

Saccharomyces Bayanus tenyésztet fermentációs kinetikájának vizsgálata immobilizálás céljából használt gyógyszerészeti segédanyagok jelenlétében

Dudutz Gyöngyi¹, Csép Katalin², Gál Emese¹

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszeripar és Biotechnológia Tanszék, ²Genetika Tanszék

Studiul cineticii de dezvoltare a drojdiei Saccharomyces Bayanus în prezența unor substanțe auxiliare farmaceutice

Drojdiile transformă glucidele simple în alcool, care este una dintre sursele de energie cele mai nepoluante. Scopul lucrării este stabilirea unor condiții de fermentare mai optime și mai economice pentru obținerea alcoolului etilic. Cercetările au fost efectuate cu o tulpină de drojdie selecționată în mod special pentru fermentarea alcoolică, specie Saccharomyces Bayanus (tulpina Hefix 2000). S-au determinat factorii variabili în cursul fermentației și anume variația concentrației produsului respectiv variația numărului celulelor vii și totale ale drojdiei inoculate și randamentul procesului. Fermentația alcoolică a fost repetată în prezența a celor trei substanțe auxiliare farmaceutice: polivinilpirolidonă, Tween 80, și alginat de sodiu. În concluzie rezultatele cele mai bune în ceea ce privește randamentul produsului și cantitatea de biomasă obținută, am obținut în cazul utilizării povidonului, care este mai rar amintit în literatură de specialitate față alginat de sodiu des utilizat pentru imobilizare.

Fermentation kinetics study of the Saccharomyces Bayanus culture in the presence of pharmaceutical adjuvants used for immobilisation

Alcoholic fermentation is one of the possibilities to transform biomass resulted from plant photosynthesis into energy transporters. Yeast transforms simple sugars in alcohol, which is one of the least polluting energy resources of the future. The aim of the present study was to find the optimal and most economic working conditions for the process of ethylic alcohol production. Research has been done on a yeast species - Saccharomyces Bayanus (Hefix 2000) - selected specifically for alcoholic fermentation obtained from the Biotechnology Research Institute Bay Zoltan from Szeged, Hungary. During fermentation variable factors have been determined, like the product and substrate concentration variation and the variation of the number of live and total inoculated yeast cells. We have calculated the constants that characterize the kinetic processes of fermentation, the variation of live cells and biomass in % as well as the yield. Alcoholic fermentation was repeated in the presence of three auxiliary pharmaceutical substances: polyvinyl-pyrrolidone, Tween 80, and Na-alginate, by maintaining all the other conditions constant. We have also determined the critical mycellar concentration of the three studied auxiliary substances to correlate them with the kinetics and yield of fermentation. In conclusion, from the point of view of product yield and biomass quantity, the best results have been obtained with kolidon, rarely cited in the literature as generally Na-alginate is used for immobilization.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (3): 210-213

www.emeogysz.ro

A biotechnológia tudományának eredményei és a hozzá kapcsolódó iparágak termékei napjainkban egyre szélesebb körben kerülnek alkalmazásra. Az állandó környezetszennyezés hatására fellépő általános felmelegedés káros következményeit tapasztalva egyre sürgetőbbé válik az áttérés új természetbarát energiaforrások felhasználására.

Az oxigéntermelő és széndioxidot felhasználó fotoszintetizáló növényekből keletkező biomasza energiahordozóvá alakításának egyik lehetősége az alkoholos fermentáció. A növényi termékekben illetve hulladékokban megtalálható poliszacharidok előzetes fermentatív lebontása útján nyert egyszerű cukrokat a különböző élesztők a legkevésbé környezetszennyező energiaforrások közé sorolható etanollá alakítják [8,9,10,12].

