

Edward Galas,  
Marianna Turkiewicz

Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka

## CPBP 04.11 Doskonalenie procesów biotechnologicznych

Centralny Program Badań Podstawowych 04.11 „Doskonalenie procesów biotechnologicznych, uruchomiony w 1985 r. jest programem międzyuczelnianym, realizowanym w dwudziestu wyższych uczelniach oraz w dwóch jednostkach Polskiej Akademii Nauk, tj. Centrum Mikrobiologii i Wirusologii w Łodzi oraz w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Wśród przeszło czterystu wykonawców prac przeważają mikrobiolodzy, biochemicy i specjaliści z technologii chemicznej, farmaceutycznej i rolnej. W programie uczestniczy również duża grupa osób prowadzących badania z zakresu inżynierii bioprocessowej oraz konstrukcji aparatury i urządzeń, rozwiązująca typowo inżynierskie problemy, przydatne dla wielu różnych biotechnologii. W programie pracują informatycy, chociaż w skali ciągle zbyt małej z punktu widzenia potrzeb komputerowego sterowania procesami biosyntezy i biokonwersji, uważanego za jedno z czołowych zagadnień w nowoczesnych biotechnologiach.

Tytuł programu jednoznacznie określa jego cele, a zatem opracowanie określonych, nowych biotechnologii, a także unowocześnienie i optymalizację procesów wykorzystywanych już w kraju.

W okresie realizacji programu wyłoniło się kilka głównych zagadnień badawczych, których wyniki są szczególnie cenne – tak ze względów poznawczych, jaki i aplikacyjnych.

W ramach grupy tematów, dotyczących doboru mikroorganizmów, niezbędnych dla określonych biotechnologii oraz ulepszania ich cech produkcyjnych, obserwuje się duży postęp w stosowaniu metod racjonalnego skryningu zarówno szczepów pochodzących ze środowiska naturalnego, jak też ulepszonych metodami mutagenizacji i in. W ten sposób uzyskano m.in. mutanty *Bacillus licheniformis*, wytwarzające termostabilną  $\alpha$ -amylazę z wydajnością, pozwalającą zaliczyć te szczepy do przemysłowych (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ) oraz otrzymano szereg klonów *Culvularia lunata* (Instytut Mikrobiologii, UŁ) o wyższej wydajności 11- $\beta$ -hydroksylacji korteksolonu (kluczowy etap w produkcji hydrokortyzonu) niż wydajność szczepów stosowanych w polskim przemyśle farmaceutycznym.

Rozwijają się prace z zakresu inżynierii komórkowej. W Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ na drodze protoplastyzacji i hybrydyzacji osmofilnych drożdży piekarskich otrzymano szczepy o wyższej wydajności biomasy, a triploidalny mieszaniec *Saccharomyces cerevisiae*, H-3, wdrożono do produkcji w Wytwórni Drożdży Piekarskich w Maszewie, uzyskując znaczne obniżenie zużycia melasy na jednostkę prasowanego produktu. Zastosowanie fuzji protoplastów dało również pozytywne wyniki w konstrukcji szczepów o podwyższonej zdolności transformacji steroidów (Instytut Mikrobiologii, UŁ); badania w skali półtechnicznej (PZF „Polfa”) potwierdziły ich przydatność do syntezy hydrokortyzonu z substancji S (4-pregnen-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-dion). W podobny sposób zwiększono wydajność biosyntezy cyklosporyny przez *Tolypocladium inflatum* (Instytut Technologii i Chemii Leków, AM w Łodzi), jak też otrzymano hybrydy drożdży *Trichosporon* i *Schwanniomyces* o aktywności celulozylitycznej i amylozylitycznej (Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, PŁ).

Stosując bardziej tradycyjne metody dobrano specjalne zakwasy, stanowiące mieszaninę bakterii mlekowych i drożdży, co pozwoliło opracować technologię produkcji uszlachetnionego

pieczywa bezglutenowego dla dzieci chorych na celiakię (Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, PŁ); technologia została już sprawdzona w skali przemysłowej z pozytywnymi wynikami.

Drobnoustroje propionowe wykorzystano w biosyntezie witaminy B<sub>12</sub> na podłożach z serwatką (Instytut Mikrobiologii, Biochemii i Analizy Żywności, AR w Poznaniu), której użycie wyeliminowało konieczność stosowania drogiego, importowanego prekursora cyjanokobalaminy-5,6-dimetylobenzimidazolu. Gotowa technologia produkcji witaminy B<sub>12</sub> jest obecnie sprawdzana w Zakładzie Wytwórczym BTB w Pile.

