

Ewa PIOTROWSKA, **Krzysztof W. SZEWCZYK**, Małgorzata M. JAWORSKA, Ewa KONIECZNA-MORDAS

e-mail: jaworska@ichip.pw.edu.pl

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

## Biotechnologiczne wytwarzanie kwasu bursztynowego

### Wstęp

Zainteresowanie produkcją kwasu bursztynowego rośnie w ostatnich latach ze względu na możliwość jego zastosowania do produkcji surfaktantów, detergentów, powłok elektrolitycznych, produktów spożywczych, farmaceutyków, antybiotyków, aminokwasów i witamin [Lin i inni, 2008]. Obecnie większość kwasu bursztynowego dostępnego w handlu jest wytwarzana z gazu lub ropy naftowej jako podstawowego surowca [Song i inni, 2006]. Jednak kwas bursztynowy stosowany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz rolnictwie pochodzi tylko z fermentacji mikrobiologicznej.

Wiele gatunków bakterii znalazło zastosowanie w wytwarzaniu kwasu bursztynowego. Do najważniejszych z nich należą [Song i inni, 2006; Kurzrock i Weuster-Botz, 2010]:

- *Anaerobiospirillum succiniciproducens*,
- *Actinobacillus succinogenes*,
- *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E
- oraz zrekombinowane genetycznie szczepy *Escherichia coli* i *Corynebacterium glutamicum*.

Fermentacja bursztynianowa związana jest z wieloma problemami: bakterie wytwarzają trudne do oddzielenia produkty uboczne (kwas octowy i mrówkowy), fermentacja jest hamowana przez substrat (stężenie glukozy) i produkty.

Celem prezentowanej pracy było podjęcie próby modelowania procesu wytwarzania kwasu bursztynowego przez bakterie *Actinobacillus succinogenes* 130Z. Przeprowadzono hodowlę półciąglę, a następnie na podstawie zebranych danych doświadczalnych przeprowadzono symulację procesu fermentacji wykorzystując model wzrostu biomasy uwzględniający zarówno inhibicję substratową, jak i inhibicję produktem.

### Materiały i metody

**Mikroorganizmy:** W badaniach wykorzystano szczep *Actinobacillus succinogenes* 130Z (ATCC). Jako inokulum stosowano zawiesinę mikroorganizmów namnażaną na podłożu różniącym się od podłoża hodowlanego stężeniem glukozy (2,5 g/L).

**Pożywka:** We wszystkich doświadczeniach stosowano pożywkę o składzie:

- glukoza – 10, 20 lub 50 g/L,
- ekstrakt drożdżowy – 15 g/L,
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2 g/L,
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 1 g/L,
- CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O – 0,2 g/L,
- MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O – 0,2 g/L.

**Hodowlę** przeprowadzono w reaktorze BIOSTAT<sup>®</sup> B plus (Sartorius) o objętości 1 L. W trakcie hodowli odczyn pH 6,8 utrzymywano za pomocą 20 % roztworu NaOH. Hodowlę prowadzono w temperaturze 38°C. Ze względu na to, że bakterie *A.succinogenes* prowadzą fermentację kwasu bursztynowego w warunkach beztlenowych, hodowlę nasycono dwutlenkiem węgla.

**Stężenie glukozy** w pożywce mierzono metodą kolorymetryczną wykorzystując gotowe testy analityczne firmy BioMaxima (nr katalogowy 1-033-0400)

**Stężenie kwasu bursztynowego** w badanych próbkach oznaczono metodą HPLC wykorzystując chromatograf firmy Varian. Układ analityczny wyposażony był w detektor RI (ProStar 355) i kolumnę do oznaczania kwasów organicznych (HyperREZ XP Organic acid column,

Thermo Electron Corporation, T = 50°C); szybkość przepływu eluentu (0,0025M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wynosiła 0,5 mL/min.

**Stężenie biomasy** oznaczono metodą nefelometryczną. Przed wykonaniem pomiaru próbki pobrane z reaktora odwirowywano (20 min, 5000 obr/min), supernatant zlewano a biomase zawieszano w wodzie dejonizowanej i dokładnie mieszano. Ekstynkcję zawiesiny biomasy mierzono wobec wody dejonizowanej przy długości fali 660 nm. Wynik odczytywano ze sporządzonej wcześniej krzywej wzorcowej.

