

Małgorzata KAŁUŻA, Zygmunt SADOWSKI

e-mail: m.e.kaluza@pwr.wroc.pl

Zakład Inżynierii Chemicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Optymalizacja bioprodukcji kwasu cytrynowego w hodowli wgłębnej *Aspergillus niger* prowadzonej w obecności Tweenu 80

Wstęp

Kwas cytrynowy jest wykorzystywany m.in. w przemyśle spożywczym, olejarstwie, farmaceutycznym i metalurgicznym [Podgórski i in., 2006]. Najbardziej rozpowszechnioną metodą otrzymywania ww. związku jest wgłębna hodowla grzybów *Aspergillus niger*. Efektywność procesu fermentacji cytrynowej zależy od wielu czynników, m.in. kompozycji podłoża hodowlanego, własności użytego szczepu oraz warunków prowadzenia biosyntezy [Papaigianni, 2007]. Dla uzyskania wysokiej wydajności fermentacji cytrynowej stosuje się podłoża o składzie zdefiniowanym pod kątem nadprodukcji kwasu cytrynowego. Wyniki niektórych eksperymentów dowodzą, że stosowanie ww. podłoży nie zawsze skutkuje korzystnym efektem fermentacji cytrynowej [Pawłowska, 2012]. Procesy mikrobiologiczne można intensyfikować poprzez wprowadzanie do podłoża stymulatorów biosyntezy pożądanego metabolitu [Lee, 2012]. Do potencjalnych stymulatorów procesu fermentacji cytrynowej należą m.in. niejonowe surfaktanty [Nemec i in., 2002]. Wprowadzenie nowej substancji do podłoża hodowlanego powoduje destrukcję jego kontrolnych właściwości [Podgórski i in., 2006]. Dla uzyskania pożądanego efektu biosyntezy, prowadzonej w obecności wybranego stymulatora, konieczne jest więc ponowne ustalenie składu podłoża i określenie najkorzystniejszych warunków procesowych. W naukach biologiczno-chemicznych, jedną z najczęściej stosowanych metod optymalizacyjnych jest zaproponowana przez Boxa i Wilsona [1951] metoda czynnikowo-gradientowa. Wyniki wielu eksperymentów wskazują na przydatność ww. metody dla poprawy efektów procesów biotechnologicznych [Bialkowska i in., 2004; Romanowska i in., 2004].

Celem przeprowadzonych eksperymentów była maksymalizacja bioprodukcji kwasu cytrynowego w wgłębnych hodowlach *Aspergillus niger* prowadzonych w obecności Tweenu 80.

Materiały i metody

W prowadzonych eksperymentach wykorzystano szczep pleśni *Aspergillus niger* Ł0581 z nadprodukcją kwasu cytrynowego, pochodzący z Muzeum Czystych Kultur przy Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Jako podłoże bazowe użyto płynne podłoże mineralne o składzie [g/dm³ wody]: sacharoza – 100, NH₄NO₃ – 2,0, KH₂PO₄ – 0,2, MgSO₄ 7H₂O – 0,2, pH – 4,5. W doświadczeniu wykorzystano surfaktant niejonowy Tween 80.

Każde doświadczenie prowadzono w kolbach okrągłych płaskodennych o poj. 500 cm³, w stałych warunkach procesu – temp. 28°C, prędkość wytrząsania 110 obr/min, napełnienie kolby podłożem – 200 cm³. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Stężenie kwasu cytrynowego w hodowlach oznaczano metodą kolorymetryczną Furtha – Herrmanna [1935].

W celu maksymalizacji bioprodukcji kwasu cytrynowego wykonano eksperyment czynnikowo-gradientowy oparty się na pracy Boxa i Wilsona [1951]. Stanowiła ona podwalinę do opracowania metody optymalizacji określanej jako RSM (*Response Surface Methodology*). Obecnie jest to najbardziej rozpowszechniona metoda interpretacji badań zmierzających do optymalizacji procesów fermentacyjnych [Liu i in., 2007].

