

IZABELA MUSIAŁ
WALDEMAR RYMOWICZ

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Dobór szczepów *Aspergillus niger* do biosyntezy kwasu szczawiowego z frakcji glicerynowej

Wprowadzenie

W skali przemysłowej kwas szczawiowy produkowany jest tylko metodą chemiczną. Ponieważ procesy te generują duże ilości toksycznych odpadów ciągle poszukuje się nowych technologii otrzymywania tego kwasu. Obiecującą alternatywą dla procesów chemicznych są metody biotechnologiczne. W zależności od stosowanego źródła węgla oraz warunków prowadzenia hodowli grzyby *A. niger* produkują z cukrów różne kwasy organiczne, w tym kwas szczawiowy. W pH obojętnym i przy nadmiarze fosforu dochodzi u *A. niger* do indukcji hydrolazy szczawiooctanowej, która rozkłada szczawiooctan do kwasu szczawiowego i octowego [1]. W pH kwaśnym i przy deficycie fosforu głównym produktem metabolizmu *A. niger* jest kwas cytrynowy. W opisywanych procesach biosyntezy kwasu szczawiowego najczęściej stosowane są substraty węglowodanowe, takie jak sacharoza, glukoza, laktoza oraz surowce odpadowe z przemysłu spożywczego i z rolnictwa zawierające różne cukry, takie jak melasa buraczana, serwatka czy słodkie ziemniaki [2–4]. Spośród substratów węglowodanowych najbardziej obiecującym jest laktoza. Szczep *A. niger* 1120 w podłożu z laktozą, w pH powyżej 6, produkował najwięcej kwasu szczawiowego do $41 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, z najwyższą wydajnością produkcji tego kwasu $0,54 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ [4, 5].

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że zastosowanie substratów lipidowych do biosyntezy kwasu szczawiowego przez wyselekcjonowany szczep *A. niger* XP pozwoliło na uzyskanie wyższej koncentracji kwasu do $68 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w podłożu o pH 4,0. Ponadto, produktywność i wydajność kwasu szczawiowego z substratów tłuszczowych była znacznie wyższa w porównaniu do procesów prowadzonych w podłożach z dodatkiem sacharydów [6–9]. W dostępnej literaturze brak jest publikacji związanych z zagadnieniem produkcji kwasu szczawiowego z frakcji glicerynowej. Odpadowa frakcja glicerynowa powstaje w procesie produkcji biodiesla z olejów roślinnych i stanowi ok. 10–20% masy użytego oleju [10].

Celem pracy było wyselekcjonowanie szczepu *A. niger* do wydajnej i efektywnej produkcji kwasu szczawiowego z frakcji glicerynowej.

Materiały i metody badań

W badaniach wykorzystywano następujące szczepy *A. niger*: dwa mutanty UV 13/33 i 13/32 pochodzące z *Uniwersytetu Przyrodniczego* w Lublinie; cztery UV mutanty CH11/21, IBR6/2, MB i XP pochodzących z *Uniwersytetu Ekonomicznego* we Wrocławiu; dwa szczepy dzikiego typu F12 i CW pochodzące z *Uniwersytetu Przyrodniczego* we Wrocławiu. W badaniach, jako substrat stosowano frakcję glicerynową, która pochodziła z instalacji pilotowej produkcji biopaliw

z oleju rzepakowego utworzonej na *Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego*. Zawartość glicerolu w otrzymanej odpadowej frakcji glicerynowej wynosiła około 45% (w/w), resztę stanowiły kwasy tłuszczowe oraz estry etylowe i mydła. Podłoże produkcyjne zawierało [g]: frakcję glicerynową – 50, KH_2PO_4 – 0,25; NH_4NO_3 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 i SPAN 20–0,75 w 1 dm^3 wody wodociągowej. Hodowle produkcyjne prowadzono przez 7 dni w 5-litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III firmy *New Brunswick* zawierającym $2,5 \text{ dm}^3$ podłoża produkcyjnego, przy szybkości mieszania 500 rpm, szybkości napowietrzania 1 vvm i pH 4,0. Stężenie glicerolu, kwasów szczawiowego i cytrynowego oznaczano metodą HPLC. Biomasa i kwasy tłuszczowe oznaczano metodą wagową.

Omówienie i dyskusja wyników

Proces biosyntezy kwasu szczawiowego z frakcji glicerynowej z użyciem różnych szczepów *A. niger* przeprowadzono w 7-dobowych hodowlach periodycznych w warunkach obniżonego pH 4,0.