W kilku pracach wykorzystuje się techniki rekombinacji DNA *in vitro*. Przeprowadzono próby transformacji komórek *E. coli* i protoplastów *Bacillus subtilis*, DNA plazmidowym i kosmidowym ze zrekombinowanym genem  $\alpha$ -amylazy innego szczepu *B. subtilis* (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ); trwają badania nad wklonowaniem genu lipazy *Pseudomonas* w *E. coli* (Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej, PWr). Zrekombinowano z DNA *E. coli* gen fenololizy tyrozynowej *Citrobacter freundii* i uzyskano jego ekspresję (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ). Enzym ten używa się w terapii nowotworów, jak również w syntezie substancji (3,4-DOPA), stosowanych w leczeniu choroby Parkinsona. W ramach badań nad warunkami ekspresji genów wirusowych w *E. coli*, uzyskano dobrą powtarzalność ekspresji genu łańcucha polipeptydowego pre S1 otoczki wirusa zapalenia wątroby (HBV) o aktywności antygenowej (Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, Łódź). Zachęcające są próby powiększania skali hodowli zrekombinowanego szczepu *E. coli*, co rokuje możliwość wdrożenia produkcji preparatu diagnostycznego na obecność wirusa HBV, jak również otrzymania szczepionki.

Interesujące są wyniki badań związków o aktywności cytotoksycznej, przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej oraz immunostymulacyjnej, obejmujące biotransformację azakarbazoli (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu), syntezę latentnych inhibitorów reduktazy rybonukleotydowej i izolację aktywnych polisacharydów roślinnych (Instytut Chemii i Technologii Organicznej oraz Żywnościowej, PG). Otrzymano już pochodne indolochinoliny, silnie hamujące rozwój pewnych rodzajów białaczek i czerniaka, a także frakcje polisacharydów z grzybów jadalnych i pasożytniczych, o właściwościach immunostymulacyjnych i przeciwnowotworowych. Opracowano też optymalne warunki hodowli kultur tkankowych *Penstemon serrulatus* i innych roślin (Instytut Badania Środowiska i Bioanalizy, AM w Łodzi), zapewniające dobrą wydajność biosyntezy irydoidów i kumaryn, przewyższającą nagromadzenie tych związków w roślinach hodowanych *in vivo*. Zawartość penstemidu wzrosła do 10% w przeliczeniu na suchą masę kultury, zaś serrulatozydu do 5%. Obydwa glikozydy irydoidowe wykazują działanie przeciwnowotworowe.

Hodowlę roślin *in vitro* zastosowano również w opracowanej, wydajnej technologii produkcji biomasy jadalnych grzybów wyższych (bocznik i twardziak) w bioreaktorach (Zakład Inżynierii Chemicznej, ATR w Bydgoszczy), która nadaje się już do wdrożenia (poszukiwany jest producent).

Znaczną część środków, jakimi dysponuje program, przeznaczono na badanie enzymów o znaczeniu biotechnologicznym. Prace te obejmują molekularną i katalityczną charakterystykę enzymów, opracowanie technologii produkcji wybranych enzymów drobnoustrojowych, badania z zakresu inżynierii enzymowej oraz biokatalizy w środowisku rozpuszczalników organicznych.

W ramach tych badań wyodrębniono i scharakteryzowano kilka enzymów. Otrzymano cztery homogenne  $\beta$ -1,3-glukanazy z promieniowca *Streptomyces* sp, określono ich rolę i zbadano synergizm działania w enzymatycznej lizie komórek drożdży (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ). Pozwoliło to udoskonalić metodę otrzymywania protoplastów drożdży i stworzyło możliwość znacznego zwiększenia wartości odżywczej drożdży paszowych i spożywczych.

Wyizolowano lipazę *Mucor javanicus*, zbadano jej właściwości i wykazano, że enzym katalizuje syntezę estrów kwasów karboksylowych w środowisku rozpuszczalników organicznych (In-

stytut Biochemii Technicznej, PŁ). Ma to ogromne znaczenie, albowiem w istotny sposób rozszerza zastosowanie metod biotechnologicznych w syntezie związków o cennych właściwościach użytkowych. W skali laboratoryjnej opracowano już wydajne metody syntezy przez ten enzym stearynianu propylu i oleinianu oleilu (inhibitory korozji – dodatki do smarów) oraz opatentowano dotąd w literaturze nie opisaną własną metodę enzymatycznej syntezy makrocyklicznych laktonów o zapachu piżmowym, przydatnych dla przemysłu perfumeryjnego (Instytut Biochemii Technicznej, Instytut Podstaw Chemii Żywności, PŁ). Równolegle prowadzi się badania o dużym znaczeniu poznawczym, mające na celu matematyczne modelowanie reakcji estryfikacji z udziałem lipaz, z wykorzystaniem techniki komputerowej (Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi). Prace nad działaniem lipaz w środowisku rozpuszczalników organicznych, wykonywane w ramach programu, są w naszym kraju unikatowe.