Optymalizację czynnikową oparto na planie eksperymentu typu 2^S (S – liczba optymalizowanych parametrów). Po wyborze parametrów do optymalizacji zbudowano macierz planowania dla eksperymentu dwupoziomowego. Dla każdej zmiennej przyjęto wartości na dwóch poziomach górnym i dolnym:

$$Xs^- = Xs^0 - \Delta Xs \quad (1)$$

$$Xs^+ = Xs^0 + \Delta Xs \quad (2)$$

gdzie: S – liczba parametrów optymalizowanych, S = 1, 2, 3, ..., n, X – optymalizowany parametr, (+/-) – górna (Xs⁺) bądź dolna (Xs⁻) wartość optymalizowanego parametru, zależnie od znaku przypadającego na daną próbę według macierzy.

Na podstawie wyników eksperymentu czynnikowego oszacowano wartości współczynników regresji (k_i) w modelu liniowym. Pozwoliło to określić wielkość wpływu poszczególnych parametrów na wyniki procesu fermentacji cytrynowej:

$$k_i = \frac{1}{N} (+/- y_1 + /- y_2 + /- ... y_N) \quad (3)$$

gdzie: N – liczba wariantów optymalizowanych, (+/-) – dodatnia lub ujemna wartość zgodnie ze znakiem przypadającym na daną próbę według macierzy, y₁, y₂, ..., y_N – odpowiedź obiektu.

Wartości współczynników regresji posłużyły do oszacowania długości skoków, te zaś pozwoliły na zdefiniowanie wariantów eksperymentu gradientowego.

Wyniki badań i ich analiza

Wyniki wstępnych eksperymentów wykazały że zastosowanie podłoża bazowego o składzie określanym jako optymalny dla nadprodukcji kwasu cytrynowego skutkuje niewielką efektywnością procesu fermentacji. W hodowlach prowadzonych na ww. podłożu najwyższa zanotowana wartość średniego stężenia kwasu cytrynowego wyniosła zaledwie 18,02 g/dm³. Oszacowana wydajność produktu w stosunku do substratu była niewielka, wartość współczynnika Y_{PS} wyniosła 0,12.

W celu intensyfikacji bioprodukcji kwasu cytrynowego i poprawy wydajności prowadzonej fermentacji zdecydowano się na wykorzystanie wybranych niejonowych surfaktantów jako potencjalnych stymulatorów biosyntezy ww. metabolitu. W badaniach użyto surfaktantów z grupy Triton, Tween i Span. Najlepsze efekty procesu fermentacji dotyczyły Tweenu 80, wówczas obserwowano ponad dwukrotny wzrost stężenia kwasu cytrynowego w stosunku do hodowli bazowych. Najwyższe średnie stężenie kwasu cytrynowego uzyskano z podłoży suplementowanych Tweenem 80 w ilości 1 g/dm³ i wyniosło 47,01 g/dm³. W świetle uzyskanych wyników zdecydowano się na ponowne zdefiniowanie składu podłoża uzupełnionego o Tween 80 oraz ustaleniu najkorzystniejszych warunków procesu biosyntezy kwasu cytrynowego.

Przyjęto, że proces bioprodukcji kwasu cytrynowego w podłożu z dodatkiem Tweenu 80 zależy od wartości siedmiu wyjściowych parametrów hodowli: stężenia sacharozy, NH₄NO₃, KH₂PO₄, Tweenu 80, od wyjściowego pH podłoża, stężenia inicjalnego inokulum i czasu procesu. Dla każdego parametru wyznaczono wartość dolnego i górnego poziomu optymalizowanej wielkości dodając lub odejmując przyjęty w sposób arbitralny przyrost standardowy. Wartości w centralnym punkcie planu (Xs⁰) odpowiadały tym wartościom parametrów, przy których w toku poprzednich doświadczeń obserwowano najkorzystniejsze efekty procesu fermentacji (Tab. 1).

