitoring of *A. niger* metabolic activity in biotransformation of glucose to gluconic acid

Summary

Control parameters directly connected with metabolism of microorganism that reflect its actual activity in gluconic acid biosynthesis can be chosen basing on mass balance of the process. The relatively high correlation between parameters, normally determined via sample analysis and microorganisms' respiratory activity, enabled on-line estimation of biomass growth, product formation, and substrate uptake rate. The estimated parameters were continuously measured and employed to on-line control of gluconic acid overproduction by *Aspergillus niger* W78B strain. The application of the noninvasive technique for parameters determinations allowed obtaining high effectiveness of product formation characterized by the yield coefficient equals 1.0 g g^{-1} and product formation rate amounted to $5 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

The estimation of the parameters cannot be used instead of their quantitative determinations, but it gives a possibility of on-line monitoring and control of the process.

Key words:

gluconic acid, biosynthesis, *Aspergillus niger*, non-invasive technique, monitoring.

Adres do korespondencji

Waldemar Podgórski,
Katedra Biotechnologii
Żywności,
Instytut Chemii
i Technologii Żywności,
Akademia Ekonomiczna,
ul. Komandorska 118/120,
53-345 Wrocław;
e-mail:
waldemar.podgorski@ae.
wroc.pl

1. Wprowadzenie

Kwas glukonowy (GA) stosunkowo łatwo otrzymuje się na drodze chemicznej poprzez utlenienie glukozy. Jednak zastosowanie tak otrzymanego produktu w farmaceutyce, kosmetyce czy przetwórstwie żywności budzi uzasadnione opory. Kwas glukonowy dodawany jest do żywności jako antyoksydant (1), inhibitor syntezy aflatoksyn (2), regulator poziomu słodkości i kwasowości (3), nośnik mikroelementów, np. jonów wapniowych (4) i żelazowych (5), nośnik specyficznych walorów sensorycznych żywności (6), a także, np. w produkcji chleba niskoproteinowego (7). Obok tradycyjnych aplikacji, GA i jego pochodne znajdują nowe kierunki zastosowań wynikające z cennych właściwości tych związków. Jedną ze szczególnych i udokumentowanych cech kwasu glukonowego jest zdolność do neutralizacji wolnych rodników powstających w organizmach żywych. Rodniki uszkadzają białka, DNA i nienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład błon komórkowych. Preparaty z udziałem kwasu glukonowego lub jego formy cyklicznej, glukonolaktonu, zapobiegają posłonecznemu starzeniu się skóry, obniżają ryzyko poparzenia słonecznego, zwiększają nawilżenie naskórka, a nawet usuwają zmarszczki (8). Procesy biologiczne pozwalają także na równoległe otrzymanie innego poza kwasem glukonowym ważnego produktu metabolizmu drobnoustrojów, jakim jest oksydaza glukozowa (GOD)(EC 1.1.3.4) (9). Enzym ten wykorzystywany jest w produkcji żywności do usuwania pozostałości tlenu lub glukozy z napojów i sproszkowanych produktów spożywczych, w produkcji kultur starterowych (10), a także jako źródło antyseptyczne oddziałującego nadtlenu wodoru w konserwacji produktów żywnościowych (11–12). Zarówno kwas glukonowy jak i oksydaza glukozowa działają jako stabilizatory dodatków do żywności, np. kwasu askorbinowego czy witaminy B₁₂. W inżynierii bioprosesowej, oksydaza glukozowa stosowana jest w produkcji biosensorów do oznaczania glukozy. GOD znajduje także zastosowanie przy otrzymywaniu fruktozy z sacharozy (glukoza po działaniu inwertazy jest utleniana przez GOD do kwasu glukonowego i w ten sposób łatwiej może być usunięta z mieszaniny).

Kwas glukonowy otrzymywany jest głównie z użyciem grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, a także bakterii z rodzaju *Acetobacter*, *Gluconobacter* (*Acetobacter suboxydans*), *Zymomonas* i *Pseudomonas* (13–18), metodą wglębną (19) lub *solid-state* (20), przy czym największe aktywności uzyskiwane są z wykorzystaniem drobnoustrojów poddanych mutagenizacji (11,21).

Większość studiów kinetyki produkcji kwasu glukonowego dedykowanych jest procesom z użyciem bakterii (22), natomiast badania biosyntezy GA z użyciem grzybów rzadziej pojawiają się w literaturze (23). Wynika to m.in. z łatwiejszego modelowania procesów z udziałem bakterii, ponieważ zastosowanie grzybów strzępkowych stwarza trudności rozpoznania procesu na skutek braku możliwości ciągłych pomiarów stężenia biomasy (24). W celu uzyskania wysokiej efektywności produkcji kwasu glukonowego niezbędne są bowiem pomiary wielu parametrów bezpośrednich hodowli metodą bezinwazyjną i optymalizacji wyliczanych na ich podstawie pa-

rametrów pochodnych, stanowiących podstawę algorytmów sterowania w czasie rzeczywistym tego procesu. Liczba parametrów pochodnych jest funkcją liczby pomiarów pierwotnych, jednak tylko pomiary metodą bezinwazyjną, mogą być brane pod uwagę w procesach sterowania hodowlą drobnoustrojów w systemie *on-line*. Zatem brak możliwości ciągłego pomiaru zawartości biomasy w podłożu w znacznym stopniu utrudnia rozpoznanie stanu aktywności metabolicznej hodowanej kultury drobnoustrojów. Innymi trudnościami w monitorowaniu bioprocesu są problemy wynikające z braku możliwości ciągłych pomiarów szybkości tworzenia produktu oraz, choć w mniejszym stopniu, szybkości zużywania substratu. Z tych względów, szczególną rolę przypisuje się badaniom kinetyki procesu oraz bilansom materiałowym i energetycznym, pozwalającym na estymację wartości ważnych parametrów, konstruowanych na podstawie ciągłych pomiarów bezpośrednich w czasie rzeczywistym hodowli. Pomiary te są substytutami parametrów oznaczanych w okresowo pobieranych próbach, umożliwiając sterowanie procesem z użyciem komputera w systemie *on-line*. W takich przypadkach analiza składu próby stanowi element weryfikujący przyjęte założenia konstrukcyjne parametrów pochodnych.