### Wyniki doświadczeń

Objętość początkowa pożywki w reaktorze wynosiła 0,26 L. Stężenie glukozy w momencie zaszczepienia wynosiło 50 g/L. Pożywkę szczepiono inokulum i pozostawiano na noc jako hodowlę okresową w celu namnożenia bakterii. Po tym czasie rozpoczynano dozowanie jałowej pożywki. Hodowlę prowadzono przez 6 godzin pobierając próbkę co godzinę. Po zakończeniu dozowania zawartość reaktora pozostawiono na noc w celu dalszego namnożenia biomasy. Kolejnego dnia, z reaktora odpompowywano nadmiar brzezki pozostawiając ok. 0,3 L. Ta objętość była wykorzystana jako materiał do rozpoczęcia nowej hodowli półciąglę bez konieczności użycia świeżego inokulum (hodowle wielokrotne). Cały cykl powtarzano kilkukrotnie. Eksperymenty przeprowadzono zmieniając stężenie glukozy w dozowanej pożywce (10 g/L, 20 g/L) oraz zmieniając szybkość dozowania pożywki (0,025 L/h, 0, 030 L/h, 0,05 L/h).

Fermentację kwasu bursztynowego opisano wykorzystując układ równań bilansowych dla hodowli półciąglę z zastosowaniem równania kinetycznego [Luedeking i Piret, 2000]:

– bilans biomasy

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X \quad (1)$$

– bilans produktu

$$\frac{dP}{dt} = a\mu X + bX - \frac{F}{V} P \quad (2)$$

– bilans substratu

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_F - S) - \frac{1}{Y_{XS}} \mu X - \frac{1}{Y_{PS}} (a\mu X + bX) - mX \quad (3)$$

– bilans objętości:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (4)$$

gdzie:

- a* – współczynnik empiryczny [-]
- b* – współczynnik empiryczny [1/h]
- F* – szybkość dozowania pożywki [L/h]
- K<sub>i</sub>* – stała inhibicji substratem [g/L]
- K<sub>S</sub>* – stała nasycenia [g/L]
- K<sub>P</sub>* – stała inhibicji produktem [g/L]
- m* – współczynnik przemiany podstawowej [1/h]
- P* – stężenie kwasu bursztynowego [g/L]
- S* – stężenie glukozy [g/L]
- S<sub>F</sub>* – stężenie glukozy w pożywce dozowanej do reaktora [g/L]
- t* – czas hodowli [h]
- V* – objętość hodowli [L]
- X* – stężenie biomasy [g/L]
- Y<sub>PS</sub>* – współczynnik wydajności produktu względem substratu [g kwasu / g glukozy]

$Y_{XS}$  – współczynnik wydajności biomasy względem substratu [g s.m./g glukozy];

$\mu$  – właściwa szybkość wzrostu biomasy [1/h]

Wzrost bakterii jest hamowany zarówno przez wysokie stężenie glukozy jak i przez wysokie stężenie kwasu bursztynowego.  $\mu$  przedstawiono wykorzystując model *Zinesa-Rogera* opisujący hamowanie produktem i wzbogacono go o człon uwzględniający hamowanie wzrostu substratem (analogicznie jak w równaniu *Andrewsa*):

– dla  $P < K_p$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 - \frac{P}{K_p}\right) \quad (5)$$

– dla  $P \geq K_p$

$$\mu = 0 \quad (6)$$

$\mu_{\max}$  – maksymalna właściwa szybkość wzrostu biomasy [1/h]

We wszystkich przypadkach model dobrze opisuje dane eksperymentalne. Nieznacznie gorsze dopasowanie uzyskano w hodowlach prowadzonych przy większym stężeniu glukozy (hodowla nr 4).