Dolgozatunk célja az etanol előállítására szolgáló gazdaságosabb eljárás feltételeinek a vizsgálata [4]. Immobilizált sejtekkel dolgozni előnyösebb, mint a szabad sejteket tartalmazó oldatokkal, mert nagyobb a stabilitásuk, a környezeti körülményekre kevésbé érzékenyek, regenerálhatók és újrahasználhatók, alkalmasak folyamatos üzemmenetre, nagyobb sejtpopulációban használhatók és ezzel nagyobb termékkoncentráció érhető el, hosszabb ideig megőrzik élet- és termelőképességüket, megkönnyítik a termék elválasztását [1,12,14]. Az immobilizálás során megváltozik a szubsztrát-, termék-, illetve ionmegoszlás a sejtet közvetlenül körülvevő oldat és a hordozó között figyelembevéve a hidrofób és az elektrosztatikus kölcsönhatásokat. Módosul a szubsztrát és termék transzfert korlátozó diffúzió az

immobilizált sejtet körülvevő határrétegben és a hordozó belsejében [13]. Ennek javítása érdekében javasolják a különböző felületaktív anyagok hozzáadását az immobilizált sejtuszupenzióhoz [2].

Immobilizált sejtartalmú fermentlevek előállítására különböző a gyógyszerészeti gyakorlatból ismert segédanyagot is felhasználunk [4,5,7,11,15]. Vizsgálatainkban az immobilizáció során felhasználható három gyógyszerészeti segédanyag hatását követtük az alkoholos fermentáció folyamatára [4,7].

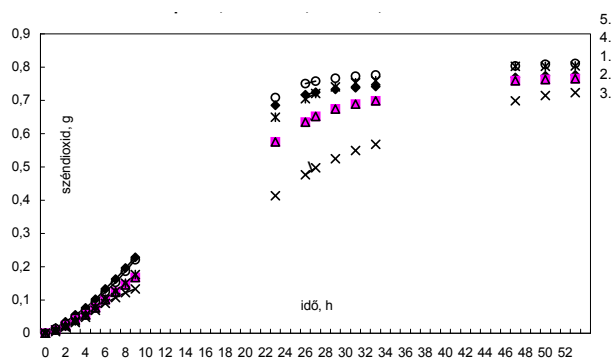
Meghatároztuk a fermentáció során változó, különböző paramétereket: a termékkoncentrációt, az élősejtszámot és a biomasza tömegét valamint kiszámítottuk a fermentáció hozamát [3,4,15,16]. Kísérleteinkhez a szegedi Bay Zoltán Biotechnológiai Kutató Intézet által rendelkezésünkre bocsátott Saccharomyces Bayanus (Hefix 2000) élesztőtörzset ezúton mondunk köszönetet.

Az alkoholos fermentációt megismételtük három gyógyszerészeti segédanyag (povidon - PVP, Tween 80, nátriumalginát) jelenlétében, miközben az összes többi tényezőt állandó szinten tartottuk. A vizsgált segédanyagok kritikus micelláris koncentrációját összevetettük a fermentáció hozamával.

Anyag és módszer

A fermentáció vizsgálatát kotyogóval lezárt Erlenmayer





1. ábra. Termékképződési görbe különböző koncentrációjú PVP jelenlétében: 1. kontroll próba, 2. 0,001%, 3. 0,01%, 4. 0,1%, 5. 0,2%

lombikokban végeztük, amelyekben a képződő széndioxid kiszorította a levegőt ezzel biztosítva az anaerob körülményeket. A próbákat a fermentáció ideje alatt rázóberendezéssel kevertük.

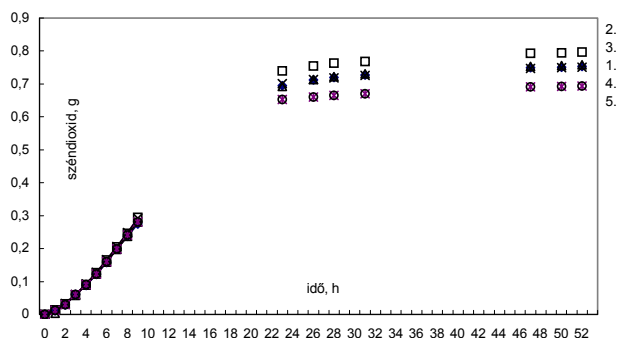
A felhasznált élesztőtörzs a *Saccharomyces Bayanus* (Hefix 2000), a tápoldat összetétele: 10% glükóz, 0,15% NH_4Cl , 0,55% K_2HPO_4 , 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% NaCl és 0,3% citromsav.

