

Jerzy Jan Pietkiewicz, Małgorzata Janczar-Smuga*

PRZEGLĄD METOD HODOWLI DROBNOUSTROJÓW TLENOWYCH STOSOWANYCH W PROCESACH BIOSYNTETY

1. Wstęp

W procesach biotechnologicznych, nazywanych w skrócie bioprocесami, wytwarzanie produktów jest wynikiem przemian biochemicznych zachodzących z udziałem żywych komórek drobnoustrojów, komórek roślinnych lub zwierzęcych bądź też aktywnych biologicznie fragmentów komórek lub ich metabolitów. Bioprocесy mają bardzo zróżnicowany charakter, mogą być prowadzone wieloma sposobami i wymagają różnych warunków technicznych [Bednarski, Reps 2001].

Celem bioprocесu może być:

- 1) nagromadzenie biomasy drobnoustrojów, np.: drożdży piekarskich, winiarskich, gorzelnicznych, browarnicznych, paszowych, bakterii, osadów czynnych;
- 2) otrzymywanie odpowiednich metabolitów, np.: kwasów organicznych, enzymów, alkoholi, antybiotyków, aminokwasów, metanu, wodoru itp.;
- 3) przemiana składników podłoża na drodze biotransformacji (np. otrzymywanie kwasu octowego, glukonowego), biohydrolizy (np. skrobi, celulozy, białek), biodegradacji (oczyszczanie ścieków), biolugowania (np. miedzi, uranu, siarki).

Najczęściej stosowanym procesem biotechnologicznym jest proces tlenowej hodowli drobnoustrojów (biosyntezy), w którym uzyskuje się biomasę drobnoustrojów lub ich metabolity zawarte wewnątrz komórek lub wydzielane przez nie do podłoża hodowlanego. Celem bioprocесu jest wytworzenie odpowiedniej ilości dobrego jakościowo bioproduktu z korzystną wydajnością, który po sprzedaży przyniesie zysk producentowi. Dobór odpowiedniej metody hodowli drobnoustrojów, dobra znajomość optymalnej wielkości parametrów bioprocесowych oraz zapewnienie optymalnych i efektywnych warunków jej przebiegu powinny skutkować niskim zużyciem energii, dużą wydajnością produktu i niskim kosztem surowców, a zatem również niskim kosztem jednostkowym produktu.

* Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, 53-345 Wrocław, ul. Komandorska 118/120.

Jest wiele kryteriów podziału metod hodowli drobnoustrojów. W polskiej literaturze naukowej brak jest jednolitego systemu klasyfikacyjnego i autorzy często stosują różne nazwy dla tego samego rodzaju hodowli. W tej pracy zaproponowano ujednoczenie nazewnictwa i klasyfikacji metod hodowli drobnoustrojów oraz przedstawiono krótką charakterystykę poszczególnych metod hodowli.

2. Rodzaje hodowli drobnoustrojów

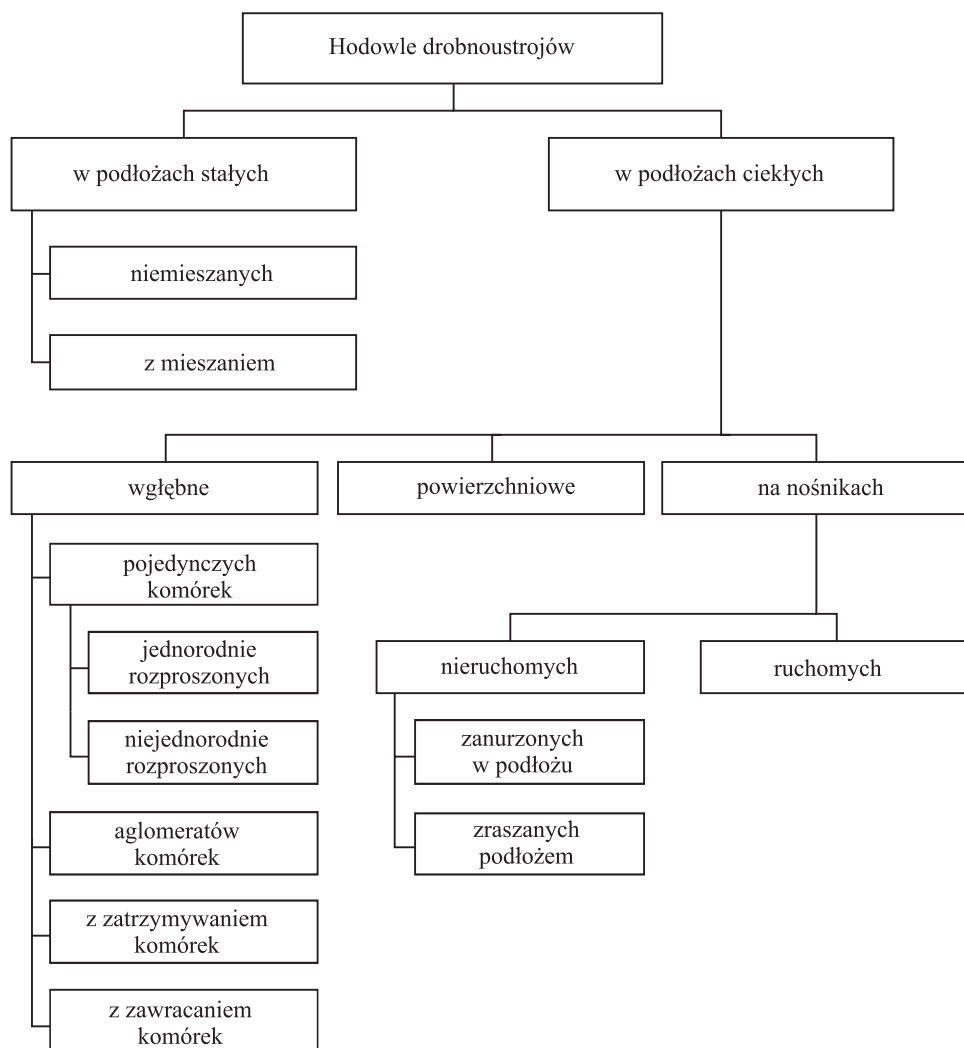
Ogólnie metody hodowli drobnoustrojów dzieli się na dwie zasadnicze grupy: hodowle tlenowe i hodowle beztlenowe [Bednarski, Fiedurek 2007; Szewczyk 1995]. Próbę ujednoczenia nazewnictwa hodowli drobnoustrojów klasyfikowanych ze względu na stan fizyczny podłoża i sposób zawieszenia komórek w podłożu przedstawiono na rys. 1.

Metody hodowli drobnoustrojów z punktu widzenia stanu fizycznego podłoża można podzielić na dwa zasadnicze rodzaje: hodowle w podłożach stałych i hodowle w podłożach ciekłych.

Hodowle w podłożach stałych można prowadzić w cienkiej warstwie niemieszanego podłoża znajdującego się na tacach lub w grubej warstwie podłoża, ale wtedy jest konieczne okresowe lub ciągle jego mieszanie (spulchnianie). W hodowlach w podłożach stałych duże trudności sprawia utrzymanie jednolitych warunków wzrostu drobnoustrojów w całej masie (objętości) podłoża. Ciepło wytwarzane w czasie wzrostu jest przewodzone do złoża i do przepływającego przez nie powietrza, z którym jest odprowadzane na zewnątrz. Z tego powodu w hodowlach prowadzonych w niemieszanych złożach warstwa podłoża powinna być cienka (5-6 cm), natomiast w hodowlach prowadzonych w mieszanych (spulchnianych) złożach warstwa podłoża może być dużo grubsza. Konieczne jest jednak utrzymywanie w czasie hodowli drobnoziarnistej struktury złoża zapewniającej ciągły przepływ powietrza między drobinami złoża. Taka struktura złoża umożliwia nie tylko odpowiednie jego natlenianie i odprowadzanie ciepła, ale znacznie zwiększa sumaryczną powierzchnię podłoża dostępną do wzrostu drobnoustrojów. Powietrze przepływające przez złożo powinno być nasycone wodą, aby utrzymać w nim odpowiednią wilgotność (aktywność wody). Hodowle w podłożach stałych stosowane są do produkcji preparatów enzymatycznych, kwasu cytrynowego i wielu specyficznych przypraw, np. sosu sojowego, miso, koji [Durand i in. 1988; Gąsiorek 1999; Leśniak i in. 1996].