Wszystkie szczepy *A. niger* produkowały kwas szczawiowy, jednak z różną dynamiką, wydajnością i czystością procesu, co obrazuje tablica 1. Kwas szczawiowy stanowił główny produkt biosyntezy we wszystkich hodowlach. Jego zawartość w podłożu, po zakończeniu procesu biosyntezy, wahała się od 28,4 do $48,7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Szczepy XP i 13/33 produkowały największe ilości kwasu szczawiowego, powyżej $48 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tak wysokie stężenia produktu nie odnotowano w hodowlach *A. niger* w podłożach z węglowodanami. *Bohlmann* i wsp. [5] uzyskali $41,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu szczawiowego, w 13-dobowej hodowli szczepu *A. niger* 1120, w podłożu serwatkowym, które zawierało 12% laktozy. *Rymowicz* i *Lenart* [6], którzy prowadzili proces biosyntezy kwasu szczawiowego w podłożu zawierającym $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ porafinacyjnych kwasów tłuszczowych, otrzymali $68,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu w hodowli ze szczepem *A. niger* XP. Jest to najwyższe, opisane w literaturze, stężenie kwasu szczawiowego otrzymanego na drodze biologicznej. W podłożach zawierających lipidy szczepy *A. niger* produkowały nieznaczne ilości ubocznego kwasu cytrynowego, poniżej $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [6, 8, 9]. Czystość fermentacji w procesach, w których stosowano substraty węglowodanowe, a w szczególności sacharozę, była ze względu na produkcję ubocznego kwasu glukonowego i cytrynowego bardzo niska. Według *Strasser* i wsp. [3] i *Cameselle* i wsp. [11] ilość kwasu cytrynowego i glukonowego była odpowiednio, w zakresie $3,6$ – $6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $32,9$ – $63 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. W niniejszej pracy, po zakończeniu hodowli mutantów XP i 13/33 oraz szczepu typu dzikiego CW w brzeczce nie było produktów ubocznych (Tabl. 1). Należy jednak zaznaczyć, że kwas cytrynowy pojawił się w trakcie

hodowli szczepów 13/33 i CW, w ilości nie przekraczającej $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, ale został zutyliczowany w trakcie procesu. Duże ilości ubocznego kwasu cytrynowego odnotowano w hodowli z udziałem szczepu IBR 6/2, ($14,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Inne szczepy *A. niger* produkowały kwas cytrynowy w niewielkich ilościach od 1,4 do $4,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

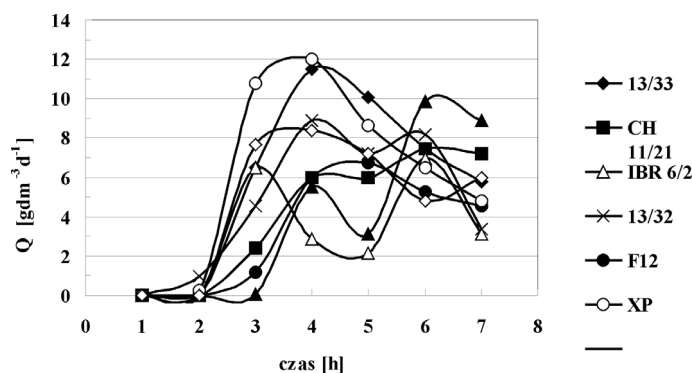
Badane szczepy *A. niger* produkowały kwas szczawiowy z wydajnością od $0,59 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ do $0,95 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Tabl. 1). Szczep *A. niger* 13/33 wyróżniał się wysoką wydajnością produkcji kwasu szczawiowego, zarówno liczoną w stosunku do dodanego jak i zużytego substratu, odpowiednio $0,93 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ i $0,95 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Według innych autorów wydajność produkcji kwasu szczawiowego z lipidów znacznie przekracza wartość $1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ [6, 8, 9], natomiast w hodowlach na cukrach wydajność kwasu szczawiowego rzadko osiąga $0,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ [5, 4].

W badaniach własnych objętościowa szybkość produkcji kwasu szczawiowego, jeden z najważniejszych parametrów hodowlanych, wynosiła od $4,37 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ w hodowli szczepu F12 do $6,96 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ w hodowli szczepów XP i 13/33 (Tabl. 1) i była niższa niż w hodowlach prowadzonych w podłożach z lipidami, gdzie przekraczała $9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ [6, 8] i była zbliżona do wielkości uzyskiwanych w procesach z węglowodanami, gdzie osiągała wartości od $3,4$ do $6,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ [3–5, 11]. Rys. 1 przedstawia zmiany szybkości objętościowej produkcji kwasu szczawiowego w czasie hodowli okresowych badanych szczepów *A. niger*. Najwyższe wartości tego parametru $10,8$ i $12,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ stwierdzono w 3 i 4 dniu hodowli szczepu XP, w kolejnych dniach jego wartość obniżyła się do $8,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Niewiele niższą produktywność uzyskano w hodowli szczepu 13/33, jej wartość w 4 dniu procesu wynosiła $11,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Rymowicz i Lenart [6] wykazali, że pomiędzy 2 a 4 dniem procesu produkcji kwasu szczawiowego z surowego oleju rzepakowego i porafinacyjnych kwasów