Celem pracy było zbadanie możliwości substytucji pomiarów rzeczywistych dokonywanych techniką inwazyjną (wymagających poboru prób i analizy jej składu) przez ich estymację na podstawie mierzonych w sposób ciągły parametrów pierwotnych bioprocesu. Praca ta koncentruje się na tzw. parametrach metabolicznych *Aspergillus niger* i możliwości ich zastosowania do monitorowania i sterowania procesem biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego w systemie *on-line*.

2. Metodyka

2.1. Mikroorganizmy

W badaniach stosowano szczep *Aspergillus niger* W78B pochodzący z kolekcji szczepów Katedry Biotechnologii Żywności Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu.

Podłoża hodowlane po ich sterylizacji i ochłodzeniu do temperatury niższej od 36°C, szczepiono bezpośrednio zawiesiną konidiów w sterylnym roztworze (1:10 000) Tweenu 80 w takiej ilości, by ich koncentracja wyniosła $1 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$. Liczbę zarodników oznaczano metodą bezpośrednią w komorze Thoma.

2.2. Bioreaktor

W badaniach laboratoryjnych stosowano bioreaktor zbiornikowy z mieszadłem (STR) Microferm Fermenter MF114 (New Brunswick Scientific Co. Inc. New Brunswick, New Jersey, USA) o pojemności całkowitej 14 dm³.

2.3. Podłoże definiowane

Stosowano następujący skład podłoża: 200 g D-glukozy, 0,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,1 g $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (mocznik), 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, woda wodociągowa do 1 dm³ i roztwór HCl do ustalenia pH na poziomie 5,5. Podłoże sterylizowano w temperaturze 121°C przez 30 minut. W czasie fermentacji, pH utrzymywano na stałym poziomie stosując 5 mol dm⁻³ roztwór NaOH.

2.4. Metody analityczne

2.4.1. Stężenie biomasy

Płyn hodowlany w ilości 25 cm³ poddawano filtracji próżniowej. Biomase przeplukiwano wodą destylowaną do zaniku odczynu kwaśnego i suszono w temperaturze 105°C w czasie 24 godzin.

2.4.2. Stężenie kwasu glukonowego

Stężenie kwasu glukonowego oznaczano metodą kapilarnej izotachoforezy (25).

2.4.3. Pomiary metodą bezinwazyjną

Parametry bezpośrednie mierzono w sposób ciągły przy zastosowaniu komputerowego systemu sterowania procesami biotechnologicznymi *SysLab Bio* (26) wyposażonego m.in. w następujące urządzenia:

- Regulator BioReg pO₂ kontroler (KBŻ AE, Wrocław) z elektrodą membranową TU-4 (TelEko, Wrocław), mierzący w sposób ciągły stężenie tlenu rozpuszczonego (pO₂).

- Paramagnetyczny analizator tlenu Servomex 1100A (Servomex International Ltd, Crowborough, East Sussex, Wielka Brytania), mierzący w sposób ciągły udział tlenu: w gazie natleniającym ($\varphi_{\text{O}_2\text{A}}$) i w gazach fermentacyjnych (φ_{O_2}) oraz ciśnienie otoczenia (P_{bar}).

- Analizator Guardian II CO₂ Monitor (Edinburg Sensors Ltd Edinburgh, Szkocja), mierzący w sposób ciągły udział dwutlenku węgla w gazie natleniającym ($\varphi_{\text{CO}_2\text{A}}$) i w gazach fermentacyjnych (φ_{CO_2}) w zakresie 0-3%.

- Analizator Gascard Monitor (Edinburg Sensors Ltd Edinburgh, Szkocja), mierzący w sposób ciągły udział dwutlenku węgla w gazie natleniającym ($\varphi_{\text{CO}_2\text{A}}$) i w gazach fermentacyjnych (φ_{CO_2}) w zakresie 3-12%.

– Regulator poziomu piany RPP (KBŻ AE, Wrocław) do pomiaru i regulacji poziomu piany.

Objętościową szybkość przyswajania tlenu (Q_{O_2}) obliczano z równania:

$$Q_{O_2} = \frac{Q_A}{c_m} \left[\varphi_{O_2A} - \varphi_{O_2} \left(\frac{1 - \varphi_{O_2A} - \varphi_{CO_2A}}{1 - \varphi_{O_2} - \varphi_{CO_2}} \right) \right] \quad [1]$$

Objętościową szybkość wydzielania dwutlenku węgla (Q_{CO_2}) obliczano z równania:

$$Q_{CO_2} = \frac{Q_A}{c_m} \left[\varphi_{CO_2} \left(\frac{1 - \varphi_{O_2A} - \varphi_{CO_2A}}{1 - \varphi_{O_2} - \varphi_{CO_2}} \right) - \varphi_{CO_2A} \right] \quad [2]$$

- Q_A – objętościowa szybkość napowietrzania (h^{-1}),
- c_m – objętość molowa gazu natleniającego ($dm^3 mol^{-1}$),
- φ_{CO_2} – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazach fermentacyjnych,
- φ_{CO_2A} – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazie natleniającym,
- φ_{O_2} – udział objętościowy tlenu w gazach fermentacyjnych,
- φ_{O_2A} – udział objętościowy tlenu w gazie natleniającym.

3. Wyniki i ich omówienie

Większość parametrów stosowanych w sterowaniu bioprocessami można zakwalifikować do tzw. parametrów środowiskowych (np. temperatura, pH, częstość obrotów mieszadła, szybkość napowietrzania, stężenie tlenu rozpuszczonego). Parametry te stosowane są w klasycznych metodach sterowania biosyntezą określonych metabolitów i nie są bezpośrednio skorelowane z metabolizmem hodowanych drobnoustrojów. Nowsze trendy w technikach optymalizacji oparte są natomiast na pomiarach rzeczywistej aktywności hodowanych komórek organizmów żywych (27).