Drugą dużą grupę metod hodowli drobnoustrojów, wydzieloną według stanu fizycznego podłoża, stanowią **hodowle w podłożach ciekłych**, które można podzielić na dalsze podgrupy, przyjmując za kryterium podziału sposób zawieszenia komórek drobnoustrojów w podłożu. Są to: hodowle powierzchniowe, hodowle wgłębne i hodowle na nośnikach (z unieruchomionymi drobnoustrojami).

Pierwotnie hodowle w podłożach ciekłych były prowadzone przede wszystkim **metodą powierzchniową**. Polega ona na hodowli drobnoustrojów na powierzchni cienkiej warstwy podłoża (5-10 cm) znajdującego się na tacach. Komórki drobn-



Rys. 1. Podział hodowli ze względu na stan fizyczny podłoża i sposób zawieszenia w nim komórek drobnoustrojów

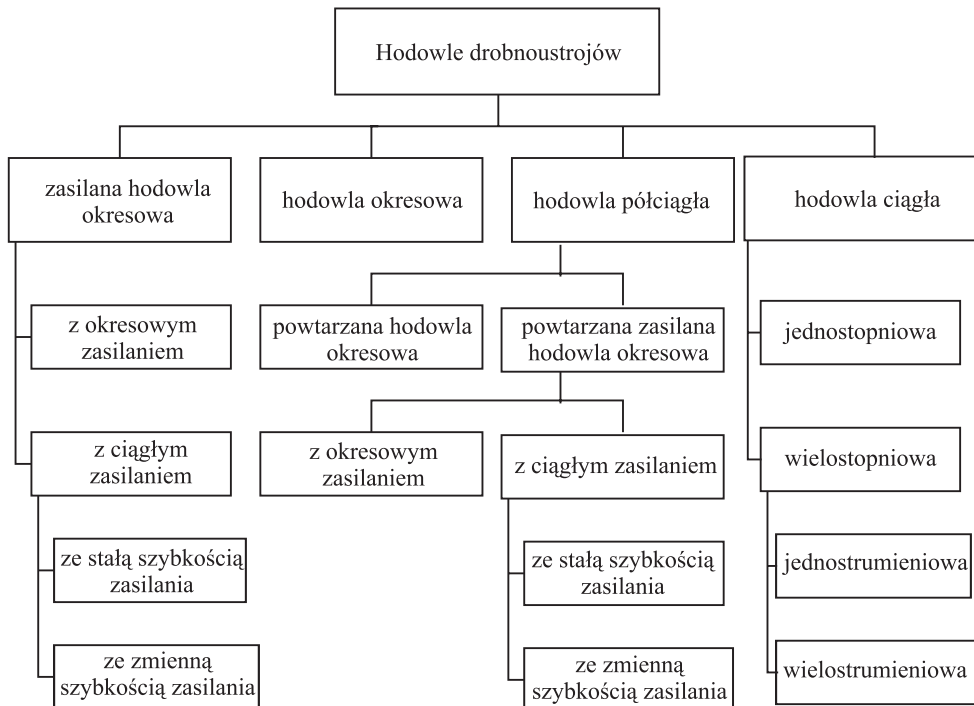
Źródło: opracowanie własne.

ustrojów jednokomórkowych (np. bakterii) lub wielokomórkowych (np. grzybów strzępkowych) rosną na całej powierzchni podłoża, tworząc niezatapialny „kożuch” (plechę). Komórki drobnoustrojów znajdujące się w dolnej warstwie plechy zanurzonej w podłożu mają lepsze warunki odżywiania się niż komórki znajdujące się na powierzchni tej warstwy, które z kolei są intensywniej natleniane. Taki niejednorodny (heterogeniczny) układ, w którym komórki mogą być niedotlenione lub niedożywione, nie sprzyja wydajnej i kontrolowanej biosyntezie. Jest to bardzo prosta technicznie i technologicznie metoda hodowli, lecz ze względu na bardzo dużą nie-

jednorodność jest mało efektywna i obecnie coraz rzadziej stosowana. Metoda powierzchniowa stosowana jest głównie do hodowli grzybów strzępkowych w celu otrzymywania preparatów enzymatycznych (m.in. celulolitycznych, pektynolitycznych, amylolitycznych) oraz do produkcji niektórych kwasów organicznych, np. cytrynowego, glukonowego, itakonowego [Pietkiewicz 1996; Zagrodzki i in. 1969].

W **hodowlach wgłębnych** komórki drobnoustrojów swobodnie przemieszczają się w całej objętości podłoża [Rehm, Reed 1985; Pietkiewicz, Leśniak 2000]. Biorąc pod uwagę stopień rozproszenia (sposób zawieszenia) komórek i czas ich przebywania w podłożu, możemy wyróżnić hodowle wgłębne, w których komórki znajdują się w podłożu:

- w postaci mniej lub bardziej jednorodnie (homogenicznie) rozproszonej zawiesiny pojedynczych komórek,
- w postaci mniej lub bardziej jednorodnie (homogenicznie) rozproszonej zawiesiny aglomeratów komórek, np.: zespolonych ze sobą wielu komórek drobnoustrojów jednokomórkowych lub wzajemnie splecionych strzępek pleśni przyjmujących postać m.in. kuleczek lub kłaczków,
- stale przebywają w podłożu (są zatrzymywane) i nie mają możliwości wypływania z bioreaktora wraz z podłożem hodowlanym, ponieważ ich swobodny wy-



Rys. 2. Podział hodowli drobnoustrojów ze względu na stopień wypełnienia bioreaktora podłożem na początku hodowli oraz ciągłość zasilania

Źródło: opracowanie własne.

plyw uniemożliwia membrana lub zjawisko sedymentacji występujące w górnej strefie bioreaktora, praktycznie pozbawionej ruchów cieczy,

- swobodnie wypływają z bioreaktora wraz z podłożem, ale natychmiast po opuszczeniu bioreaktora są oddzielane od podłoża w specjalnym separatorze, np. w filtrze lub wirówce, i są zwracane do podłoża znajdującego się w bioreaktorze.

Spośród metod hodowli drobnoustrojów w podłożach ciekłych coraz bardziej są rozwijane **hodowle drobnoustrojów unieruchomionych** na różnego rodzaju nośnikach [Eikmeier, Rehm 1984; Gary, Sharma 1992; Rymowicz 1998]. Tego rodzaju hodowle dzieli się na:

- hodowle drobnoustrojów unieruchomionych na ruchomych nośnikach, w których nośnik stanowi zawieszinę swobodnie przemieszczającą się w podłożu,
- hodowle drobnoustrojów unieruchomionych na nieruchomych nośnikach, w których nośnik zawierający unieruchomione drobnoustroje jest zanurzony w podłożu lub jest zraszany podłożem, które cienką warstwą spływa po porowatym (uziarnionym), przewietrzanym złożu.

Biorąc pod uwagę stopień wypełnienia bioreaktora podłożem na początku hodowli oraz ciągłość zasilania, wyróżnia się cztery podstawowe metody hodowli (rys. 2): hodowle okresowe, zasilane hodowle okresowe, hodowle półciągłe i hodowle ciągłe.

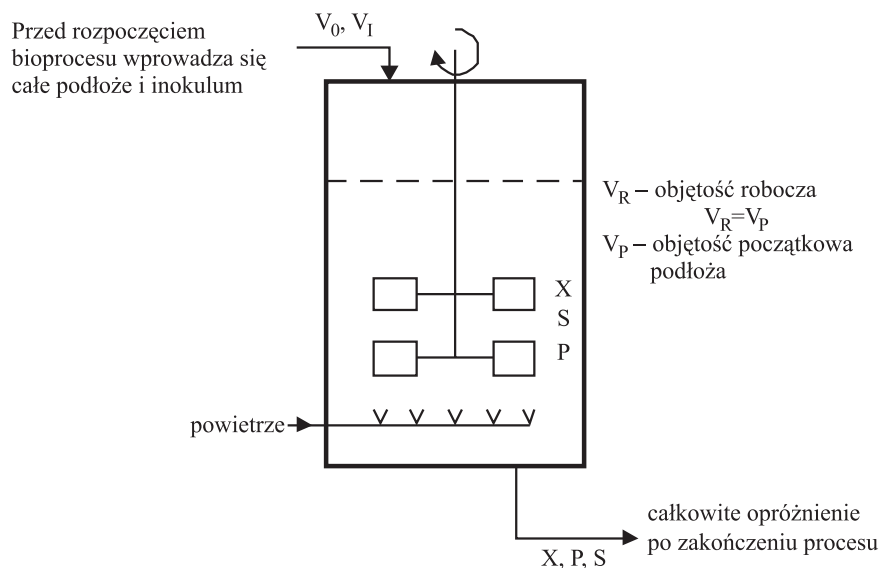
3. Hodowla okresowa

Hodowla okresowa jest najstarszą i najprostszą technologicznie metodą hodowli drobnoustrojów [Asenjo i in. 1996; Chmiel 1998; Moser 1985a]. W tej metodzie, tuż przed rozpoczęciem procesu hodowli, cała objętość robocza bioreaktora (ok. 75% objętości całkowitej) jest napełniana podłożem hodowlanym, do którego dodaje się inokulum (rys. 3).