Oczyszczono i scharakteryzowano aspartylową proteinazę z *Penicillium camembertii*, ustalono charakter jej centrum katalitycznego i wykazano, że enzym jest aktywny w syntezie wiązań peptydowych (Instytut Biochemii, UW). Dzięki podpuszczkopodobnym właściwościom proteinazę tę można wykorzystać do produkcji serów twardych.

Otrzymano w stanie krystalicznym  $\alpha$ -amylazę mezofilnych bakterii *B. subtilis* i przeprowadzono pomiary dyfraktometryczne monokryształów enzymu, co rokuje ustalenie jego konformacji w niedługim czasie (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ i Zakład Krystalografii, UŁ). Trwają prace nad krystalizacją innych enzymów: subtilizyny, glukoamylazy z *A. niger* i keratynazy z promieniowców. Badania te wiążą się z planowanym rozwojem prac nad optymalizacją funkcji tych enzymów technikami inżynierii białkowej.

Z antarktycznego kryla wyizolowano i scharakteryzowano pod względem specyficzności, skuteczności katalitycznej i budowy aktywnego centrum trawienną proteinazę o właściwościach kolagenolitycznych (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ). Enzym można zaliczyć do nowej podrodziny serynowych kolagenaz (trzy enzymy sklasyfikowane, pięć dalszych opisanych w literaturze). Obecność takiej proteinazy w systemie hydrolaz peptydowych *Euphausia superba* rokuje możliwość wykorzystania surowych preparatów enzymów skorupiaka m.in. w leczeniu skutków poparzeń.

Kilka prac zmierza do opracowania technologii biosyntezy enzymów drobnoustrojów. Są to badania kompleksowe, obejmujące skryning mikroorganizmów – producentów; optymalizację, głównie metodami matematycznymi, warunków biosyntezy w skali od laboratoryjnej do półtechnicznej; opracowanie metod wyodrębniania enzymów z surowców pochodzących oraz badania nad ich aplikacją. Najbardziej zaawansowane są prace nad technologią produkcji subtilizyny, przeznaczonej głównie do środków piorących. Technologię opracowano w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ, zaś próby przemysłowej produkcji enzymu prowadzi się w TZF „Polfa”. W skali mikrotechnicznej opracowano technologie biosyntezy  $\alpha$ -amylazy bakteryjnej o podwyższonej termostabilności, lipaz pleśniowych, dekstranazy i pululanazy (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ).

Zaawansowane są prace nad monitorowaniem i komputerowym sterowaniem procesami biosyntezy w fermentorach, np.  $\alpha$ -amylazy mezofilowych bakterii *B. subtilis* (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ), co powinno usprawnić przemysłowy proces produkcji enzymu, wdrożony przed kilkoma laty w ZPOW w Jaście. Techniki komputerową zastosowano również w monitorowaniu hodowli bakterii mlekowych (Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi), oraz w hodowli drożdży *S. cerevisiae* na melasie (Instytut Technologii Przemysłu Chemicznego i Spożywczego, AE we Wrocławiu), dzięki czemu podniesiono stopień konwersji tego surowca w biomasę drożdży. W ramach tej grupy badań opracowano założenia i oprogramowanie do relacyjnej bazy danych, wspomagających prowadzenie eksperymentów mikrobiologicznych nad ulepszaniem szczepów drobnoustrojów (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ). Program umożliwia wnikliwą ocenę aktywności, stabilności, produktywności i wymagań pokarmowych badanych szczepów, np. bakterii produkujących  $\alpha$ -amylazę, jak również szczegółową analizę metod, zastosowanych w ich ulepszeniu.