Viszonyítási alapként a segédanyag mentes tápoldatban végzett fermentáció során mért és számolt adatokat tekintettük. A fermentációt megismételtük azonos összetételű tápoldatban, amelyhez rendre háromféle gyógyszerészeti segédanyagot (PVP, Tween 80 és nátriumalginát) adtunk négy különböző koncentrációban (0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,2%). Figyelembe véve a vizsgált segédanyagok előzetesen meghatározott kritikus micelláris koncentrációját [6], a segédanyag koncentrációkat úgy választottuk ki, hogy ezt az értéket közrefogják.

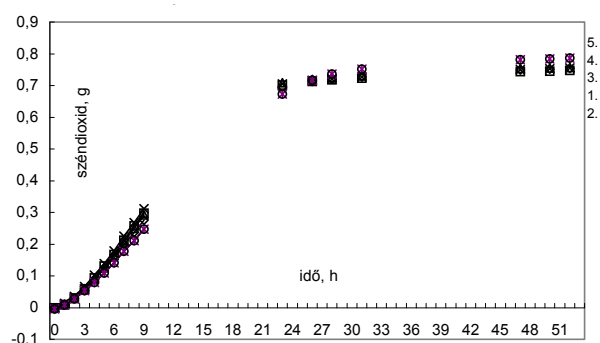
Az élősejtszámot agar lemezre leoltott 30 °C-on tartott kultúrában 48 óra elteltével számoltuk. A szilárd táptalaj 0,3% élesztőkivonat, 0,5% peptont, 0,1% glükózt és 0,3% malátakivonatot is tartalmazott.

A biotömeggét a centrifugálással elkülönített sejttömeg visszamérésével határoztuk meg. A próbákat 10 percre centrifugáltuk 4000 fordulat/perc fordulatszámmal.

A termék koncentrációt a keletkező etanollal arányos széndioxid mennyiséggel fejeztük ki. Az eltávozó széndioxid meghatározására analitikai mérleggel mértük a fermentációs edények súlycsökkenését.



2. ábra. Termékképződési görbe különböző koncentrációjú nátriumalginát jelenlétében: 1. kontroll próba, 2. 0,001%, 3. 0,01%, 4. 0,1%, 5. 0,2%



3. ábra. Termékképződési görbe különböző koncentrációjú tween 80 jelenlétében: 1. kontroll próba, 2. 0,001%, 3. 0,01%, 4. 0,1%, 5. 0,2%

Eredmények

A dinamikus felületi feszültség és a nedvesítési szög alapján meghatározott kritikus micelláris koncentráció a PVP és Tween 80 esetében 0,05%, a nátriumalginát esetében pedig 0,1% [6].

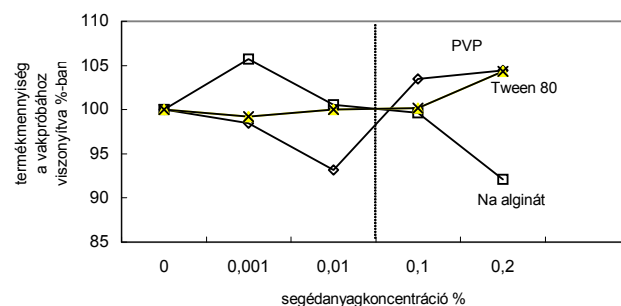
A három vizsgált segédanyag változó koncentrációja mellett mértük a képződő termék mennyiségét az idő függvényében és a kapott értékeket az 1-3. ábrán tüntettük fel.

A termékmennyiség változását a segédanyag koncentráció függvényében a 4. ábra, a sejttömeg meghatározások adatait az 5. ábra, az élősejtszám változásra vonatkozó adatokat pedig a 6. ábra segítségével adtuk meg.

Az 1. táblázatban összehasonlítottuk a termékképződés hozamának, az élősejtszámnak és a sejttömegnek a változását a különböző koncentrációban használt segédanyagokat tartalmazó és a segédanyagmentes kontroll próba esetén.