Proces hodowli jest prowadzony aż do chwili wyczerpania substratu (źródła węgla i energii) z podłoża lub znacznego spowolnienia szybkości właściwej wzrostu drobnoustrojów lub szybkości właściwej nagromadzania pożądanych bioproduktów. W czasie hodowli okresowej do podłoża nie doprowadza się żadnych składników odżywczych i nie odbiera się produktów biosyntezy. Po zakończeniu hodowli bioreaktor jest całkowicie opróżniany, a odebrane podłoże jest kierowane do dalszego przerobu w celu oddzielenia biomasy i wyizolowania endogennych lub egzogennych bioproduktów. Hodowle okresowe, ze względu na stopniową zmianę składu podłoża i warunków hodowli wskutek wyczerpywania się składników odżywczych i nagromadzania metabolitów, nie pozwalają na pełne wykorzystanie potencjału metabolicznego komórek. W tych hodowlach tylko przez krótki okres biosynteza przebiega z dużą szybkością, zbliżoną do maksymalnej. Wzrost drobnoustrojów w hodowli okresowej przebiega ze zmienną szybkością, przy czym maksymalną szybkość właściwą wzrostu uzyskuje się tylko w fazie wykładniczej. A zatem w hodowli okre-

sowej tylko w tej fazie wzrostu produkcja biomasy przebiega z najwyższą szybkością [Krzystek, Ledakowicz 1999].

Hodowle okresowe nie stwarzają również możliwości efektywnego wykorzystania zdolności produkcyjnej bioreaktorów, ponieważ dużo czasu zajmuje ich opróżnianie, mycie i przygotowywanie do nastawienia następnego procesu.



Rys. 3. Schemat węgłnej hodowli okresowej. V_0 – objętość podłoża wprowadzonego do bioreaktora przed hodowlą, V_1 – objętość inokulum, X – stężenie biomasy, S – stężenie substratu, P – stężenie produktu

Źródło: opracowanie własne.

Wady i zalety hodowli okresowych to przede wszystkim:

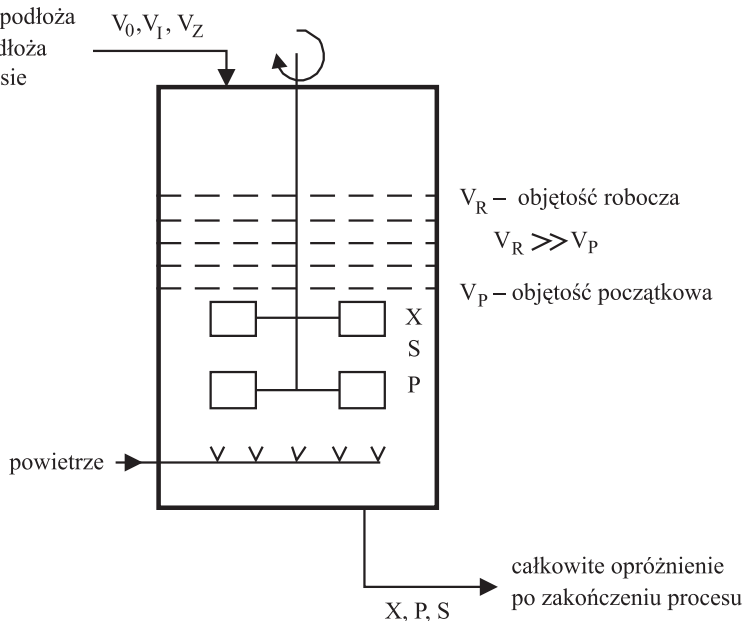
- prostota technologiczna,
- łatwość zapewnienia jałowych warunków przebiegu procesu,
- nieoptymalne wykorzystanie urządzeń,
- nieoptymalne wykorzystanie potencjału metabolicznego komórek i aktywności enzymów,
- w czasie wzrostu drobnoustrojów jedynie przez krótki okres są utrzymywane optymalne warunki procesu biosyntezy,
- niska produktywność,
- ciągła zmienność warunków stwarza wiele trudności w bieżącej kontroli i regulacji oraz automatyzacji tych procesów.

Hodowle okresowe są powszechnie stosowane do namnażania biomasy drobnoustrojów oraz do produkcji pierwotnych i wtórnych produktów metabolizmu [Fiechter 1981].

4. Zasilane hodowle okresowe

Rozwój metod wglębnej hodowli, a zwłaszcza dążenie do eliminacji wad występujących w klasycznych hodowlach okresowych, doprowadził do opracowania wielu zmodyfikowanych metod hodowli okresowych, tzw. **zasilanych hodowli okresowych** [Dawson i in. 1988; Enfors 1998]. W zasilanej hodowli okresowej, przed rozpoczęciem hodowli, tylko od 40 do 60% pojemności bioreaktora wypełnia się podłożem hodowlanym. Po wprowadzeniu inokulum proces hodowli prowadzi się podobnie jak w metodzie okresowej. Po osiągnięciu fazy wykładniczej wzrostu lub maksymalnej szybkości nagromadzenia pożądanego metabolitu, aby jak najdłużej utrzymać ten stan hodowli, rozpoczyna się doprowadzanie do bioreaktora świeżego podłoża lub tylko niektórych jego składników (rys. 4).

Przed rozpoczęciem bioprodukcji wprowadza się część podłoża i inokulum, resztę podłoża systematycznie w czasie trwania procesu ($V_P \nearrow V_R$)



Rys. 4. Schemat zasilanej wglębnej hodowli okresowej. V_0 – objętość podłoża wprowadzonego do bioreaktora przed hodowlą, V_1 – objętość inokulum, V_Z – objętość podłoża wprowadzana do bioreaktora w czasie jednorazowego zasilania, X – stężenie biomasy, S – stężenie substratu, P – stężenie produktu

Źródło: opracowanie własne.

Doprowadzanie substratów w czasie przebiegu procesu biosyntezy pozwala przez dłuższy okres utrzymywać na optymalnym poziomie stężenia pożądaných składników w podłożu i tym samym wydłużyć okres wykładniczej fazy wzrostu drobnoustrojów lub okres tworzenia produktu z maksymalną szybkością. Podłoże zasilające hodowlę może być doprowadzane do bioreaktora porcjami, w określo-

nych odstępach czasu. Tak prowadzona hodowla nazywana jest **okresowo zasilaną hodowlą okresową**.

Można także zastosować ciągłe dozowanie podłoża zasilającego i wtedy jest ona nazywana **ciągłe zasilaną hodowlą okresową**, przy czym ciągłe zasilanie może być prowadzone ze stałą lub zmienną szybkością zasilania. Najczęściej w ciągłe zasilanych hodowlach okresowych stosuje się wzrastającą szybkość zasilania, ponieważ w ten sposób można utrzymywać w podłożu stałe stężenie substratów, pomimo zwiększającego się stężenia biomasy. W wyniku doprowadzania podłoża do hodowli następuje stopniowe napełnianie się bioreaktora. Po wypełnieniu całej objętości roboczej bioreaktora przerywa się zasilanie hodowli. Po zużyciu przez drobnoustroje składników substratu i zahamowaniu procesu biosyntezy następuje całkowite opróżnienie bioreaktora i przygotowanie go do nastawienia następnej hodowli [Moser 1985b; Whitaker 1980].

W czasie procesu biosyntezy podłoże zasilające do bioreaktora może być doprowadzane:

a) porcjami – zgodnie z wcześniej opracowanym harmonogramem dozowania, np. co godzinę – bez automatycznej regulacji,

b) automatycznie – np. na podstawie pomiaru stężenia określonego składnika substratu w podłożu hodowlanym (np. glukozy), tak aby jego stężenie utrzymywać na zadanym poziomie umożliwiającym wytwarzanie metabolitów z dużą wydajnością i produktywnością [Agrawal i in. 1989; Pietkiewicz, Leśniak 1984].

Czas trwania procesu okresowego z zasilaniem jest taki sam jak procesu okresowego lub krótszy, pozwala on jednak uzyskać wyższe produktywności i wydajności.