Następnie zaprojektowano macierz planowania dla eksperymentu dwupoziomowego, czego wynikiem było uzyskanie 32 wariantów kompozycji podłoża i warunków procesu biosyntezy. Na podstawie uzyskanej macierzy wariantów przeprowadzono hodowlę szczepu Ł0581. Najwyższe średnie stężenie kwasu cytrynowego 59,31 g/dm³ otrzymano z hodowli prowadzonych według wariantu nr 13, któremu odpowiadały następujące wartości optymalizowanych parametrów: X₁ – 100 g/dm³,

Tab.1. Wykaz parametrów poddanych optymalizacji czynnikowej

Symbol optymalizowanego parametru	Nazwa optymalizowanego parametru	Wielkość optymalizowanego parametru			
		X_0	ΔX	$X_{g\acute{o}rne}$	$X_{d\acute{o}lne}$
Składniki podłoża					
X_1	Sacharoza [g/dm ³]	150	50	200	100
X_2	NH ₄ NO ₃ [g/dm ³]	2	1	3	1
X_3	KH ₂ PO ₄ [g/dm ³]	0,2	0,15	0,35	0,05
X_4	Tween 80 [g/dm ³]	1	0,5	1,5	0,5
Warunki procesu					
X_5	pH	4,5	2	6,5	2,5
X_6	Gęstość inokulum [%w/v]	4	2,5	6,5	1,5
X_7	Czas procesu [godz.]	120	48	168	72

X_0 – punkt centralny planu, ΔX – przyrost standardowy

$X_{g\acute{o}rne}$, $X_{d\acute{o}lne}$ – przyjmowane wartości wejść na dwóch poziomach górnym i dolnym

X_2 – 1 g/dm³, X_3 – 0,35 g/dm³, X_4 – 1,5 g/dm³, X_5 – 2,5, X_6 – 1,5 % w/v, X_7 – 168 godz. Uzyskane stężenie było o 12,3 g/dm³ wyższe od tego, które notowano w hodowlach bazowych. Dane uzyskane w wyniku optymalizacji czynnikowej posłużyły w eksperymencie gradientowym do wyznaczenia współczynników regresji (k_i), określających liniowy wpływ badanych parametrów na proces biosyntezy kwasu cytrynowego (Tab. 2).

Tab.2. Oszacowane wartości współczynników regresji (k_i) i długości skoków

Symbol optymalizowanego parametru	k_i	Długość skoku	Jednostka skoku
X_1	-2,452	-2,094	[g/dm ³]
X_2	-4,861	-0,083	[g/dm ³]
X_3	5,396	0,013	[g/dm ³]
X_4	5,855	0,05	[g/dm ³]
X_5	0,29	0,009	–
X_6	-3,703	-0,158	[% w/v]
X_7	1,161	0,951	[godz.]

Największa co do wartości bezwzględnej wartość współczynnika korelacji dotyczyła parametru X_4 . Parametr ten stanowił podstawę do wyznaczenia wartości skoku jednostkowego w eksperymencie gradientowym. Na podstawie uzyskanych wyników zbudowano plan eksperymentu gradientowego złożonego z 10 wariantów składu podłoża i warunków procesu biosyntezy kwasu cytrynowego (Tab. 3).

Punktami odniesienia dla powyższego planu były wartości parametrów w centralnym punkcie planu czynnikowego (wariant 0 w tab. 3 odpowiadał wariantowi X_0 w tab. 1).

Tab.3. Macierz eksperymentu gradientowego oraz wyniki procesu biosyntezy kwasu cytrynowego prowadzonego według poszczególnych wariantów

Wariant hodowli	Symbol optymalizowanego parametru							Średnie stężenie kw. cytr. [g/dm ³]
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	
0	150	2	0,2	1	4,5	4	120	47,01
1	147,906	1,917	0,213	1,05	4,509	3,842	120,951	40,58
2	145,812	1,834	0,226	1,1	4,518	3,684	121,902	45,36
3	143,718	1,751	0,239	1,15	4,527	3,526	122,853	54,05
4	141,624	1,668	0,252	1,2	4,536	3,368	123,804	55,15
5	139,53	1,585	0,265	1,25	4,545	3,21	124,755	61,43
6	137,436	1,502	0,278	1,3	4,554	3,052	125,706	66,37
7	135,342	1,419	0,291	1,35	4,563	2,894	126,657	50,49
8	133,248	1,336	0,304	1,4	4,572	2,736	127,608	31,83
9	131,154	1,253	0,317	1,45	4,581	2,578	128,559	17,32
10	129,06	1,17	0,33	1,5	4,59	2,42	129,51	10,98

Najwyższe średnie stężenie kwasu cytrynowego otrzymano prowadząc hodowlę *Aspergillus niger* według wariantu nr 6 i wyniosło 66,37 g/dm³ (Tab. 3).