Parametry bezpośrednio związane z metabolicznym drobnoustrojów, odzwierciedlające aktualną ich aktywność mogą być selekcyonowane w oparciu na bilansie masowym bioprocessu:

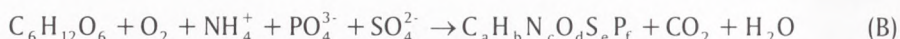


Odnosząc to równanie do 6 podstawowych pierwiastków (węgla, wodoru, azotu, tlenu, siarki i fosforu) i glukozy jako źródła węgla, bilans masy procesu biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego w warunkach realizowanego tu procesu przedstawić można następująco:



Równanie to w sumaryczny sposób ujmuje dwa główne procesy zachodzące podczas biosyntezy kwasu glukonowego:

– proces syntezy biomasy



– proces biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego



Z reakcji B i C wynika, że wydzielanie dwutlenku węgla towarzyszy tylko procesowi syntezy biomasy natomiast gaz ten nie wydzielą się w procesie transformacji glukozy do kwasu glukonowego. Stąd dla systemu ciągłej kontroli obu reakcji przydatna może być analiza wymiany gazowej grzybni.

Szybkość asymilacji przez grzybnię tlenu (Q_{O_2}) jest sumą szybkości przyswajania tlenu niezbędnego do podtrzymania podstawowych funkcji życiowych i wzrostu drobnoustrojów (Q_{O_2X}) oraz szybkości przyswajania tlenu biorącego udział w procesie biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego (Q_{O_2P}):

$$Q_{O_2} = Q_{O_2X} + Q_{O_2P} \quad [3]$$

Szybkość przyswajania tlenu odpowiedzialną za podtrzymanie podstawowych funkcji życiowych hodowanych drobnoustrojów i ich wzrostu (Q_{O_2X}) można określić równaniem:

$$Q_{O_2X} = \frac{Q_{CO_2}}{RQ_X} \quad [4]$$

Natomiast ilość tlenu odpowiedzialnego za biotransformację glukozy do kwasu glukonowego poprzez wyrażenie:

$$Q_{O_2P} = Q_{O_2} - \frac{Q_{CO_2}}{RQ_X} \quad [5]$$

W równaniach 4 i 5, RQ_X oznacza współczynnik oddechowy wzrostu drobnoustrojów. Ze stechiometrii reakcji B wynika, że w podłożach węglowodanowych wartość $RQ_X = 1,0$. Z punktu widzenia bilansu elementarnego, uwzględniającego stopnie redukcji glukozy jako substratu i powstającej biomasy wynika jednak, że wartość współczynnika oddechowego w procesie wzrostu drobnoustrojów jest wyższa od jedności. Według badań własnych (27) i doniesień innych autorów (28) w czasie fazy intensywnej syntezy białek komórkowych wartość tego współczynnika rośnie, osiągając maksimum na poziomie 1,2.

W fazie akumulacji kwasu glukonowego, gdy procesy biotransformacji glukozy i syntezy biomasy przebiegają jednocześnie, ogólny współczynnik oddechowy (RQ)

procesu jest wynikowym odzwierciedleniem intensywności reakcji B i C. Ukrywana jest zatem prawdziwa wartość współczynnika oddechowego wzrostu biomasy (RQ_X), co skłania wielu badaczy do przyjęcia założenia stałości RQ_X w czasie procesu na poziomie = 1,0, czyli na poziomie stechiometrii reakcji oddychania tlenowego (22,29). Inni autorzy (30) sugerują jednak inne wartości tego współczynnika.

3.1. Estymacja stężenia produktu

Mierząc określoną równaniem 5 szybkość przyswajania tlenu związaną z tworzeniem produktu (Q_{O_2P}), możliwe jest pośrednie określenie szybkości syntezy kwasu glukonowego (Q_P) poprzez zastosowanie następującej zależności:

$$Q_{O_2P} = \frac{1}{Y_{P/O}} \cdot \frac{dP}{dt} \quad [6]$$

stąd upraszczając, można przyjąć:

$$Q_{O_2P} = \frac{Q_P}{Y_{P/O}} \quad [7]$$

a zatem szybkość tworzenia produktu wyniesie:

$$Q_P = Y_{P/O} Q_{O_2P} \quad [8]$$

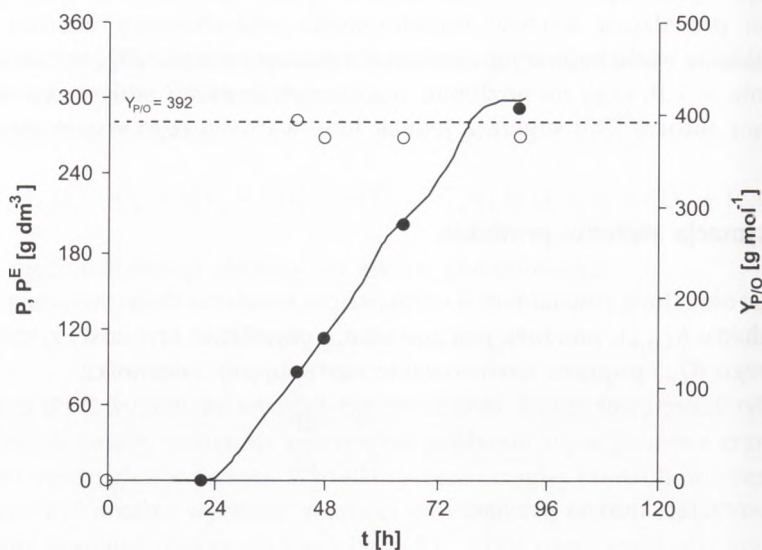
Opierając się na pomiarach wymiany gazowej grzywni, możliwa jest estymacja wartości objętościowej szybkości tworzenia produktu (Q_P^E):

$$Q_P^E = Y_{P/O} Q_{O_2P} \quad [9]$$

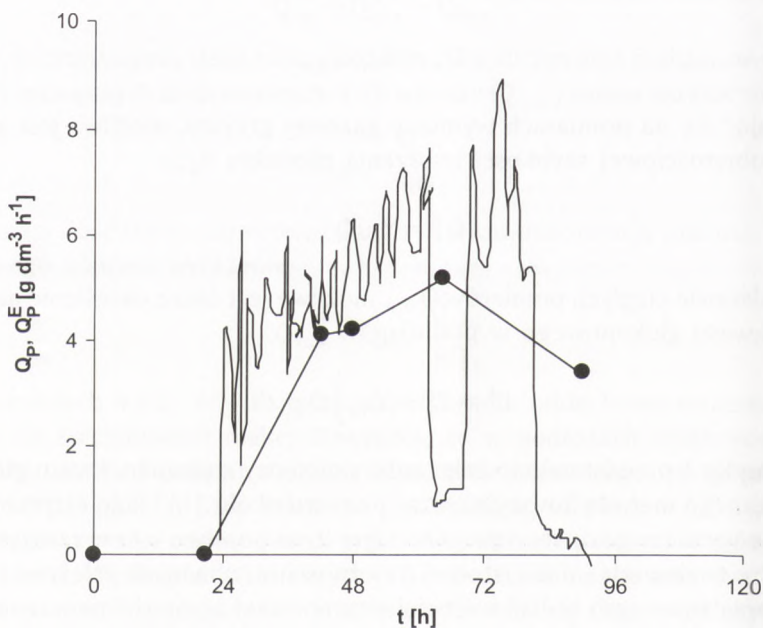
Na podstawie ciągłych pomiarów Q_{O_2P} możliwe jest także określenie aktualnego stężenia kwasu glukonowego w podłożu:

$$P_t^E = P_0^E + Y_{P/O} \int_0^t Q_{O_2P} dt \quad [10]$$

Na rysunku 1 przedstawiono zależności pomiędzy stężeniem kwasu glukonowego oznaczanego metodą inwazyjną (czas pomiaru około 1h) i jego estymacją opartą na analizie wymiany gazowej *Aspergillus niger* (czas pomiaru \approx czas rzeczywisty procesu). Dane te dowodzą dość istotnej zbieżności otrzymanych zależności pomimo odnotowania znacznych wahań wartości estymowanej szybkości tworzenia produktu (rys. 2). Wahania Q_P^E były efektem zmian rozpuszczalności tlenu w podłożu i szybkości jego wnikania na skutek dozowania środka przeciwpianowego, mające bezpośredni wpływ na zmiany szybkości tworzenia produktu (reakcja C).



Rys. 1. Stężenie kwasu glukonowego, wartość rzeczywista (●) i estymowana (—). Współczynnik przeliczeniowy ilości przyswojonego tlenu na ilość tworzego produktu, wartość: teoretyczna (- -) i rzeczywista (○).



Rys. 2. Szybkość tworzenia produktu, wartość: rzeczywista (●) i estymowana (—).

Wartość $Y_{P/O}$ w czasie procesu kształtowała się na stosunkowo wyrównanym poziomie (rys. 1) ustalając średnią wartość dla całego procesu na poziomie 373 g mol^{-1} . Rzeczywista wartość $Y_{P/O}$ była zatem niższa od teoretycznej o 19 g mol^{-1} (tab. 1), co stanowiło różnicę o 4,8%.

Tabela
Wartości stałych stosowane przy estymacji stężenia substratu, biomasy i produktu

| Oznaczenie | J.m. | Wartość |
|------------|------------------------------------|---------|
| $Y_{P/O}$ | g mmol^{-1} | 0,392 |
| $Y_{P/S}$ | g g^{-1} | 1,0 |
| $Y_{X/O}$ | g mmol^{-1} | 0,05 |
| $Y_{X/S}$ | g g^{-1} | 0,5 |
| RQ_X | – | 1,2 |
| m_S | $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ | 0,5 |
| m_O | $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ | 0,5 |

Źródło: badania własne i dane literaturowe (22,27,31,32).

3.2. Estymacja tworzenia biomasy

Strzępkowy wzrost *Aspergillus niger* praktycznie uniemożliwia ciągłe oznaczanie biomasy, a tym samym wyklucza stosowanie metod sterowania bioprocusem w oparciu na szybkościach właściwych określonych parametrów. Estymacja stężenia biomasy i szybkości jej wzrostu stwarza zatem szansę na optymalizację jej aktywności i zapewnienie odpowiednich proporcji pomiędzy intensywnością przebiegu reakcji B i C.

Po odjęciu od całkowitego strumienia asymilowanego przez grzybnię tlenu, części związanej z syntezą kwasu glukonowego (reakcja 3), pozostała jego część stanowi sumę szybkości przyswajania tlenu zapewniającego sprawny przebieg przemiany podstawowej drobnoustrojów ($Q_{O_2X_m}$) i szybkości przyswajania tlenu odpowiedzialnego za przyrost biomasy ($Q_{O_2X_g}$):

$$Q_{O_2X} = Q_{O_2X_m} + Q_{O_2X_g} \quad [11]$$

Szybkość przyswajania tlenu przemiany podstawowej ($Q_{O_2X_m}$) można wyrazić równaniem:

$$Q_{O_2X_m} = X \cdot m_O \quad [12]$$

a część asymilowanego tlenu związanego z przyrostem komórek poprzez:

$$Q_{O_2X_g} = \frac{1}{Y_{X/O}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [13]$$

lub upraszczając:

$$Q_{O_2X_g} = \frac{Q_x}{Y_{X/O}} \quad [14]$$

Zatem, biorąc pod uwagę wyrażenia 12-14, równanie 11 można zapisać w postaci:

$$Q_{O_2X} = X \cdot m_o + \frac{1}{Y_{X/O}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad [15]$$

lub

$$Q_{O_2X} = X \cdot m_o + \frac{Q_x}{Y_{X/O}} \quad [16]$$

Stąd objętościowa szybkość wzrostu biomasy (Q_x) wyniesie:

$$Q_x = (Q_{O_2X} - X \cdot m_o) Y_{X/O} \quad [17]$$

Mierząc szybkość wymiany gazowej grzybni w czasie hodowli, możliwe jest określenie wartości parametru Q_{O_2X} (z równania 4), a zatem i estymacja szybkości wzrostu biomasy:

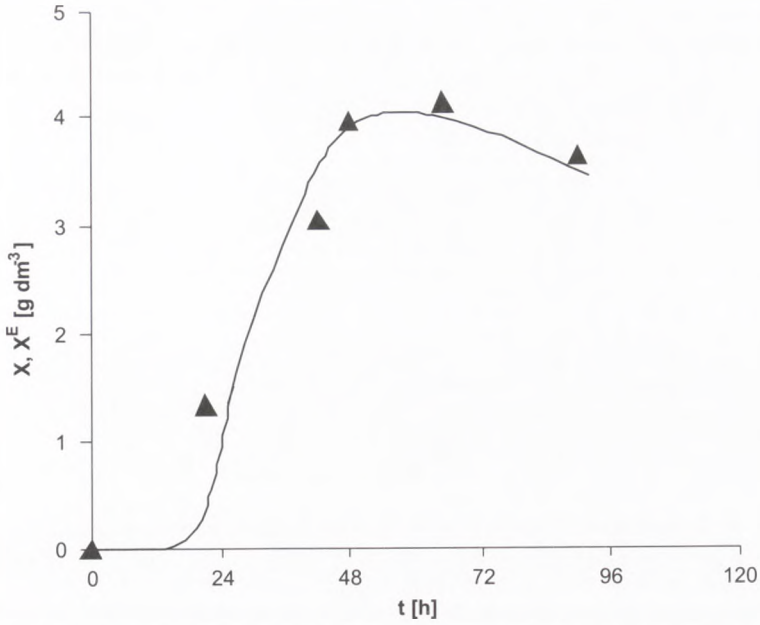
$$Q_x^E = (Q_{O_2X} - X^E \cdot m_o) Y_{X/O} \quad [18]$$

oraz określenie jej zawartości w podłożu w dowolnej chwili procesu:

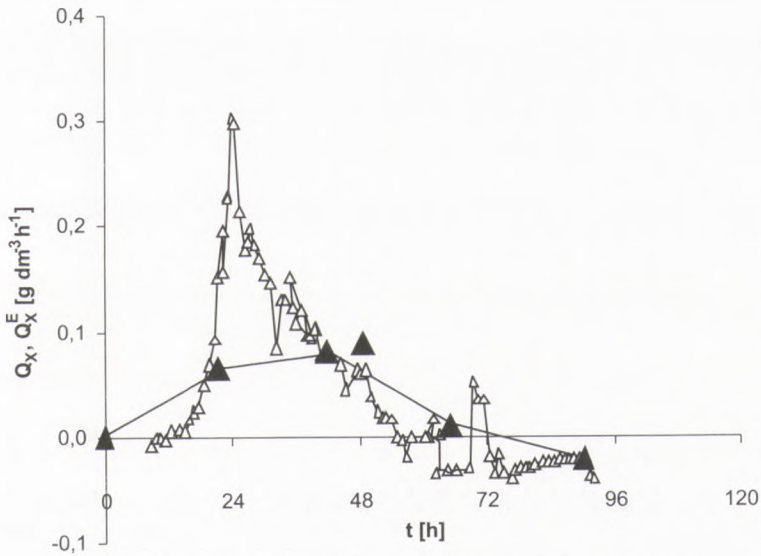
$$X_t^E = X_0^E + Y_{X/O} \int_0^t (Q_{O_2X} - X^E \cdot m_o) dt \quad [19]$$

Na rysunku 3 przedstawiono zmiany stężenia biomasy w czasie procesu, oznaczone metodą inwazyjną poprzez suszenie odseparowanej od podłoża grzybni w pobranej próbie (czas oznaczenia 24 h) i metodą bezinwazyjną poprzez jej kalkulację na podstawie analizy gazów procesowych z równania 19 (czas oznaczenia \approx czas rzeczywisty procesu).

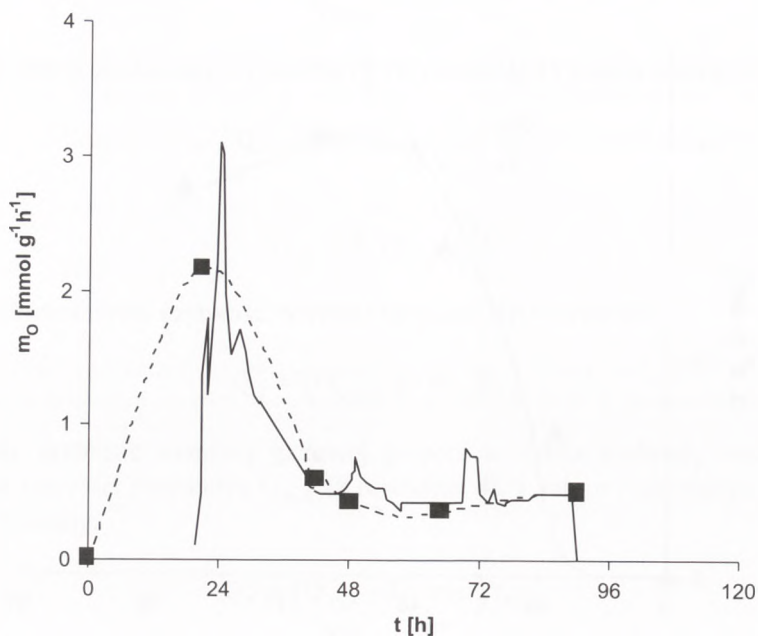
Estymacja stężenia biomasy pozwoliła na bardziej precyzyjną orientację w zakresie ilości biomasy w podłożu i szybkości jej wzrostu w czasie rzeczywistym procesu (rys. 3 i 4). Wyższą zbieżność wyników estymowanych z rzeczywistymi uzyskiwano w późniejszej fazie procesu, co wynikało ze stabilizowania się wartości tlenowego współczynnika przemiany podstawowej *Aspergillus niger* (m_o) (rys. 5). Z rysunku 4 wynika także, że metoda inwazyjna z konieczności charakteryzująca się mniejszą częstotliwością pomiaru, w przeciwieństwie do metody estymacji, nie ujmuje wszystkich punktów charakterystycznych fazy wzrostu drobnoustrojów.



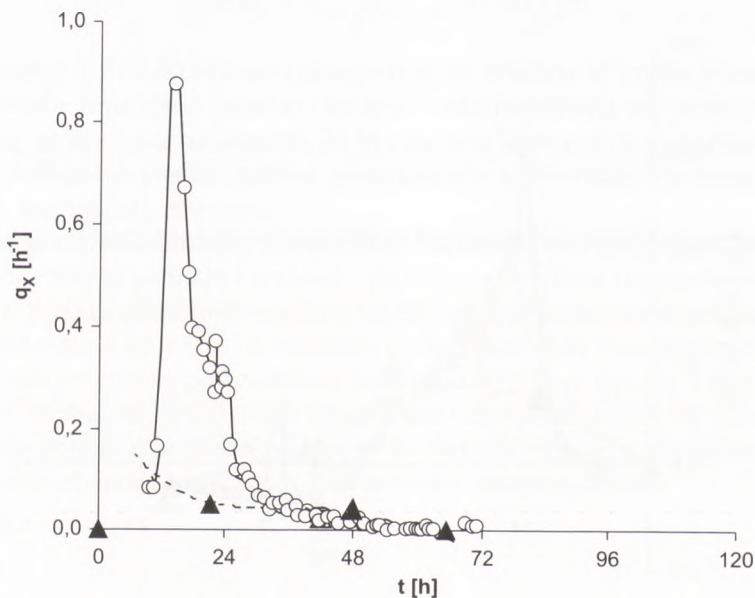
Rys. 3. Stężenie biomasy, wartość rzeczywista (▲) i estymowana (—).