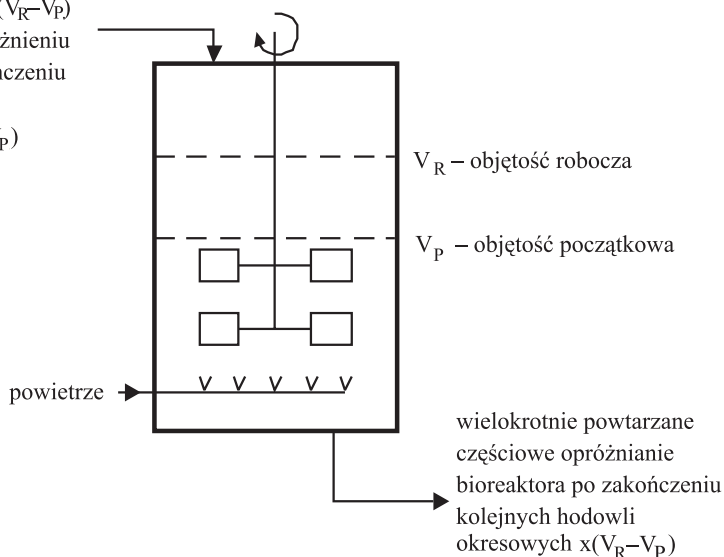
5. Hodowle półciągłe

Hodowla półciągła polega na wielokrotnym powtarzaniu hodowli okresowej lub zasilanej hodowli okresowej, przy czym po zakończeniu poprzedniego procesu z bioreaktora odbiera się tylko część podłoża hodowlanego, czyli nie ma całkowitego opróżniania bioreaktora oraz nie wprowadza się do podłoża nowego inokulum. W bioreaktorze bowiem zawsze pozostaje część starego podłoża zawierającego aktywną biomasę. Do hodowli półciągłych zalicza się powtarzaną hodowlę okresową i powtarzaną zasilaną hodowlę okresową [Eikmeier, Rehm 1987; Leśniak, Stawicki 1979; Pietkiewicz 1996].

Powtarzana hodowla okresowa początkowo przebiega tak samo jak hodowla okresowa, jednak gdy stężenie substratu w podłożu znacznie obniży się i nastąpi duży spadek szybkości biosyntezy, z bioreaktora odbiera się część podłoża hodowlanego i w jego miejsce wprowadza jednorazową porcję świeżego podłoża zapewniającą wypełnienie całej objętości roboczej bioreaktora (rys. 5).

Taki sposób prowadzenia hodowli wstępnej pozwala na cykliczne (wielokrotnie powtarzane) odtwarzanie podobnych stanów metabolicznych wzrostu komórek

wielokrotnie powtarzane
doprowadzanie podłoża
jednorazową porcją ($V_R - V_P$)
po częściowym opróżnieniu
bioreaktora po zakończeniu
kolejnych hodowli
okresowych $x(V_R - V_P)$



Rys. 5. Schemat węgłębnej powtarzanej hodowli okresowej

Źródło: opracowanie własne.

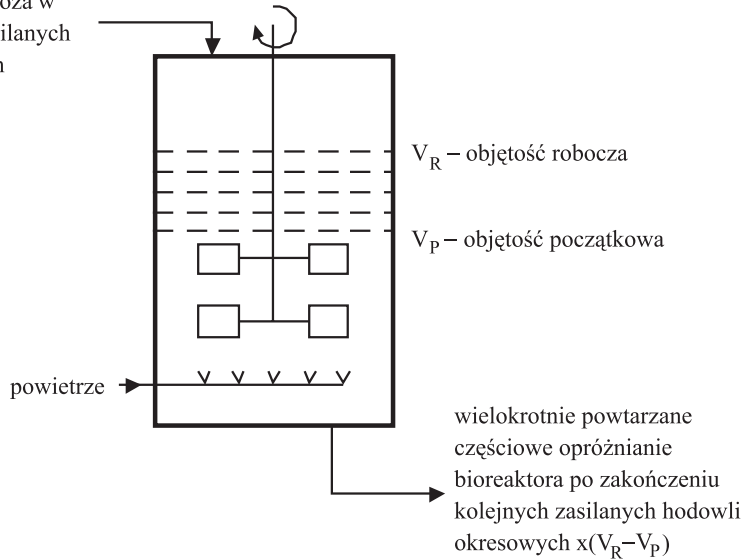
drobnoustrojów i nagromadzenia metabolitów, bez konieczności opróżniania całego bioreaktora, jego mycia, sterylizacji, ponownego napełniania podłożem i nowej inokulacji. Powtarzana hodowla okresowa pozwala uzyskiwać wyższe szybkości biosyntezy bioproduktów oraz umożliwia lepsze wykorzystanie bioreaktorów (zwiększenie zdolności produkcyjnej) w porównaniu z hodowlą okresową [Leśniak, Stawicki 1979]. Ten rodzaj hodowli stosowany jest przy produkcji drożdży paszowych i jest nazywany hodowlą okresowo-dolewową.

Powtarzana zasilana hodowla okresowa początkowo przebiega tak samo jak zasilana hodowla okresowa. Ale kiedy już cała objętość robocza bioreaktora zostanie wypełniona podłożem hodowlanym i kiedy nastąpi znaczne obniżenie stężenia substratu i szybkości biosyntezy, z bioreaktora odbiera się tylko część podłoża hodowlanego, czyli nie opróżnia się całkowicie bioreaktora.

Do pozostawionego w bioreaktorze podłoża rozpoczyna się doprowadzanie świeżego podłoża. Tak jak w zasilanej hodowli okresowej podłoże zasilające może być tu doprowadzane porcjami w określonych odstępach czasu, można również stosować ciągłe zasilanie ze stałą lub wzrastającą szybkością dopływu [Moser 1985c]. Po wypełnieniu objętości roboczej bioreaktora i zużyciu substratu ponownie częściowo opróżnia się bioreaktor i kontynuuje się zasilanie hodowli podłożem zasilającym (rys. 6).

W wyniku takiego sposobu prowadzenia procesu zasilana hodowla okresowa jest wielokrotnie powtarzana i w ten sposób unika się całkowitego opróżnienia bio-

wielokrotnie powtarzane
doprowadzanie podłoża w
czasie kolejnych zasilanych
hodowli okresowych
 $x(V_p \rightarrow V_R)$



Rys. 6. Schemat węgłnej powtarzanej zasilanej hodowli okresowej

Źródło: opracowanie własne.

reaktora, jego mycia i sterylizacji oraz ponownego szczepienia podłoża nowym inokulatem, ponieważ rolę inokulum odgrywa pozostawione w bioreaktorze podłoże hodowlane zawierające aktywną biomasę. Tak jak w zasilanej hodowli okresowej podłoże zasilające do bioreaktora może być doprowadzane:

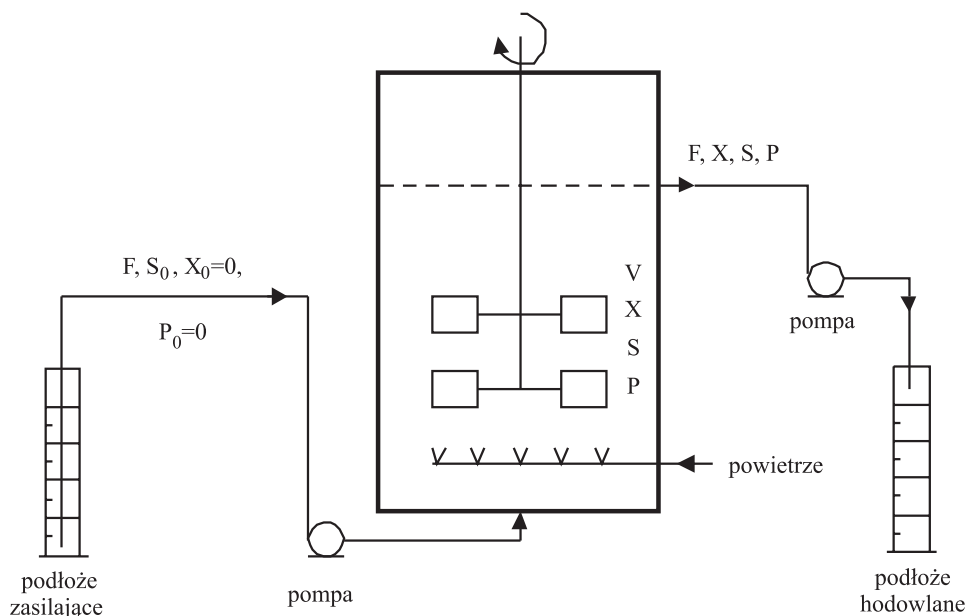
- a) porcjami – zgodnie z wcześniej opracowanym schematem dozowania, np. co godzinę – bez automatycznej regulacji,
- b) automatycznie – np. na podstawie pomiaru stężenia określonego składnika substratu w podłożu hodowlanym (np. glukozy), tak aby jego stężenie utrzymywać na zadanym optymalnym poziomie [Pietkiewicz, Leśniak 1984].