Megbeszélés

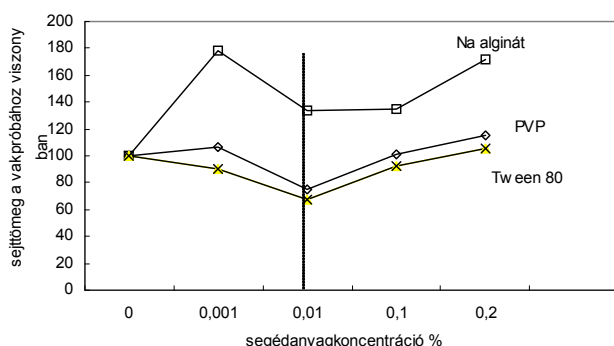
A PVP jelenlétében végzett fermentációk azt mutatják, hogy a kis koncentrációjú segédanyag jelenlétében a folyamat végén meghatározott élősejtszám növekedik a segédanyag mentes kontroll próbához viszonyítva, a micelláris koncentráció feletti értékeknél viszont lényegesen lecsökken. A biotömeggének kisebb ingadozást mutat, egészen kismennyiségű PVP hatására nő, a micelláris koncentráció körüli értéknél minimum, majd az efeletti értékeknél ismét enyhén emelkedik. A termékhozam a micelláris koncentráció körüli értéknél minimális, az efeletti koncentrációban



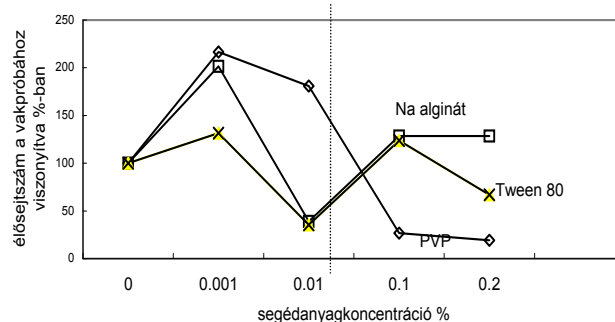
4. ábra. A termékmennyiség változása a segédanyagkoncentrációk függvényében

1. táblázat. Segédanyagok jelenlétében végzett fermentációk során nyert adatok

Segédanyag	Koncentráció %	Élősejtszám %	Biomassza %	Hozam % a kontroll próbához viszonyítva	Hozam % a tápanyag mennyiséghez viszonyítva
Kontroll		100	100	100	78,44
PVP	0,001	216,53	106,217	98,48	78,24
	0,01	180,76	74,57	93,15	74
	0,1	26,69	100,92	103,47	82,20
	0,2	19,23	115,5	114,41	90,88
Na alginát	0,001	201,6	178,77	105,70	81,47
	0,01	39,02	133,88	100,55	77,5
	0,1	128,45	134,77	99,62	76,78
	0,2	128,45	171,85	92,11	70,99
Tween 80	0,001	131,5	90,02	99,23	76,48
	0,01	35,33	67,85	99,00	77,46
	0,1	123,65	92,56	100,17	77,11
	0,2	66,87	105,36	104,34	80,42



5. ábra. Sejttömeg változása a segédanyagkoncentráció függvényében



6. ábra. Az élősejtszám változása a segédanyagkoncentráció függvényében

használt PVP esetén nő. A micelláris koncentráció feletti PVP elősegíti a tápoldat jobb kihasználását és a termékhozam növelését, de az élősejtszám lényeges csökkenését idézi elő, ezért olyan esetekben ajánlott segédanyagként amikor a fermentáció célja a nagyobb mennyiségű termék előállítása.

A legkisebb vizsgált koncentrációban (0,001%) adott nátriumalginát mind az élősejtszámot, mind a biomassza tömegét, mind a termékhozamot növeli a kontroll próbához viszonyítva. Az élősejtszám növekedés egyben azt is jelenti, hogy a sejtek életideje megnövekedik. [4] Az élősejtszám és a biomassza tömege a minimumot a micelláris koncentráció esetén éri el, ezután ismét növekedik, de nem éri el a 0,001%-nál kapott értékeket. A nátriumalginát a nagyobb élősejt- és biomasszatömeg előállítását célzó fermentációkban használható az immobilizáció során segédanyagként, a termékhozamot alig befolyásolja.

A Tween 80 tartalmú fermentlevekben a micelláris koncentráció körüli értéknél minimumot észleltük mindhárom vizsgált paraméter esetében. A legmagasabb Tween-koncentráció (0,2%) mind a biomassza, mind a hozam tekintetében emelkedést eredményezett a kontrollhoz viszonyítva. A fermentáció vizsgált paramétereit a három

vizsgált segédanyag közül a legkevésbé a Tween 80 befolyásolja. A 0,2% Tween 80-t tartalmazó tápoldatban ugyan növekedett a termékhozam, de nem érte el a PVP esetében mért szintet.