Rys. 4. Szybkość wzrostu biomasy, wartość: rzeczywista (▲) i estymowana (Δ).



Rys. 5. Tlenowy współczynnik przemiany podstawowej, wartość rzeczywista (■) i aproksymowana (—).



Rys. 6. Szybkość właściwa wzrostu, wartość rzeczywista (▲) i estymowana (O).

Do estymacji stężenia grzybni w podłożu wykorzystywano stałą wartość tlenowego współczynnika przemiany podstawowej (m_o) (tab.), natomiast w celu badania zmienności wartości tego współczynnika w czasie procesu, zastosowano równanie (20) z wykorzystaniem aproksymowanych wartości rzeczywistych stężenia biomasy.

$$m_o = \frac{1}{X} \left(Q_{O_2X} - \frac{Q_X}{Y_{X/O}} \right) \quad [20]$$

Estymacja stężenia grzybni i szybkości jej wzrostu oparta na wymianie gazowej hodowli pozwala na wyznaczenie w sposób ciągły także właściwej szybkości wzrostu *Aspergillus niger* (μ) (rys. 6):

$$\mu^E = q_X^E = \frac{Q_X^E}{X^E} \quad [21]$$

3.3. Estymacja stężenia substratu

Procesy syntezy biomasy i produktu odbywają się kosztem zmniejszania się zasobów źródeł węgla i energii w pożywce:

$$\frac{dS}{dt} = Q_S \quad [22]$$

Rzeczywista szybkość tych procesów sumarycznie odzwierciedlana jest w rzeczywistej szybkości przyswajania substratu

$$Q_S = - \left(\frac{Q_X}{Y_{X/S}} + \frac{Q_P}{Y_{P/S}} + m_S X_t \right) \quad [23]$$

a zatem i w wartości estymowanej tego parametru

$$Q_S^E = - \left(\frac{Q_X^E}{Y_{X/S}} + \frac{Q_P^E}{Y_{P/S}} + m_S X_t^E \right) \quad [24]$$

Po rozwinięciu w równaniu 24 zawartych w nim wyrażeń Q_P^E i Q_X^E poprzez podstawienie zależności 9 i 18, widoczny jest udział wartości parametrów pierwotnych i pochodnych, mierzonych w sposób bezinwazyjny w kształtowaniu wartości parametru Q_S^E :

$$Q_S^E = \frac{(Q_{O_2X} - X_t^E \cdot m_o) \cdot Y_{X/O}}{Y_{X/S}} + \frac{Y_{P/O} \cdot Q_{O_2P}}{Y_{P/S}} + m_S \cdot X_t^E \quad [25]$$

Na podstawie odpowiednich przekształceń możliwa jest także estymacja aktualnego stężenia węglowodanów w podłożu:

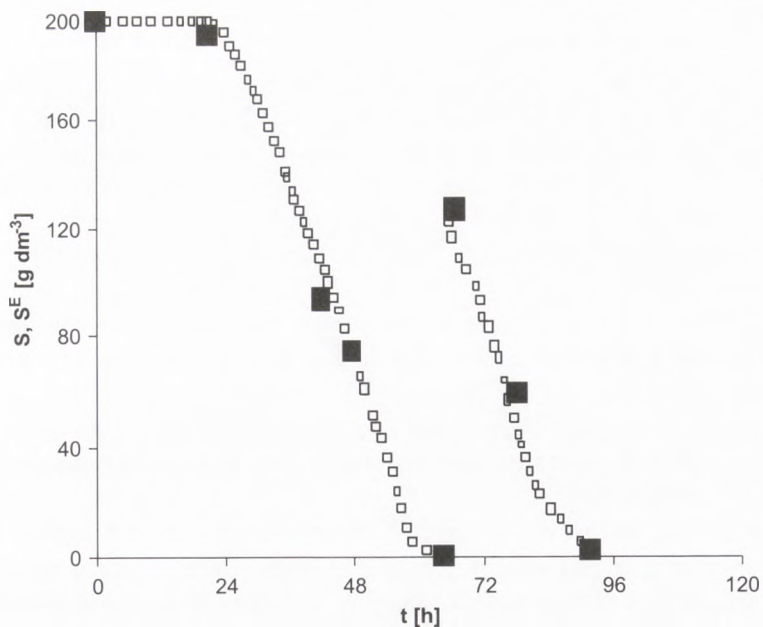
$$S_t^E = S_0^E \cdot \left(\frac{X_0^E + Y_{X/O} \int_0^t (Q_{O_2X} - X^E \cdot m_O) dt}{Y_{X/S}} + \frac{P_0^E + Y_{P/O} \int_0^t Q_{O_2P} dt}{Y_{P/S}} + m_S \int_0^t X^E dt \right) \quad [26]$$

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów uzyskano stosunkowo dobrą zbieżność oznaczeń stężenia glukozy w podłożu metodą inwazyjną i bezinwazyjną (estymowaną) (rys. 7). W sposób pośredni została zatem potwierdzona zadowalająca precyzja pomiarów bezpośrednich i zastosowanych bezinwazyjnych metod określania szybkości tworzenia zarówno ilości biomasy jak i ilości powstającego kwasu glukonowego (rys. 1 i 3). Równanie [26] bowiem, syntetycznie ujmuje efekt intensywności i efektywności przebiegu dwóch głównych procesów, odzwierciedlających badany bioprocess.