6. Hodowle ciągłe

Największe możliwości intensyfikacji bioprocessów tkwią w zastosowaniu hodowli ciągłych [Pietkiewicz 2002; Wieczorek, Michalski 1976]. Hodowla ciągła drobnoustrojów polega na nieprzerwanym prowadzeniu procesu biosyntezy przez długi okres, w warunkach ciągłego dopływu podłoża zasilającego hodowlę i ciągłego odbioru z bioreaktora podłoża hodowlanego, przy zachowaniu stałej objętości przebywającego w nim podłoża (rys. 7).

Proces hodowli ciągłej na ogół poprzedzany jest hodowlą okresową w celu namnażania biomasy i doprowadzania procesu biosyntezy do wykładniczej fazy wzrostu komórek lub fazy intensywnej biosyntezy pożądanego metabolitu. Po osiągnięciu takiego stanu uruchamia się ciągłe zasilanie hodowli świeżym podłożem i ciągły

odbiór podłoża hodowlanego. Charakterystyczną cechą hodowli ciągłej jest stałość warunków rozwoju drobnoustrojów oraz jednakowy ich stan fizjologiczny. Wyższość hodowli ciągłych nad hodowlami okresowymi polega na lepszym wykorzystaniu potencjału metabolicznego drobnoustrojów, uzyskiwaniu dużo wyższej szybkości biosyntezy oraz efektywniejszym wykorzystaniu zdolności produkcyjnej bioreaktorów i wyższej wydajności bioproduktu [Calcott, Phil 1981; Moser 1985b].



Rys. 7. Schemat jednostopniowej hodowli ciągłej. F – szybkość objętościowa dopływu podłoża zasilającego, S – stężenie substratu w podłożu hodowlanym, S₀ – stężenie substratu w podłożu zasilającym, X – stężenie biomasy w podłożu hodowlanym, X₀ – stężenie biomasy w podłożu zasilającym, P – stężenie produktu w podłożu hodowlanym, P₀ – stężenie produktu w podłożu zasilającym, V – objętość podłoża hodowlanego w bioreaktorze

Źródło: opracowanie własne.

Poza wyższą szybkością biosyntezy hodowla ciągła ma następujące zalety:

- 1) przebiega w ustalonych warunkach, z pominięciem wpływu czasu na zmiany warunków hodowli i fizjologię komórek,
- 2) możliwość regulacji stanu fizjologicznego komórek przez dobór składu podłoża zasilającego, szybkości zasilania i warunków operacyjnych hodowli,
- 3) możliwość prowadzenia hodowli dowolnie długo w ustalonych, optymalnych warunkach,
- 4) proces jest bardziej efektywny, gdyż hodowla przebiega w optymalnym stanie fizjologicznym komórek drobnoustrojów,
- 5) populacja i produkty metabolizmu są bardziej jednorodne,
- 6) istnieje duża możliwość automatycznej regulacji procesu i sterowania nim,
- 7) równomierność zapotrzebowania wody i odprowadzania ścieków,

8) brak szczytowych obciążeń energetycznych związanych z przygotowaniem i przeprowadzeniem hodowli,

9) zmniejszenie nakładów pracy na opróżnianie, mycie i sterylizację aparatury.

Pomimo tych zalet i istotnych korzyści hodowle ciągłe są rzadko stosowane w skali przemysłowej. Związane jest to z trudnościami technicznymi oraz niestałością cech fizjologicznych komórek drobnoustrojów, do których należą:

1) degeneracja szczepów lub możliwość występowania niekorzystnych mutantów i opanowywania przez nie hodowli,

2) trudności techniczne w prowadzeniu hodowli przez długi czas w aseptycznych warunkach zabezpieczających je przed zakażeniami,

3) niedostatecznie szczegółowa znajomość fizjologii i morfologii zastosowanych szczepów drobnoustrojów,

4) konieczność stosowania jednorodnych surowców,

5) trudności w ciągłym dozowaniu podłoża zasilającego, tak aby zapewnić optymalne stężenie substratu w podłożu hodowlanym.

Hodowle ciągłe są szeroko stosowane w badaniach fizjologii, genetyki, zmienności i selekcji drobnoustrojów. Ich zastosowanie w skali przemysłowej jest jednak ograniczone do hodowli drożdży bakterii i glonów, głównie w celu produkcji białka paszowego i oczyszczania ścieków oraz do biosyntezy: etanolu, niektórych kwasów organicznych, antybiotyków i enzymów [Calcott, Phil 1981; Pietkiewicz 2002].

Tabela 1. Rodzaje hodowli ciągłych

Kryterium podziału	Nazwa hodowli ciągłej
Liczba stopni i sposób zasilania	Hodowla ciągła: <ul style="list-style-type: none"> • jednostopniowa, • wielostopniowa jednostrumieniowa, • wielostopniowa wielostrumieniowa
Swoboda przebywania biomasy w bioreaktorze	Hodowla ciągła prowadzona w układzie: <ul style="list-style-type: none"> • otwartym, • zamkniętym z zatrzymywaniem komórek, • zamkniętym z zawracaniem komórek
Stopień rozproszenia komórek (mieszanie)	Hodowla ciągła prowadzona w układzie: <ul style="list-style-type: none"> • jednorodnym (homogenicznym), • niejednorodnym (heterogenicznym)
Sposób „zawieszenia” komórek w podłożu	Hodowla ciągła: <ul style="list-style-type: none"> • powierzchniowa, • wglębna, • z unieruchomionymi komórkami na ruchomych nośnikach, • z unieruchomionymi komórkami na nieruchomych nośnikach
Sposób kontroli szybkości zasilania	Hodowla ciągła prowadzona przy: <ul style="list-style-type: none"> • stałej szybkości rozcieńczania – chemostat, • stałym stężeniu biomasy – turbidostat, • stałym stężeniu substratu – nutristat, • stałym stężeniu produktu – produktstat, • stałym stężeniu tlenu rozpuszczonego – oksystat, • stałym pH – pH-stat, • stałym stężeniu CO₂ – CO₂-stat

Źródło: opracowanie własne.

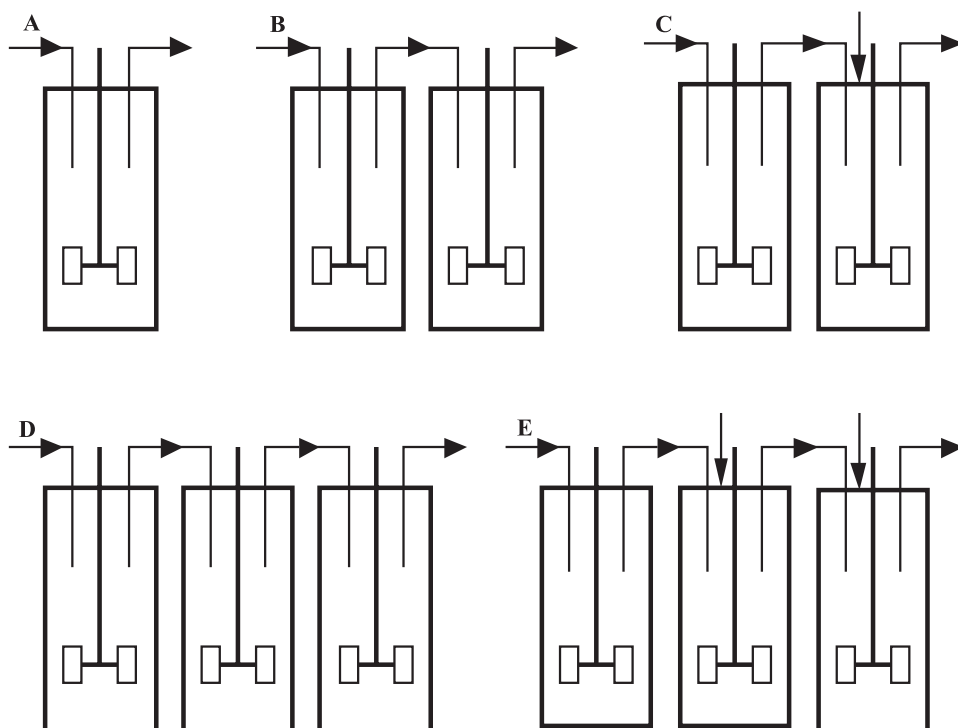
Jest wiele metod prowadzenia hodowli ciągłych różniących się między sobą zastosowanymi rozwiązaniami techniczno-technologicznymi układów aparaturowych oraz sposobami prowadzenia hodowli [Lehmann 1985; Michalski, Kopeć 1977]. Rodzaje hodowli ciągłych i ich nazwy wydzielone w zależności od różnych kryteriów klasyfikacyjnych przedstawiono w tab. 1.

