

IZABELA MUSIAŁ  
WALDEMAR RYMOWICZ

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

HELENA KAUTOLA

HAMK University of Applied Sciences, Hameenlinna, Finland

# Wpływ składników podłoża na produkcję kwasu itakonowego przez *Aspergillus terreus* z glicerolu

## Wprowadzenie

Kwas itakonowy (KI) powszechnie jest wykorzystywany w przemysłowej produkcji żywic, poliestrów i plastików. Jego roczna produkcja wynosi około 15 tys. ton. Grzyby z gatunku *Aspergillus terreus* są najlepszym producentem kwasu itakonowego z glukozy, fruktozy, ksylozy, melasy i hydrolizatów skrobiowych [1–3]. W skali przemysłowej KI produkowany jest z melasy lub glukozy przez wyselekcjonowane szczepy *A. terreus* lub *A. itaconicus* w warunkach limitacji wzrostu fosforem. W procesie biosyntezy tego kwasu z powodzeniem była wykorzystana także skrobia kukurydziana i odpady z przemysłu owocowego [4, 5, 6]. Nieliczne publikacje opisują również produkcję KI z glicerolu. Gliceryna odpadowa, jako produkt uboczny w produkcji biodiesla, jest tanim, odnawialnym i atrakcyjnym surowcem, który może być wykorzystany do produkcji KI. Jarry i Seraudie [7] opatentowali produkcję KI przez szczep *A. terreus* z glicerolu i mieszaniny glicerolu z sacharozą. Lewinson i wsp. [8] opisali proces produkcji KI z glicerolu i różnych cukrów przez *Pseudozyma antarctica* NRR-LY-7808. Według tych badań, szczep *P. antarctica* NRR-LY-7808 produkował niewielkie ilości KI z glicerolu, laktozy, maltozy i sacharozy, natomiast z glukozy otrzymywano około  $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  kwasu w hodowlach wstrząsanych. Według licznych badań odpowiednia ilość N, P i Mg w podłożu produkcyjnym oraz zawartość mikroelementów takich jak Cu, Ca czy Zn ma znaczny wpływ na dynamikę produkcji i wydajność kwasu itakonowego przez wykorzystywane w tej biosyntezie grzyby z gatunku *A. terreus*. Także inne parametry hodowlane takie jak temperatura procesu, początkowe pH, szybkość napowietrzania i mieszania, wpływają w znaczny sposób na parametry technologiczne procesu biosyntezy KI przez grzyby z gatunku *A. terreus*.

Celem niniejszych badań była ocena wpływu wybranych składników podłoża produkcyjnego:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , na proces biosyntezy kwasu itakonowego z glicerolu przez szczep *A. terreus* FIN.