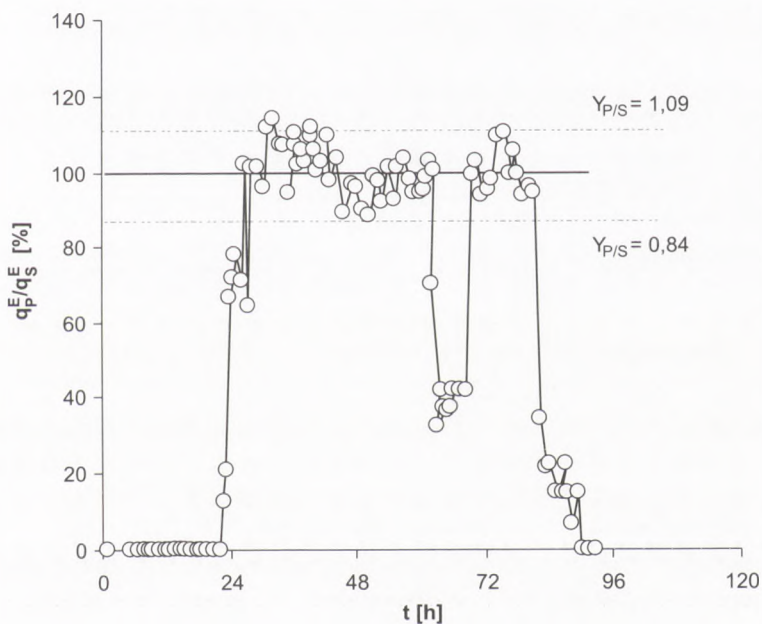
Wyczerpanie się początkowej puli źródła węgla z podłoża spowodowało obniżenie szybkości tworzenia produktu (Q_p^E) (rys. 2). Ponowny wzrost wartości tego parametru wynikał z wprowadzenia do podłoża dodatkowej porcji glukozy (rys. 7). Zmiany stężenia cukru były odzwierciedlane w mierzonej w sposób ciągły wartości parametru „softwarowego” Q_p^E , natomiast ze względu na częstotliwość pomiarów dokonywanych metodą tradycyjną, nie znajdowały odzwierciedlenia w rzeczywistej wartości Q_p (rys. 2). Podobne ukrywanie charakterystycznych zmian wartości poszczególnych parametrów odnotowywano w przypadku i innych wielkości, np. w pomiarach: szybkości wzrostu biomasy (rys. 4), wartości tlenowego współczynnika przemiany podstawowej (rys. 5), szybkości właściwej wzrostu biomasy (rys. 6) itd.

Znajomość stężenia biomasy i jej aktywności w zakresie szybkości przyswajania substratu i tworzenia produktu w czasie rzeczywistym procesie, umożliwiała rozpoznanie aktualnego stanu metabolicznego hodowanych drobnoustrojów oraz dostosowanie warunków środowiskowych (pH, szybkości mieszania i napowietrzania, stężenia tlenu rozpuszczonego) do wartości optymalnych z punktu widzenia maksymalizacji efektywności prowadzonego bioprocessu (33). Parametrami stanowiącymi dobre kryterium optymalizacyjne okazały się szybkości właściwe przyswajania substratu i syntezy produktu oraz stosunek wartości obu parametrów, który na bieżąco weryfikował efektywność realizowanych algorytmów sterujących hodowlą poprzez wykazywanie zmian aktualnej wydajności substratowej przemian (rys. 8).

W rezultacie zastosowanego systemu pomiarów, monitorowania aktywności metabolicznej biomasy i sterowania bioprocessem uzyskano wysoką efektywność biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego charakteryzowanego współczynnikiem wydajności substratowej = 1,0 g g⁻¹, przy szybkości tworzenia produktu na poziomie 5 g dm⁻³ h⁻¹ (23).



Rys. 7. Stężenie substratu w podłożu, wartość rzeczywista (■) i estymowana (□).



Rys. 8. Efektywność procesu biosyntezy kwasu glukonowego. Przykładowy parametr sterujący procesem biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego w systemie *on-line*.

4. Wnioski

1. W wyniku badań stwierdzono istotne zależności pomiędzy rzeczywistymi wartościami stężenia biomasy, szybkości jej wzrostu, aktywności kwasotwórczej, szybkości tworzenia produktu, szybkości przyswajania substratu a wartościami tych parametrów estymowanych w czasie rzeczywistym procesie z wykorzystaniem pomiarów bezpośrednich szybkości wymiany gazowej *Aspergillus niger*.

2. Do ciągłego monitorowania aktywności przemiany podstawowej i szybkości wzrostu biomasy dużą przydatność wykazuje szybkość wydzielania dwutlenku węgla przy założeniu stałej wartości współczynnika oddechowego RQ_X w fazie akumulacji produktu na poziomie 1,2. Estymowaną szybkość syntezy biomasy reprezentuje równanie $Q_X^E = (Q_{O_2X} - X^E m_O) Y_{X/O}$.

3. Do kontroli aktywności kwasotwórczej *Aspergillus niger* może być stosowana estymowana szybkość biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego określona równaniem $Q_P^E = Y_{P/O} Q_{O_2P}$.

4. W rezultacie zastosowania systemu sterowania procesem opartego na bezinwazyjnej technice pomiarów parametrów procesowych, substytucji wartości parametrów rzeczywistych wymagających poboru prób wartościami estymowanymi pozwalającymi na optymalizację parametrów aktywności biomasy w systemie *on-line*, możliwe było uzyskanie wysokiej efektywności konwersji substratu do kwasu glukonowego charakteryzowanego wartościami współczynnika wydajności substratowej na poziomie $1,0 \text{ g g}^{-1}$ i szybkości tworzenia produktu $= 5 \text{ g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Symbole

a,b,c,d,e,f – współczynniki

c_m – objętość molowa gazu ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)

h – godzina

m_O – tlenowy współczynnik przemiany podstawowej ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

m_S – substratowy współczynnik przemiany podstawowej ($\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

P – stężenie produktu (g dm^{-3})

p_{O_2} – stężenie tlenu rozpuszczonego (%)

q_P – szybkość właściwa tworzenia produktu [aktywność kwasotwórcza] ($\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

μ, q_X – szybkość właściwa wzrostu biomasy [właściwa szybkość wzrostu] (h^{-1})

q_S – szybkość właściwa przyswajania substratu ($\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

Q_A – objętościowa szybkość napowietrzania (h^{-1})

Q_{CO_2} – objętościowa szybkość wydzielania dwutlenku węgla ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