Ze względu na liczbę stopni i sposób zasilania rozróżnia się hodowle ciągłe [Moser 1985c; Pietkiewicz 1996]:

1) jednostopniowe – proces ciągły prowadzony jest w jednym bioreaktorze (rys. 8 A i rys. 9 A, B),

2) wielostopniowe jednostrumieniowe – proces ciągły prowadzony jest w dwóch lub więcej bioreaktorach o równej lub różnej objętości roboczej, przy czym podłoże zasilające jest doprowadzane tylko do pierwszego bioreaktora (rys. 8 B, D i rys. 9 C),

3) wielostopniowe wielostrumieniowe – proces ciągły jest prowadzony w dwóch lub więcej bioreaktorach o równej lub różnej objętości, a podłoże zasilające jest doprowadzane do pierwszego i następnych bioreaktorów (rys. 8 C, E).



Rys. 8. Wgłębne hodowle ciągłe prowadzone w otwartych układach homogenicznych.

A – jednostopniowym, B – dwustopniowym jednostrumieniowym,

C – dwustopniowym wielostrumieniowym, D – trójstopniowym jednostrumieniowym,

E – trójstopniowym wielostrumieniowym

Źródło: opracowanie własne.

Ze względu na swobodę przebywania biomasy w bioreaktorze można wyróżnić hodowle ciągle prowadzone w układach [Pietkiewicz 2002; Rymowicz 1998]:

1) otwartych, w których komórki drobnoustrojów swobodnie wypływają z bioreaktorów wraz z podłożem hodowlanym i nie ma ani pełnego, ani częściowego zawracania komórek do bioreaktora (rys. 8 i 9),

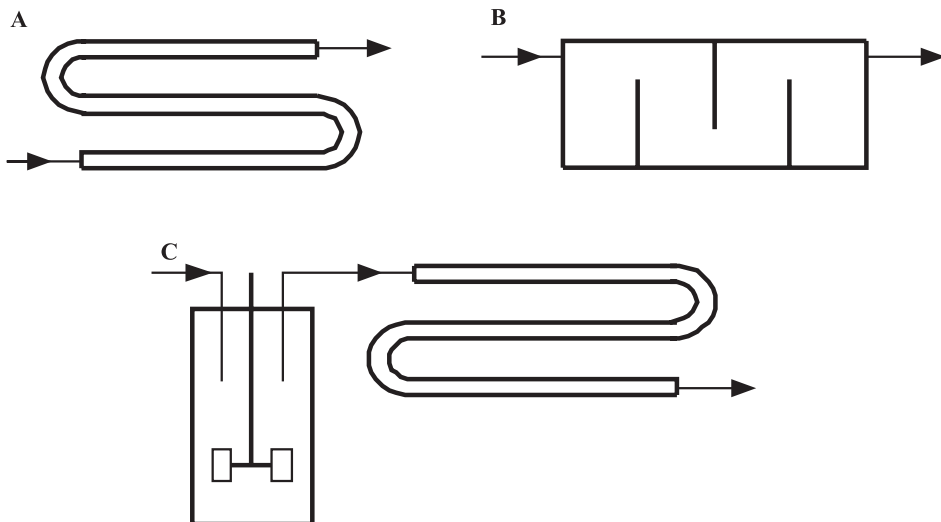
2) zamkniętych z zatrzymywaniem komórek, w których podłoże hodowlane wypływające z bioreaktora nie zawiera komórek drobnoustrojów, ponieważ komórki są zatrzymywane wewnątrz bioreaktora, np. przez membranę (rys. 10),

3) zamkniętych z zawracaniem komórek, w których komórki drobnoustrojów swobodnie wypływają z bioreaktora wraz z podłożem hodowlanym, lecz natychmiast po opuszczeniu bioreaktora są oddzielane od podłoża hodowlanego w specjalnym separatorze (np.: filtr, wirówka) i są całkowicie lub częściowo zawracane do podłoża hodowlanego znajdującego się w bioreaktorze (rys. 11).

Ze względu na stopień rozproszenia komórek (mieszanie) można wyróżnić hodowle ciągle prowadzone w układach:

1) jednorodnych (homogenicznych), w których proces jest prowadzony w warunkach idealnego mieszania (rys. 8 i rys. 11 A, B, C, D),

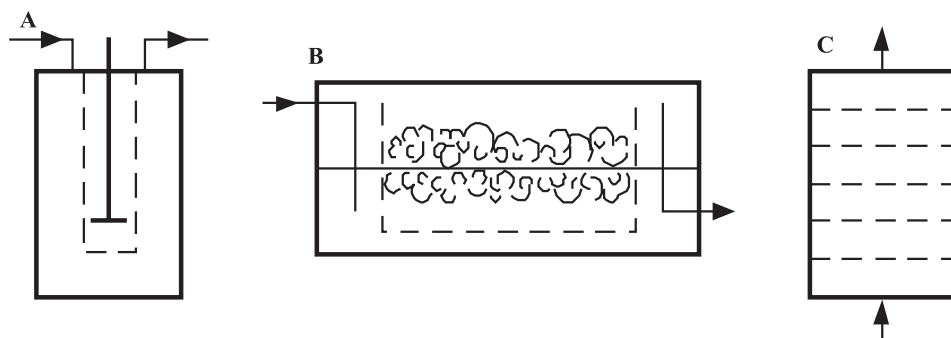
2) niejednorodnych (heterogenicznych), w których występują różnice w stężeniach składników podłoża w różnych punktach bioreaktora, ponieważ nie ma mieszania (np. przepływ tłokowy podłoża hodowlanego) lub zastosowano system ograniczonego mieszania (rys. 9 A, B i rys. 11 E, F).



Rys. 9. Wgłębne hodowle ciągle prowadzone w otwartych układach heterogenicznych.

A – jednostopniowym o przepływie tłokowym, B – jednostopniowym, C – mieszanym dwustopniowym jednostrumieniowym z homogenicznym pierwszym bioreaktorem i heterogenicznym (o przepływie tłokowym) drugim bioreaktorem

Źródło: opracowanie własne.



Rys. 10. Jednostopniowe hodowle ciągłe prowadzone w zamkniętych układach membranowych z zatrzymywaniem komórek

Źródło: opracowanie własne.

Ze względu na sposób „zawieszenia” komórek drobnoustrojów w podłożu różni się hodowle ciągłe:

1) powierzchniowe, w których komórki drobnoustrojów tworzą warstwę biomasy rosnącej na powierzchni podłoża i stale przebywają w bioreaktorach tacowych, natomiast w sposób ciągły pod tą warstwą przepływa podłoże hodowlane (rys. 12 A),

2) wgłębne, w których pojedyncze komórki lub aglomeraty komórek drobnoustrojów są swobodnie zawieszane (rozproszone) w całej objętości podłoża hodowlanego (rys. 8, 9),

3) z unieruchomionymi komórkami na ruchomym nośniku, w których nośnik stanowi zawieszinę swobodnie zawieszoną (przemieszczającą się) w ciekłym podłożu hodowlanym (rys. 12 B, C),