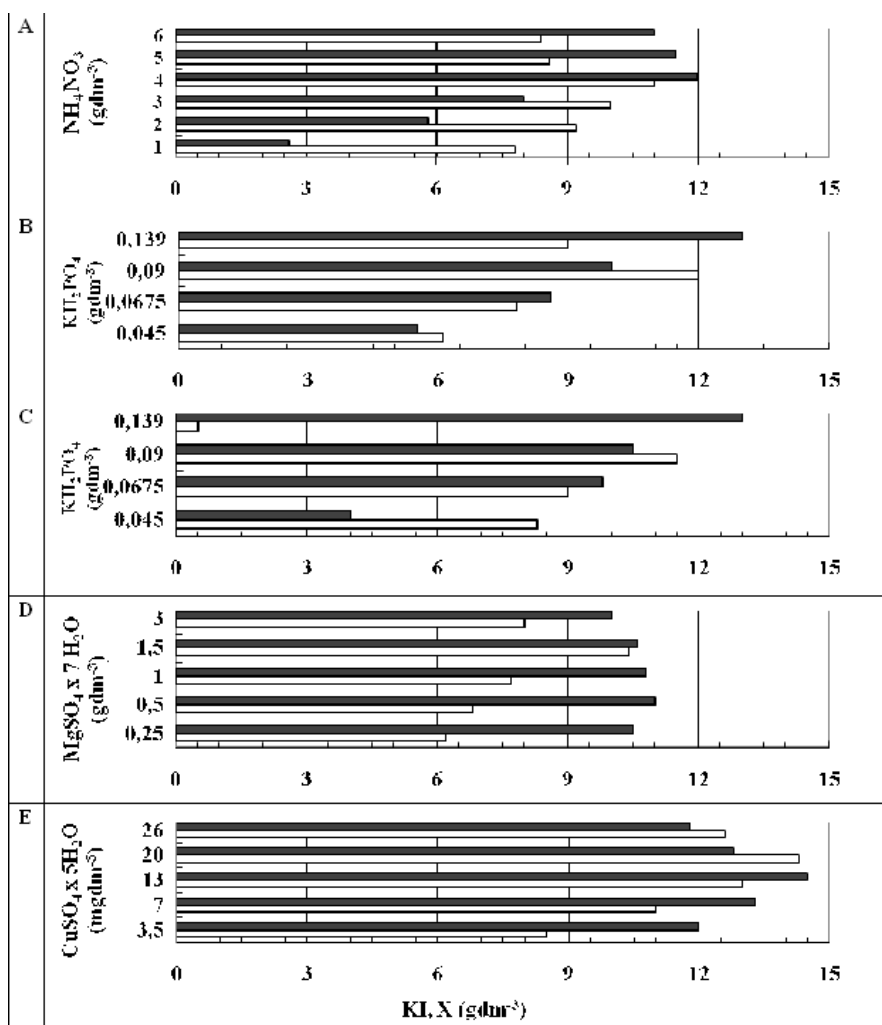
## Materiały i metody badań

W badaniach wykorzystano szczep *A. terreus* FIN pochodzący z HAMK University of Applied Science z Finlandii. Prowadzono 3 rodzaje hodowli: hodowle wstrząsane w kolbach stożkowych o poj.  $300 \text{ cm}^3$  zawierających  $50 \text{ cm}^3$  podłoża, w bioreaktorach barbotażowych o poj.  $350 \text{ cm}^3$ , zawierających

$300 \text{ cm}^3$  podłoża oraz w 10-litrowym bioreaktorze z mieszadłem typu AK-210, zawierającym  $3,5 \text{ dm}^3$  podłoża produkcyjnego. Hodowle prowadzono w temperaturze  $35^\circ\text{C}$  i początkowym  $\text{pH} = 3,5$ . Stężenie glicerolu i kwasu itakonowego oznaczano metodą HPLC. Biomagę oznaczano metodą wagową.

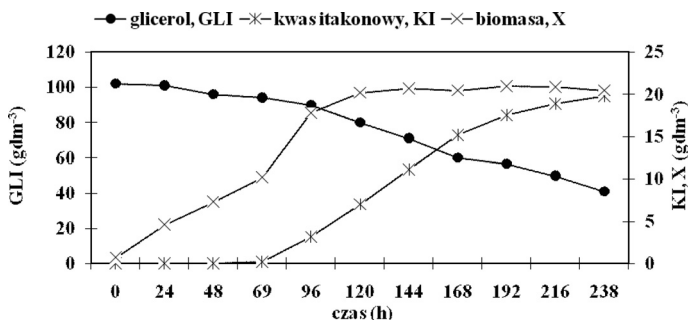
## Omówienie i dyskusja wyników

Oceniono wpływ składników podłoża produkcyjnego takich jak  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  na dynamikę i wydajność procesu produkcji KI z glicerolu przez szczep *A. terreus* FIN. Według licznych studiów odpowiednia ilość azotu, fosforu i magnezu oraz obecność miedzi, cynku lub wapnia w podłożu, ma istotny wpływ na produkcję KI i biomasy grzybni [1, 3, 8]. W 8-dobowych hodowlach wstrząsanych oceniono wpływ stężenia poszczególnych składników podłoża na podstawowe parametry technologiczne procesu w następujących zakresach:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  od 1 do  $6 \text{ gdm}^{-3}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  od  $0,045$  do  $0,139 \text{ gdm}^{-3}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  od  $0,25$  do  $3,0 \text{ gdm}^{-3}$  oraz  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  od  $3,5$  do  $26 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Jak można zobaczyć na rys. 1 wszystkie badane składniki podłoża, miały wpływ na ilość produkowanego KI i biomasy grzybni. Wzrost stężenia źródła N powodował wzrost biomasy i ilości KI. Najwyższe stężenie KI ( $11,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i biomasy ( $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) oznaczono w hodowli zawierającej  $4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  azotanu amonu. Wyższe ilości azotanu amonu powodowały obniżenie kwasu do  $8,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W przeprowadzonych hodowlach wstrząsanych i w bioreaktorze barbotażowym wykazano znaczny wpływ stężenia P na produkcję KI. Zarówno w hodowlach wstrząsanych jak i bioreaktorowych, najwyższe ilości KI uzyskano w podłożu zawierającym  $0,09 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  odpowiednio:  $12,0$  i  $11,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Wzrost stężenia P powodował wzrost poziomu biomasy z  $6,1$  do  $13 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W badanym zakresie stężenia siarczanu magnezu ( $0,25$ – $3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), poziom biomasy był podobny i wynosił  $10,5 \text{ gdm}^{-3}$ , a najwyższe ilości kwasu ( $10,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) otrzymano w hodowli zawierającej  $1,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  tej soli. Najwyższe stężenie KI ( $14,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) uzyskano w hodowli zawierającej  $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Większe ilości tej soli obniżały produkcję KI przez badany szczep *A. terreus* FIN do  $12,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Według licznych badań optymalny skład podłoża do efektywnej i wydajnej produkcji KI przez *A. terreus* jest bardzo zróżnicowany. Najczęściej stosowanym źródłem azotu w takich procesach jest  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  w ilościach od