Q_{O_2} – objętościowa szybkość przyswajania tlenu ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

Q_{O_2P} – objętościowa szybkość przyswajania tlenu tworzenia produktu ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

Q_{O_2X} – objętościowa szybkość przyswajania tlenu związanego ze wzrostem i utrzymaniem aktywności biomasy ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

- $Q_{O_2X_m}$ – objętościowa szybkość przyswajania tlenu przemiany podstawowej biomasy ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
- $Q_{O_2X_g}$ – objętościowa szybkość przyswajania tlenu związanego ze wzrostem biomasy ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
- Q_P – objętościowa szybkość tworzenia produktu [produktywność] ($\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
- Q_S – objętościowa szybkość przyswajania substratu ($\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
- Q_X – objętościowa szybkość wzrostu biomasy ($\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
- RQ – współczynnik oddechowy
- RQ_X – współczynnik oddechowy utrzymania aktywności biomasy i jej wzrostu
- S – stężenie węglowodanów w podłożu (po hydrolizie) (g dm^{-3})
- t – czas procesu (h)
- X – stężenie biomasy (g dm^{-3})
- $Y_{P/O}$ – współczynnik proporcjonalności pomiędzy ilością przyswojonego tlenu a ilością powstającego produktu (g mol^{-1})
- $Y_{P/S}$ – współczynnik proporcjonalności pomiędzy ilością przyswojonego substratu a ilością powstającego produktu (g g^{-1})
- $Y_{X/O}$ – współczynnik proporcjonalności pomiędzy ilością przyswojonego tlenu a ilością powstającej biomasy (g mol^{-1})
- $Y_{X/S}$ – współczynnik proporcjonalności pomiędzy ilością przyswojonego substratu a ilością powstającej biomasy (g g^{-1})
- φ_{CO_2} – udział objętościowy dwutlenku węgla w gazach fermentacyjnych
- φ_{CO_2A} – udział objętościowy dwutlenku węgla w powietrzu
- φ_{O_2} – udział objętościowy tlenu w gazach fermentacyjnych
- φ_{O_2A} – udział objętościowy tlenu w powietrzu
- Indeks górny E – wartości estymowane

Literatura

- Han D., Seok Joong-Kim., Sang Hee Kim., Dong-Man-Kim, (1998), J. Food Sc., 63, 69-72.
- Shantha T., Rati E., Bhavani Shankar T., (1990), Antonie van Leeuwenhoek, 58, 121-127.
- Vasala A., Huuonen J., Alatosava T., (1996), Patent fiński FI 950355 (19950127).
- Klewicki R., Krol B., (1999), Polish J. Food Nutr. Sc., 8/49, 71-79.
- Jakubowicz L., (1998), Patent niemiecki DE 19628575 (19960716).
- Pietschmann M., Liebl B., Burghart J., (2000), Dtsch. Lebensm.-Rundsch., 96, 203-210.
- Nakamura T., (2000), Patent japoński JP 99-87868 (19990330).
- Yu, Ruey J., van Scott, Eugene J., (1997), Patent USA 5,677,340.
- Fiedurek J., Gromada A., Pielecki J., (1998), Acta Microbiol. Pol., 47, 355-364.
- Bohra L., Phebus R., Kastner C., (1995), IFT Annual Meeting, 252.
- Pickering G., Heatherbell D., Barnes M., (1999), Am. J. Enol. Viticult., 50, 291-298.
- Markwell J., Frakes L., Brott E., Osterman J., Wagner F., (1989), Appl. Microbiol. Biot., 30, 166-169.
- Petrucchioli M., Fenice M., Piccioni P., Federici F., (1995), Enzyme Microb. Tech., 17, 336-339.
- Trager M., Qazi G., Buse R., Onken U., (1992), J. Ferment. Bioeng., 74, 274-281.
- Velizarov S., Beschkov V., (1998), Process Biochem., 33, 527-534.
- Attwood M., Dijken J., Pronk J., (1991), J. Ferment. Bioeng., 72, 101-105.
- Schleissner C., Reglero A., Luengo J., (1997), Microbiology, 143, 1595.

18. Silva Martinez M., Haltrich D., Novalic S., Kulbe K., Nidetzky B., (1998), *Appl. Biochem. Biotech.* 70-72, 863-868.
19. Klein J., Rosenberg M., Markos J., Dolgos O., Krosiak M., Kristofikova L., (2002), *Biochem. Eng. J.*, 10, 197-205.
20. Pintado J., Lonsane B., Gaime-Perraud I., Roussos S., (1998), *Process Biochem.*, 33, 513-518.
21. Fiedurek J., Rogalski J., Ilczuk Z., Leonowicz A., (1986), *Enzyme Microb. Tech.*, 8, 734-736.
22. Reuss M., Frohlich S., Kramer B., Messerschmidt K., Pommerening G., (1986), *Bioprocess Eng.*, 1, 79-91.
23. Podgórski W., Gruszka R., Leśniak W., (2003), *Chem. Pap.*, 57, 35-38.
24. Rohr M., Kubicek C., Kominek J., (1983), *Gluconic acid*, in: *Biotechnology*, Eds. Rehm H. J., Reed G., 3, Verlag Chemie, Weinheim.
25. Kaiser K., Hupf H., (1979), *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, 75, 300-304.
26. Podgórski W., Leśniak W., (1999), *Materiały Sesyjne VI Krajowej Konferencji Komputerowej Wspomaganie Badań Naukowych*, 89-94.
27. Podgórski W., Lesniak W., (2000), *Chem. Pap.*, 54, 355-360.
28. Zurawski G., Aglish I., (1974), *Mikol. Fitopatol.*, 8, 15-22.
29. Kubicek C., Zehentgruber O., Rohr M., (1979), *Biotechnol. Lett.*, 1, 47-52.
30. Sato K., Nagatani M., Nakamura K., Sato S., (1983), *J. Ferment. Technol.*, 61, 623-629.
31. Krzystek L., Ledakowicz S., (1998), *Mass and Energy Balance*, in: *Citric acid Biotechnology*, Eds. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden, Taylor and Francis Ltd, London, 121.
32. Chmiel A., (1991), *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa.
33. Podgórski W., (2003), *30th Conference SSCHE, Proceedings on CD ROM*, Tatraské Matliare (SK), P232, 1-6.