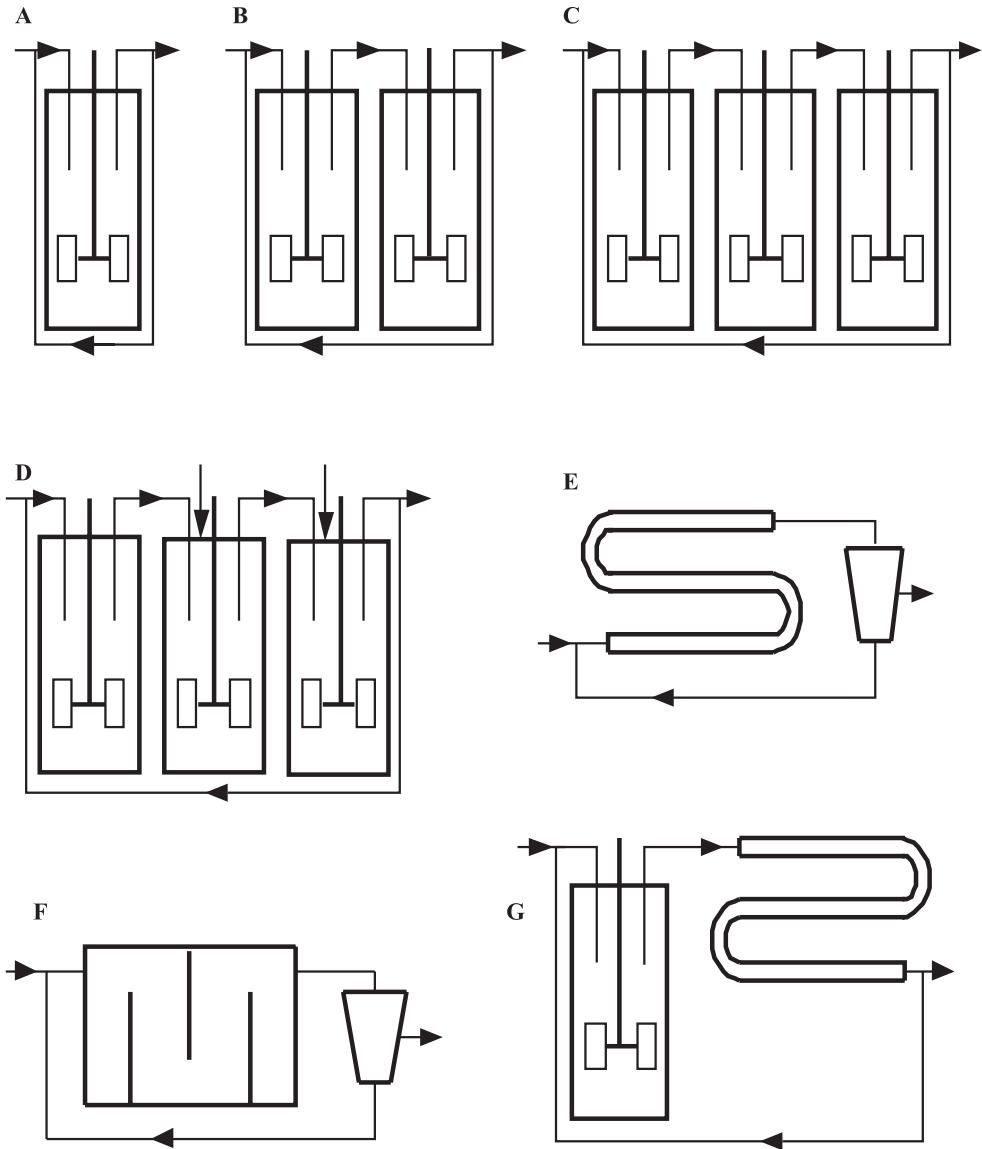
4) z unieruchomionymi komórkami na nieruchomym nośniku, w których nośnik jest zanurzony w podłożu, np. nieruchome wkłady nośnika, nośnik otoczony membraną (rys. 12 D) lub porowaty, o luźnej strukturze nośnik ciągle zraszany podłożem (rys. 12 E).

Ze względu na sposób kontroli szybkości zasilania hodowla ciągła może być prowadzona przy [Pietkiewicz 1996; Wieczorek, Michalski 1976]:

1) stałej szybkości rozcieńczenia (zasada chemostatu). W procesie ciągłym prowadzonym na podstawie zasady chemostatu podłoże zasilające doprowadza się do hodowli ze stałym, z góry określonym strumieniem objętości. Stężenie biomasy i szybkość wzrostu limitowane są najczęściej stężeniem jednego składnika lub kilku składników podłoża, przy równoczesnym nadmiarze pozostałych składników, i zależą od szybkości rozcieńczenia;

2) stałym stężeniu biomasy (zasada turbidostatu). W takiej hodowli stałe stężenie biomasy jest utrzymywane przez zmniejszanie lub zwiększanie szybkości dopływu podłoża zasilającego do bioreaktora;

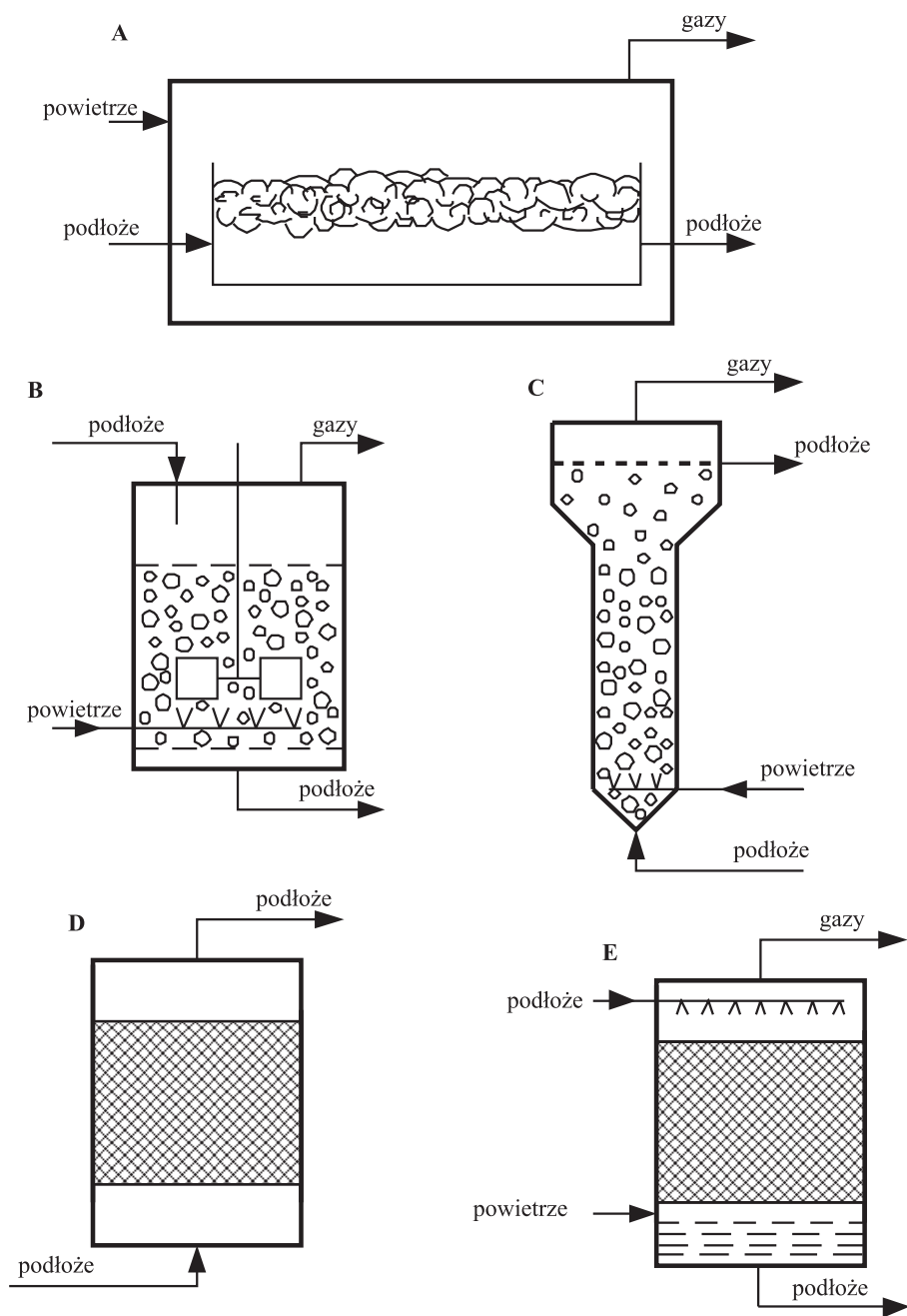
3) stałym stężeniu substratu (zasada nutristatu). Szybkość dopływu podłoża zasilającego jest regulowana automatycznie, tak aby zapewnić stałe stężenie substratu w podłożu hodowlanym, np. przez pomiar stężenia glukozy;



Rys. 11. Hodowle ciągłe prowadzone w układach zamkniętych z zawracaniem komórek.

A – jednostopniowym homogenicznym, B – dwustopniowym jednostrumieniowym homogenicznym, C – trójstopniowym jednostrumieniowym homogenicznym, D – trójstopniowym wielostrumieniowym homogenicznym, E – jednostrumieniowym heterogenicznym o przepływie tłokowym, F – jednostrumieniowym heterogenicznym, G – mieszanym dwustopniowym jednostrumieniowym z homogenicznym pierwszym bioreaktorem i heterogenicznym (o przepływie tłokowym) drugim bioreaktorem

Źródło: opracowanie własne.



Rys. 12. Jednostopniowe hodowle ciągłe z unieruchomionymi komórkami drobnoustrojów.
 A – powierzchniowa, B, C – na ruchomym nośniku, D – na nieruchomym nośniku zanurzonym
 w podłożu, E – na nieruchomym nośniku zraszonym podłożem

Źródło: opracowanie własne.