Következtetések

A sejtimmobilizációra segédanyagként a szakirodalomban gyakran leírt alginátot abban az esetben ajánljuk, ha a fermentáció célja a nagyobb mennyiségű élősejt illetve biomassza létrehozása, jelenlétében a sejtek hosszabb ideig megőrzik életképességüket.

Ha a fermentáció célja a termékhozam növelése, akkor a micelláris koncentráció felett használt PVP-t, illetve Tween 80-at ajánljuk. Ezek közül a PVP használható jobb tápanyag értékesítéssel. Ennek oka, hogy a felületaktív PVP és Tween 80 jelenlétében módosul a diffúzió és ezzel a tápanyag és szubsztrát transzfer a sejtet körülvevő határrétegben.

Irodalom

1. Bekatorou A., Sarellas A., Ternan N.G. et al. - *Low-temperature brewing using yeast immobilized on dried figs*, J. Agric Food Chem., 2002, 50(25):7249-7257.
2. Branyik T., Vicente A., Oliveira R. et al. - *Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor*, Biotechnol Bioeng., 2004, 88(1):84-93.
3. Branyik T., Silva D.P., Vicente A.A. et al. - *Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials*, J Ind Microbiol Biotechnol., 2006, 33(12):1010-1018.
4. Deriase S.F., Farahat L.M., El-Batal A.I. - *Optimization of process parameters for the continuous ethanol production by Kluyveromyces lactis immobilized cells in hydrogel copolymer carrier*, Acta Microbiol Pol., 2001, 50(1):45-51.
5. Dudutz Gy., Csép K. - *Gyógyszeripari biotechnológia és génterápia az ezredfordulón*, ProCardia Kiadó, Marosvásárhely, 1999, 89-97.
6. Gall E. - *Studiul cineticii de dezvoltare a drojdiei Saccharomyces Bayanus în prezența unor substanțe auxiliare farmaceutice*, Államvizsga dolgozat, MOGYE, 2000, 42-46.
7. Martynenko N.N., Gracheva I.M., Sarishvili N.G. et al. - *Immobilization of champagne yeasts by inclusion into cryogels of polyvinyl alcohol for preventing cell escape from carrier matrix*, Prikl Biokhim Mikrobiol. 2004, 40(2):186-193.
8. Najafpour G., Younesi H., Syahidah K. et al. - *Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using Saccharomyces cerevisiae*, Bioresour Technol., 2004, 92(3):251-260.
9. Navratil M., Domeny Z., Sturdik E. et al. - *Production of non-alcoholic beer using free and immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae deficient in the tricarboxylic acid cycle*, Biotechnol Appl Biochem., 2002, 35:133-140.
10. Paiva T.C., Sato S. - *Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast*, Appl Biochem Biotechnol., 1996, 57-58:535-541.
11. Raymond M.C., Neufeld R.J., Poncellet D. - *Encapsulation of brewers yeast in chitosan coated carrageenan microspheres by emulsification/thermal gelation*, Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol., 2004, 32(2):275-291.
12. Sheoran A., Yadav B.S., Nigam P. et al. - *Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized Saccharomyces cerevisiae HAU-1*, J Basic Microbiol., 1998, 38(2):123-128.
13. Verbelen P.J., De Schutter D.P., Delvaux F. et al. - *Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications*, Biotechnol Lett., 2006, 28(19):1515-1525.
14. Webb C. - *The role of cell immobilization in fermentation technology*, Aust J Biotechnol., 1989, 3(1):50-55.
15. Zhang Y., Kennedy J.F., Knill C.J. et al. - *Kinetic analysis of beer primary fermentation using yeast cells immobilized by ceramic support adsorption and alginate gel entrapment*, Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol., 2006, 34(4):395-405.
16. Yadav BS, Rani U, Dhamija SS, Nigam P et al. - *Process optimization for continuous ethanol fermentation by alginate-immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae HAU-1*, J Basic Microbiol., 1996, 36(3):205-210.