Rys. 1. Wpływ stężenia: (A)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , (B)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (D)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i (E)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  na produkcję biomasy (X, ■) i kwasu itakonowego (KI, □) przez szczep *A. terreus* FIN podłożu z glicerolem w hodowlach wstrząsanych oraz wpływ stężenia  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na produkcję biomasy i kwasu itakonowego przez szczep *A. terreus* FIN podłożu z glicerolem w hodowlach w bioreaktorach barbotażowych

0,5 do 5,0  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [2, 9]. Jako źródło fosforu stosowany jest  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  w ilościach nie przekraczających 0,1  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Dwiarti i wsp. [10] optymalizując podłoże do produkcji KI z hydrolizatu skrobi sago w ogóle nie uwzględnili w składzie podłoża syntetycznego źródła fosforu. W zoptymalizowanym podłożu o składzie [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]: skrobia sago – 140; namok kukurydziany – 1,8;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,2 i  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2,9, uzyskali w hodowli bioreaktorowej 48,2  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  KI. Kautola i wsp. [1] badali



Rys. 2. Przebieg procesu biosyntezy kwasu itakonowego w hodowli wglębnej przez *A. terreus* FIN w podłożu z glicerolem

wpływ jonów metali takich jak: miedź, magnez i wapń na produkcję KI przez immobilizowane komórki *A. terreus*. Autorzy wykazali, że wzrost stężenia glukozy lub miedzi w podłożu wymaga wzrostu stężenia magnezu albo wapnia, a dodatek chlorku wapnia stymuluje produkcję KI. Wyznaczone przez nich optymalne stężenie  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 5  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  było znacznie wyższe niż uzyskane w prezentowanych badaniach, natomiast stężenie  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  było niższe i wynosiło 13  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ustalone w hodowlach wstrząsanych optymalne dawki wybranych składników podłoża, zostały zastosowane w procesie produkcji KI z glicerolu przez *A. terreus* FIN w hodowli wglębnej w bioreaktorze. Jak obrazuje rys. 2, produkcja KI rozpoczęła się dopiero po 69 h prowadzenia procesu. Ilość KI wzrastała w trakcie procesu, osiągając maksymalną wartość 19,8  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  w 11 dniu hodowli. Według badań innych autorów, szczepy *A. terreus* w podłożu z glukozą produkują wyższe ilości kwasu, około 82,3  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [11]. W podłożach zawierających, jako źródło węgla substraty skrobiowe, szczepy *A. terreus* produkują, do 62  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  kwasu z wydajnością około 59% [6]. Całkowita wydajność produkcji KI przez badany szczep *A. terreus* FIN z glicerolu nie przekraczała 20%.

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano wstępnie zoptymalizowany skład podłoża produkcyjnego do biosyntezy kwasu itakonowego z glicerolu. Kolejne badania związane z doskonaleniem procesu biosyntezy KI powinny uwzględnić dobór warunków hodowlanych systemu hodowlanego oraz użycie odpadowego glicerolu z produkcji biodiesla, celem poprawy efektywności i wydajności procesu produkcji KI z glicerolu przez *A. terreus* FIN.

## LITERATURA

1. H. Kautola, W. Rymowicz, Y. Linko, P. Linko: Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 154, (1991).
2. Y.S. Park, M. Itida, N. Ohta, M. Okabe: J. of Ferment. Bioengin., 77 (3), 329, (1994).
3. T. Willke, K.D. Vorlop: Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 289, (2001).
4. M. Petruccioli, V. Pulci, F. Federici: Lett. Appl. Microbiol., 28, 309, (1999).
5. C.S.K. Reddy, R.P. Singh: Biores. Technol., 85, 69, (2002).
6. K. Yahiro, S. Shibata, S. Jai, Y. Park, M. Okabe: J. Ferment. Bioengin., 84 (4), 375, (1997).
7. A. Jarry, Y. Seraudie: US-Patent 5 637 485 (to Rhône-Poulenc), (1997).
8. W. E. Levinson, C. Kurtzman, T. Kuo: Enzyme Microbial Technol., 39, 824, (2006).
9. K. Yahiro, T. Takahama, S. Jai, Y. Park, M. Okabe: Biotechnol. Lett., 19 (7), 619, (1997).
10. L. Dwiarti, M. Otsuka, S. Miura, M. Yaguchi, M. Okabe: Biores. Technol. 98, 3329, (2007).
11. K. Yahiro, T. Takahama, Y. Park, M. Okabe: J. Ferment. Bioengin., 79 (5), 506, (1995).