- 4) stałym stężeniu tlenu rozpuszczonego (zasada oksystatu);
- 5) stałym pH (zasada pH-statu);
- 6) stałym stężeniu nagromadzanego produktu (zasada produktstatu),
- 7) stałym stężeniu CO₂ (zasada CO₂-statu) itd.

7. Podsumowanie

W tym opracowaniu zaprezentowano i omówiono podział metod hodowli drobnoustrojów, biorąc pod uwagę: stan fizyczny podłoża hodowlanego, sposób rozproszenia lub unieruchomienia komórek drobnoustrojów i czas ich przebywania w podłożu, stopień wypełnienia bioreaktora podłożem na początku hodowli oraz ciągłość zasilania podłożem i sposób prowadzenia hodowli. Przedstawiono również schematy ideowe i krótką charakterystykę poszczególnych metod hodowli. Szczegółowa znajomość metod hodowli oraz ich zalet i wad umożliwi wybór lepszej metody prowadzenia bioprodukcji, gwarantującej uzyskanie dużej szybkości biosyntezy produktu i wysokiej efektywności. Wiele spośród omówionych metod hodowli drobnoustrojów stosowano w procesach hodowli biomasy drożdży piekarskich i paszowych oraz pleśni, głównie *Aspergillus niger*, w optymalizacji procesów biosyntezy kwasów organicznych, a zwłaszcza kwasu cytrynowego. Ta problematyka była przedmiotem szczegółowych, wieloletnich badań prowadzonych, m.in. przez autorów tego opracowania, w Instytucie Chemii i Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

Literatura

- Agrawal P., Koshy G., Ramseier M.: *An algorithm for operating a fed batch fermentor at optimum specific growth rate*, Biotechnol. Bioeng. 1989 nr 33, s. 115-125.
- Asenjo J.A., Sun W.H., Spencer J.L.: *Optimal control of batch process involving simultaneous enzymatic and microbial reactions*, Bioprocess Eng. 1996 nr 14(6), s. 323-329.
- Brauer H. (ed.): *Fundamentals of Biochemical Engineering*, [w:] *Biotechnology*, eds. H.J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1985, vol. 2.
- Bednarski W., Fiedurek J. (red.): *Podstawy biotechnologii przemysłowej*, WNT, Warszawa 2007.
- Bednarski W., Rejs A. (red.): *Biotechnologia żywności*, WNT, Warszawa 2001.
- Calcott P.H., Phil D. (eds.): *Continuous Culture of Cells*, Boca Raton-Florida, CRC Press, 1981, vol. 1.
- Chmiel A.: *Biotechnologia, Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa 1998.
- Dawson M.W., Maddox I.S., Boag I.F., Brooks J.D.: *Application of fed-batch culture to citric acid production by Aspergillus niger: the effects of dilution rate and dissolved oxygen tension*, Biotechnol. Bioeng. 1988 nr 32, s. 220-226.
- Durand A., Grajek W., Gervais P.: *The Intra-Dijon Process for the Single-cell Protein Production on Sugar-beet Pulp with Trichoderma viride TS*, [w:] *Food, Feed and Fuel from Biomass*, ed. D.S. Chahal, Oxford and IBH Publishing CO, New Delhi, Bombay, Calcutta 1988.

- Eikmeier H., Rehm H.J.: *Production of citric acid with immobilized Aspergillus niger*, Microbiol. Biotechnol. 1984 nr 20, s. 365-370.
- Eikmeier H., Rehm H.J.: *Semicontinuous and continuous production of citric acid production of immobilized cells of Aspergillus niger*, Z. Naturforsch 1987 nr 42c, s. 408-413.
- Enfors S.O.: *Continuous and Fed-Batch Operation of Fermentation Processes*, [w:] *Bioprocess Engineering Course*, ed. M. Berovič, National Inst. of Chem., Ljubljana 1998, s. 90-127.
- Fiechter A.: *Batch and Continuous Culture of Microbial, Plant and Animal Cells*, [w:] *Biotechnology*, eds. H.J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, vol. 1, Weinheim 1981, s. 453-505.
- Gary K., Sharma C.B.: *Continuous production of citric acid by immobilized whole cells of Aspergillus niger*, J. Gen. Appl. Microbiol. 1992 nr 38, s. 605-615.
- Gąsiorek E.: *Badania nad biosyntezą kwasu cytrynowego metodą hodowli w podłożu stałym*, praca doktorska, AR-AE, Wrocław 1999.
- Krzystek L., Ledakowicz S.: *Mass and Energy Balance*, [w:] *Citric Acid Biotechnology*, eds. B. Kristiansen, M. Matthey, J. Linden, Taylor and Francis, London-Philadelphia 1999, s. 121-133.
- Lehmann K.K.: *Comparative Tests for Fermentations*, [w:] *Biotechnology*, eds. H.J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, vol. 2, Weinheim 1985, s. 607-626.
- Leśniak W., Stawicki S.: *Semi-continuous fermentation of citric acid by submerged fermentation*, „Acta Alimentaria Polonica” 1979 nr 5/29(4), s. 365-377.
- Leśniak W., Pietkiewicz J.J., Podgórski W., Gąsiorek E.: *Biosynteza kwasu cytrynowego metodą „solid state” – aspekty aparaturowe i technologiczne*, [w:] *VI Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa, Postępy Inżynierii Bioreaktorowej. Łódź '96*, Wyd. Kat. Inż. Bioprocessowej PŁ, Łódź 1996.
- Michalski H., Kopeć L.: *Zagadnienia projektowania wielostopniowych ciągłych procesów hodowli drobnoustrojów. Metody graficzne*, „Postępy Mikrobiologii” 1977 nr 16(3), s. 79-94.
- Moser A.: *Kinetics of Batch Fermentations*, [w:] *Biotechnology*, eds. H.J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1985a, vol. 2, s. 243-283.
- Moser A.: *Continuous Cultivation*, [w:] *Biotechnology*, eds. H.J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, vol. 2, Weinheim 1985b, s. 285-309.
- Moser A.: *Special Cultivation Techniques*, [w:] *Biotechnology*, eds. H.J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, vol. 2, Weinheim 1985c, s. 311-347.
- Pietkiewicz J.J.: *Biosynteza kwasu cytrynowego przez Aspergillus niger w warunkach jedno- i wielostopniowych hodowli ciągłych*, Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu nr 927(147), *Monografie i opracowania*, AE, Wrocław 2002.
- Pietkiewicz J.J.: *Ogólna technologia żywności. Procesy biotechnologiczne i membranowe*, AE, Wrocław 1996.
- Pietkiewicz J.J., Leśniak W.: *Metody automatycznej regulacji dopływu substratu w procesie tlenowej hodowli drobnoustrojów*, „Postępy Mikrobiologii” 1984 nr 23(1), s. 91-101.
- Pietkiewicz J.J., Leśniak W.: *Biotechnologiczne aspekty budowy bioreaktorów pilotowych*, Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu nr 833(6), *Technologia*, AE, Wrocław 2000, s. 27-38.
- Rymowicz W.: *Biosynteza kwasu cytrynowego z glukozy przez wolne i immobilizowane komórki drożdży Yarrowia lipolytica w systemach ciągłych*, Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu nr 329, *Rozprawy*, 1998.
- Szewczyk K.W.: *Technologia biochemiczna*, Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1995.
- Whitaker A.: *Fed-batch culture*, Process Biochem. 1980 nr 5, s. 10-15, 32.
- Wieczorek A., Michalski H.: *Wybrane zagadnienia hodowli ciągłej drobnoustrojów*, „Postępy Mikrobiologii” nr 15(1), s. 71-94.
- Zagrodzki S., Wysocki S., Sz wajcowska K., Zagrodzki S.M.: *Ciągła metoda powierzchniowej fermentacji cytrynowej*, „Roczniki Technologii i Chemii Żywności” 1969 nr 15, s. 1-12.

REVIEW OF THE AEROBIC MICROORGANISMS CULTURE METHODS APPLIED IN BIOSYNTHESIS PROCESSES

Summary

The paper presents classification of the aerobic microorganisms culture methods. The culture method is a primary parameter of a bioprocess' efficiency. To the main criteria of this classification belong physical state of culture medium, biomass dispersion or immobilization, method of substrate feed, volume of culture medium in bioreactor, and culture techniques. Microorganisms culture methods applied in biomass' biosynthesis or in production of bioproducts are characterized in this paper as well. The ordered knowledge of bioprocess' method enables a suitable choice of biotechnology and assures optimal use of the microorganisms.