Dla każdej hodowli wyznaczono także parametry kinetyczne modelu ( $m, a, b, K_s, K_p, K_i$ ). Średnie wartości ( $\pm$ SD) tych parametrów przyjmują następujące wartości:

$$m = 0 \text{ 1/h,}$$

$$b = 0 \text{ 1/h,}$$

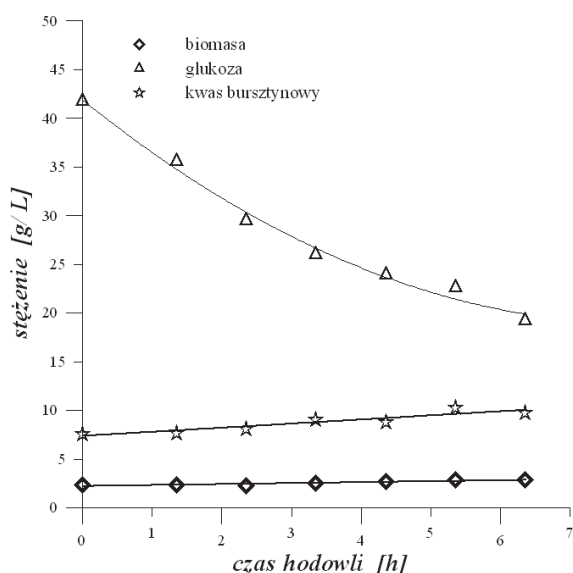
$$K_s = 5,9 \text{ g/L } (\pm 0,9 \text{ g/L}),$$

$$K_p = 32,8 \text{ g/L } (\pm 2,0 \text{ g/L}),$$

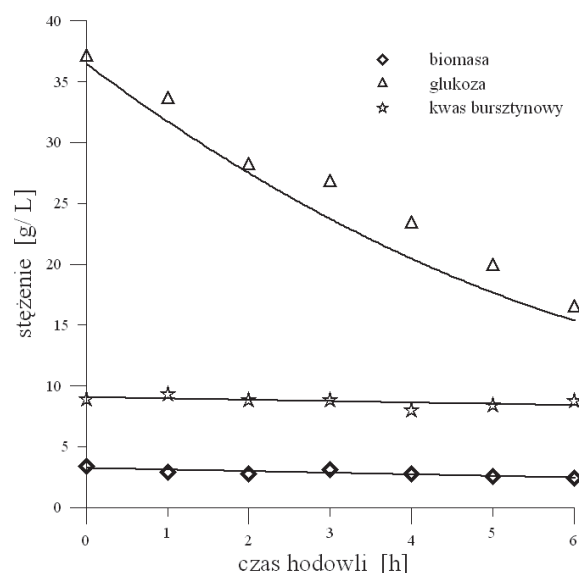
$$K_i = 100,3 \text{ g/L } (\pm 10,9 \text{ g/L}).$$

Nie wyznaczono wartości średniej współczynnika empirycznego  $a$ , gdyż jego wartość mieści się w dwóch przedziałach liczbowych: 2,1–5,2 oraz 29,1–35,4 [–] i taka rozbieżność wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Zerowa wartość współczynnika  $m$  wskazuje, że w warunkach prowadzonych hodowli półciągłych przemiana podstawowa nie odgrywa roli, to znaczy, że ilość substratu zużywanego w przemianie podstawowej była dużo mniejsza niż ilość substratu zużywanego w pozostałych przemianach. Natomiast zerowa wartość współczynnika empirycznego  $b$  świadczy o tym, że kwas bursztynowy był wytwarzany głównie w trakcie wzrostu biomasy.

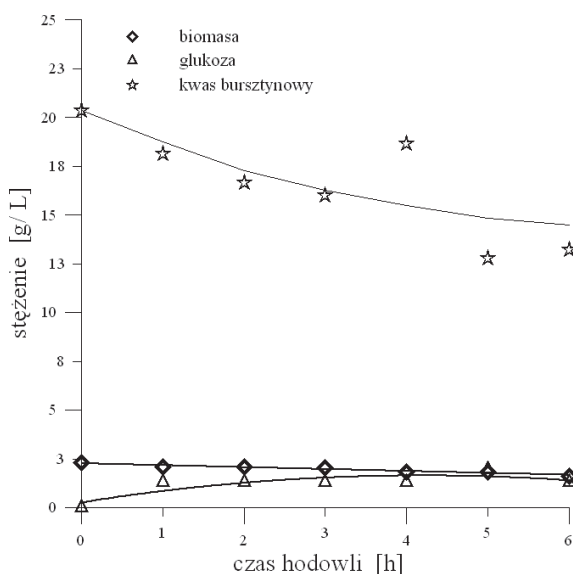
Współczynnik inhibicji  $K_p$  odpowiada stężeniu kwasu bursztynowego, przy którym obserwujemy inhibicję produktem. Wyznaczona w pra-