Badania z zakresu inżynierii enzymowej, wykonywane w ramach programu, obejmują: chemiczną syntezę polimerowych nośników i membran do immobilizacji enzymów, a także unieruchomienie w nich enzymów i wykorzystanie immobilizowanych preparatów w konkretnych procesach. Zsyntetyzowano kilkadziesiąt kopolimerów i terpolimerów akrylowych (Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, PWR) oraz wykazano ich przydatność do immobilizacji glukozylazy (Instytut Towaroznawstwa, AE w Poznaniu), peroksydazy (Zakład Biochemii UMCS w Lublinie) i acylazy penicylinowej. Uruchomiono produkcję nośników poliamidowych w jednostce innowacyjno-wdrożeniowej w Bolesławcu Śląskim (Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, PWR). Zsyntetyzowano membrany poliamidowe i unieruchomiono w nich lipazę, wykazując, że immobilizowany enzym można wykorzystać do procesu ciągłej hydrolizy zemułgowanego oleju w bioreaktorach (Instytut Chemii, UMK w Toruniu). W innych nośnikach unieruchomiono subtilizynę (Instytut Biochemii, PŁ), enzymy pektynolityczne (Zakład Biochemii, UMCS w Lublinie) i  $\alpha$ -galaktozydazę (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ) oraz z powodzeniem zastosowano te preparaty do odpowiednio, ciągłej hydrolizy kazeiny, klarowania soków owocowych i rozkładu rafinozy w sokach cukrowniczych. Unieruchomione w membranach: oksydazę glukozową, ureazę i  $\alpha$ -glukozydazę, wykorzystano w konstrukcji elektrod enzymatycznych do oznaczania glukozy (Instytut Towaroznawstwa, AE w Poznaniu), mocznika i maltozy (Instytut Podstaw Chemii Żywności, PŁ). Poszukuje się producenta elektrody z immobilizowaną oksydazą glukozową. Zachęcające są również wyniki badań nad unieruchomianiem komórek drobnoustrojów. Immobilizowane w alginianie komórki drożdży *S. cerevisiae* wykorzystano w trzech różnych procesach; w ciągłej fermentacji etanolowej (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ) w reaktorze własnej konstrukcji, uzyskując w ciągu kilku tygodni pracy reaktora wydajność etanolu rzędu 8–10 g/l; w zwiększeniu wydajności biosyntezy tiaminy i jej formy koenzymatycznej (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ) oraz w inwersji stężonych roztworów sacharozy (500–900 g/l), prowadzonej w bioreaktorze własnej konstrukcji (Zakład Inżynierii Chemicznej ATR w Bydgoszczy). Wyniki tego ostatniego procesu są porównywalne z najlepszymi danymi literaturowymi. Opracowano już założenia projektowe instalacji do produkcji 150t cukru inwertowanego rocznie, a wdrożeniem procesu są zainteresowane Zakłady Owocowo-Warzywne w Bydgoszczy i Unisławiu. W ramach jednej z omawianych prac skonstruowano wysokowydajny generator immobilizowanych w alginianie komórek drożdży (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ); poszukuje się producenta aparatu.

Ważną część programu stanowią badania w zakresie biotechnologii środowiska. W ich ramach oczyszczono i scharakteryzowano kilka enzymów szlaku degradacji lignin (laktaza, dioksygenaza protokatechanowa i peroksydaza – pochodzenia grzybowego), a także wykryto nowe mechanizmy regulacyjne szlaku degradacji fenoli, metoksyfenoli i lignin (Zakład Biochemii UMCS w Lublinie). Znalezione też szczepy bakterii degradujących jednocześnie fenol i cyjanki oraz przeprowadzono obiecujące badania nad indukcją dioksygenaz katecholowych, biorących udział w degradacji fenoli (Katedra Biochemii, UŚI). Wyniki tych badań będzie można wykorzystać w uzdatnianiu wód koksowniczych. Zachęcające są rezultaty prac nad biokonwersją materiałów lignino-celulozowych (słoma, odpady bawełny, odpady z produkcji kawy zbożowej, itp.) w etanol i białko mikrobiologiczne (Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, AR w Lublinie; Instytut Biochemii Technicznej, PŁ). Istotne znaczenie mają badania nad optymalizacją biologicznego oczyszczania ścieków (Instytut Inżynierii i Technologii Wody, Ścieków i Odpadów, PŚI). Określono przydatność różnych metod pomiaru metabolicznej aktywności drobnoustrojów stosowanych w tym procesie i współzależność między tą aktywnością a szybkością usuwania zanieczyszczeń z użyciem osadu czynnego; zoptymalizowano system kaskadowy i naprzemienny napowietrzania osadu czynnego na podstawie jego aktywności metabolicznej; trwają prace nad opracowaniem kinetycznego modelu procesu osadu czynnego.