Przebieg po gradiencie charakteryzuje wyraźne maksimum. Uznano więc, że dla badanych parametrów optymalizacja została zakończona.

Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzona optymalizacja pozwoliła na maksymalizację efektów fermentacji cytrynowej prowadzonej w podłożu z dodatkiem *Tweenu 80*. Średnie stężenie kwasu cytrynowego, w wariacie nr 6 eksperymentu gradientowego, było o 19,36 g/dm³ wyższe od tego, które dotyczyło hodowli prowadzonych według wartości parametrów w centralnym punkcie planu czynnikowego.

Uzyskane wyniki pozwoliły na ponowne zdefiniowanie składu podłoża hodowlanego i ustalenie warunków procesowych dla otrzymania korzystnych efektów fermentacji cytrynowej prowadzonej z udziałem *Aspergillus niger* Ł0581. Otrzymane rezultaty wykazały, że w odniesieniu do wyjściowych wartości parametrów (centralny punkt planu X_0) w nowym podłożu należy zmniejszyć stężenie sacharozy oraz NH₄NO₃. Należy również zwiększyć stężenie *Tweenu 80* i KH₂PO₄ oraz obniżyć stężenie inicjalnego inokulum. Dla uzyskania pożądanego efektów procesu biosyntezy należy również minimalnie zwiększyć początkową wartość *pH* i wydłużyć czas procesu do ok. 126 godzin.

Największe średnie stężenie kwasu cytrynowego dotyczyło hodowli o obniżonej w stosunku do hodowli wyjściowych (centralny punkt planu X_0) zawartości sacharozy w pożywkach (Tab. 3). Ze względu na ilość, biały cukier jest najdroższym składnikiem użytego medium hodowlanego. Wyniki optymalizacji wykazały, że dla uzyskania najlepszych efektów fermentacji konieczne jest obniżenie zawartości ww. cukru w użytym podłożu. Z ekonomicznego punktu widzenia zjawisko to jest bardzo korzystne i może mieć wpływ na obniżenie kosztów procesu fermentacji cytrynowej prowadzonej z wykorzystaniem nowo zdefiniowanego podłoża.

Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność metody *Boxa – Wilsona* dla maksymalizacji bioprodukcji kwasu cytrynowego we wglębnych hodowlach grzybów pleśniowych *Aspergillus niger*.

LITERATURA

- Białkowska B., Cieśliński H., Makowski K., Turkiewicz M., 2004. Optymalizacja biosyntezy antarktycznej β -galaktozydazy. *Biotech.*, 3, 25-35
- Box G.F., Wilson K.B., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc.: Series B*, 13, 1-45
- Furth O., Herrmann H., 1935. Farbreaktionen der Weinsäure Citronensäure und Aconitinsäure. *Biochem. Zeit.*, 280, 57-448
- Lee J-H., Choi J-G., Kim Y-S., Kim K-R., Kim S-W., Oh D-K., 2012. Enhancement of retinal production by supplementing the surfactant Span 80 using metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, 113, 461-466. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.020
- Liu C.Q., Chen Q.H., Tang B., Ruan H., He G. Q., 2007. Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of alpha-galactosidase in solid-state fermentation. *Lett. App.Microbiol.*, 45, 206-212. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02173.x
- Nemec T., Jerneck K., 2002. Influence of Tween 80 on lipid metabolism of an *Aspergillus niger* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 101, 229-238. DOI: 10.1385/ABAB:101:3:229
- Papagianni M., 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotech. Adv.*, 25, 244-263. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.01.002
- Pawłowska A., 2012. Bioługowanie laterytowych rud niklu z wykorzystaniem grzybów z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*. Praca doktorska, Wyd. Chem., Pol. Wrocław, 66-67
- Podgórski W., Gąsiorek E., Leśniak W., 2006. Produkty uboczne z przerobu buraków cukrowych. *Inż. Rol.*, 4, 103-109
- Romanowska I., Janowska J., Bielecki S., 2004. Optymalizacja procesu nagromadzenia ksylanazy przez szczep *Aspergillus niger* ITB-90. *Biotech.*, 3, 13-23

Badania zostały zrealizowane w ramach Projektu Badawczego Promotorskiego nr 1303/B/H03/201/40.