Tablica 1
Charakterystyka procesu produkcji kwasu szczawiowego przez różne szczepy *A. niger* w hodowlach okresowych w podłożu zawierającym $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ frakcji glicerynowej i pH 4,0

| Szczepy <i>A. niger</i> | Biomasa [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] | Kwas szczawiowy [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] | Kwas cytrynowy [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] | Y_C [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] | Y_K [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] | Q [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$] |
|-------------------------|---|---|--|---|---|---|
| XP | 15,3 | 48,7 | 0 | 0,88 | 0,88 | 6,96 |
| 13/33 | 25,7 | 48,3 | 0 | 0,93 | 0,95 | 6,90 |
| IBR 6/2 | 10,1 | 36,2 | 14,5 | 0,74 | 0,82 | 5,17 |
| CW | 21,7 | 32,3 | 0 | 0,67 | 0,76 | 4,61 |
| F 12 | 14,9 | 30,6 | 1,6 | 0,59 | 0,59 | 4,37 |
| 13/32 | 14,1 | 35,9 | 1,4 | 0,65 | 0,73 | 5,17 |
| CH 11/21 | 20,3 | 28,4 | 4,9 | 0,64 | 0,64 | 4,61 |
| MB | 10,7 | 39,5 | 4,4 | 0,70 | 0,76 | 5,64 |

Y_C , [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] wydajność produkcji kwasu szczawiowego w stosunku do dodanego substratu
 Y_K , [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] wydajność produkcji kwasu szczawiowego w stosunku do zużytego substratu
 Q , [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$] szybkość objętościowa produkcji kwasu szczawiowego



Rys. 1. Zmiany szybkości objętościowej produkcji kwasu szczawiowego (Q) w czasie hodowli okresowych różnych szczepów *A. niger* w podłożu zawierającym $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ frakcji glicerynowej i pH 4,0

tłuszczowych szybkość objętościowa wynosiła 12 – $16 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że surowa frakcja glicerynowa, która nie była poddana żadnym procesom oczyszczania, jest dobrym źródłem węgla i energii dla procesu biosyntezy kwasu szczawiowego przez grzyby *A. niger*. Spośród ośmiu badanych szczepów *A. niger*, dwa szczepy 13/33 i XP wyróżniały się wysoką dynamiką i wydajnością produkcji kwasu szczawiowego. Jako producenta kwasu szczawiowego z frakcji glicerynowej wybrano szczep *A. niger* XP. Szczep 13/33 został uznany za mniej użyteczny ze względu na powstający w trakcie biosyntezy produkt uboczny, jakim jest kwas cytrynowy. Wytwarzanie szczepu producentkiego daje podstawy do dalszych badań nad technologią produkcji kwasu szczawiowego z frakcji glicerynowej. Wykorzystywanie na przemysłową skalę odpadów z produkcji biodiesla, jako substratu do produkcji kwasu szczawiowego, może przynieść korzyści zarówno ekonomiczne jak i ekologiczne.

LITERATURA

1. C. Kubicek, G. Schrefler-Kunar, W. Wohrer, M. Rohr: Appl. Environ. Microbiol., 3, 633, (1988).
2. S. Leangon, I.S. Maddox, J.D. Brooks: World J. Microbiol. Biotechnol., 15, 493, (1999).
3. H. Strasser, W. Burgstaller, F. Schinner: FEMS Microbiol. Lett., 119, 365, (1994).
4. R. Santoro, C. Cameselle, S. Rodriguez-Couto, A. Sanroman: Bioprocess Eng., 20, 1, (1999).
5. J.T. Bohlmann, C. Cameselle, M.J. Nunez, J.M. Lema: Bioprocess Eng., 19, 337, (1998).
6. W. Rymowicz, D. Lenart: Biotechnol. Lett., 25, 12, 955, (2003).
7. W. Rymowicz, D. Lenart: Electr. J. Pol. Agricult. Univ., Biotechnol., 7, 2, art.01, (2004).
8. W. Rymowicz, D. Lenart: Electr. J. Pol. Agricult. Univ., Biotechnol., 7, 2, art.03, (2004).
9. I. Musial, W. Rymowicz, D. Witkowska: Chem. Paper, 60(5), 388, (2006).
10. N. Pachauri, B. He: Americ. Soc. Agric. Biol. Engin. ASABE, Paper No 066223, 2, (2006).
11. C. Cameselle, J.T. Bohlmann, M.J. Nunez, J.M. Lema: Bioprocess Eng., 19, 247, (1998).