Wartość programu podnoszą wyniki prac z zakresu inżynierii bioprocessowej, konstrukcji aparatury i urządzeń. Ten obszar badań biotechnologicznych jest – jak dotąd – u nas zaniedba-

ny, podjęto zatem próbę choćby częściowego nadrobienia zaległości, finansując prace inżynierskie. W ramach tych prac rozwiązywane są problemy związane z operacjami jednostkowymi, takimi jak: przepływ płynów, dynamiczna filtracja, wymiana ciepła i masy, ekstrakcja, granulacja, adsorpcja, dezintegracja oraz procesy fermentacyjne w różnego typu bioreaktorach łącznie z ich mikrokomputerowym sterowaniem. Dużo uwagi poświęcono modernizacji i dostosowaniu stanowisk doświadczalnych do potrzeb biotechnologii, poznaniu kinetyki poszczególnych procesów, modernizacji i testowaniu modeli matematycznych opisujących procesy oraz zbadaniu właściwości fizykochemicznych stosowanych w pracach mediów. Do poważnych osiągnięć tej grupy badań finansowanych przez program można zaliczyć zbudowanie dla potrzeb biotechnologii szeregu unikatowych w kraju instalacji doświadczalnych oraz układów pomiarowych i regulacyjnych, a także opracowanie modeli matematycznych, służących do analizy procesów jednostkowych czy też oceny lub sterowania pracą stanowisk doświadczalnych. Zbudowano mikroprocesorowy sterownik, przystosowany do prowadzenia hodowli drobnoustrojów, wykonano oprogramowanie komputera i opracowano procedurę komunikacji sterownika z komputerem nadrzędnym (Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, PŁ). Zbudowano też interfejsy dla monitorowania i sterowania procesem biosyntezy bakteryjnej  $\alpha$ -amylazy oraz wykonano odpowiednie oprogramowanie komputera (Instytut Biochemii Technicznej, PŁ). Zbudowano i uruchomiono instalację doświadczalną dla badań kinetyki procesów towarzyszących suszeniu produktów biosyntezy oraz opracowano matematyczny model suszenia materiałów z wilgoci wieloskładnikowej (Instytut Inżynierii Chemicznej, PŁ). Umożliwiło to opracowanie nowej metody suszenia drożdży piekarniczych, zapewniającej ich wyższą przeżywalność i wdrożenie procesu w produkcji drożdży (SZS „Polmos” w Tczewie).

W Instytucie Inżynierii Chemicznej PŁ opracowano warunki i skonstruowano urządzenia do ciągłej, bezprzeponowej sterylizacji termicznej cieczy metodą UHT (*ultra-high temperature*), mającej wiele zalet w porównaniu z tradycyjnymi metodami sterylizacji. Obecnie trwa budowa instalacji przemysłowych w FKC w Zgierzu i Luboniu k. Poznania, które umożliwią wykorzystanie tej metody w skali technicznej. Zaprojektowano i skonstruowano w skali laboratoryjnej i półtechnicznej dwa reaktory typu *air-lift* (Instytut Inżynierii Chemicznej, PŁ). Zaprojektowano proces ekstrakcji z cząstek stałych o geometrii płytek, co umożliwiło budowę pulsacyjnego ekstraktora o działaniu ciągłym, przydatnego np. do ekstrakcji wewnątrzkomórkowych składników mycelium grzybów (Instytut Inżynierii Chemicznej, PŁ). Zaprojektowano i skonstruowano bioreaktor do ciągłej fermentacji etanolowej przy użyciu flokulujących szczepów drożdży (Instytut Inżynierii Chemicznej, PŁ). Opracowano modele matematyczne różnych sposobów dostarczania ciepła do układu, co umożliwiło konstrukcję wysokowydajnej sublimacyjnej suszarki próżniowej (Instytut Inżynierii Chemicznej i Chemii Fizycznej, PSz). Skonstruowano unikatowy przyrząd do pomiarów podstawowych właściwości cieplnych materiałów biologicznych (Instytut Inżynierii Chemicznej, PŁ). Dokonano poważnych zmian w konstrukcji reometru (zmiany w napędzie, wprowadzenie elektronicznego sterownika), co powinno usprawnić proces biosyntezy kwasu cytrynowego metodą wgłębną (reometr skonstruowano w Instytucie Inżynierii Chemicznej, PŁ; próby techniczne prowadzi się w FKC w Zgierzu). Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że większość aparatów i instalacji powstała bez lub przy minimalnych wydatkach dewizowych.

Podczas przeszło czterech lat realizacji programu obserwuje się wyraźną integrację środowisk naukowych biorących w nim udział, co wyraża się wspólnym rozwiązywaniem wielu problemów badawczych. Do jej pogłębienia przyczyniło się seminarium naukowe zorganizowane po dwuipółletnim trwaniu programu (wrzesień 1988 r.); drugie takie seminarium odbyło się w grudniu 1990 r.

CPBP 04.11 „Doskonalenie procesów biotechnologicznych” miał być realizowany w ciągu 10 lat (1986 – 1995). Obecnie, jak się wydaje, ze względu na zmianę sposobów finansowania badań naukowych, program zakończył się w 1990 r.