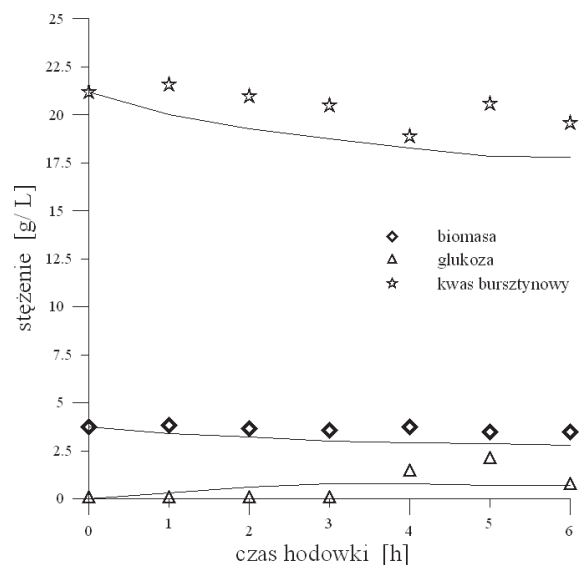
Rys. 1. Zmiany stężenia biomasy, glukozy i kwasu bursztynowego; natężenie dozowania substratu – 0,025 L/h, stężenie substratu 10 g/L



Rys. 3. Zmiany stężenia biomasy, glukozy i kwasu bursztynowego; natężenie dozowania substratu - 0,050 L/h, stężenie glukozy – 10 g/L



Rys. 2. Zmiany stężenia biomasy, glukozy i kwasu bursztynowego; natężenie dozowania substratu – 0,030 L/h, stężenie glukozy 10 g/L



Rys. 4. Zmiany stężenia biomasy, glukozy i kwasu bursztynowego; natężenie dozowania substratu – 0,025 L/h, stężenie substratu – 20 g/L

cy wartość  $K_p$  wynosi 32,8 g/L. Według pracy [Guettler i inni, 1996] wzrost bakterii *A.succinogenes* odnotowano przy stężeniu 96 g/L bursztynianu sodu lub 130 g/L bursztynianu magnezu. Oszacowana wartość parametru wskazywałaby, że bakterie wykorzystane w badaniach mają znacznie mniejszą odporność na kwas bursztynowy niż podaje literatura.

Wyznaczone na podstawie danych doświadczalnych współczynniki wydajności biomasy względem substratu przyjmuje wartości w przedziale 0,20–0,26 g s.m./g glukozy. Są to wartości zgodne z danymi literaturowymi (0,16–0,30 g s.m./g [Corona-Gonzalez i inni, 2008]).

Współczynnik wydajności bursztynianu względem substratu przyjmował wartości 0,67–0,71 g kwasu/g glukozy i jest zgodny z danymi literaturowymi (0,68–0,87 g/g [Guettler i inni, 1996]).

### Podsumowanie i wnioski

Kwas bursztynowy jest cennym produktem ze względu na jego wykorzystanie w wielu gałęziach przemysłu. Znajomość kinetyki procesu wytwarzania kwasu bursztynowego jest niezbędna dla projektowania instalacji przemysłowej.

W pracy podjęto próbę modelowania fermentacji bursztynianowej prowadzonej przy użyciu bakterii *A.succinogenes* 130Z oraz próbę modelowania pracy reaktora półciągłego za pomocą zaproponowanego modelu wzrostu biomasy, asymilacji glukozy i produkcji kwasu bursztynowego.

Właściwą szybkość wzrostu  $\mu$  opisano modelem, w którym połączono równanie Zinesa-Rogera na inhibicję produktem i równanie Andrew-

sa na inhibicję substratem. Do opisu szybkości wytwarzania produktu wykorzystano równanie Luedekinga-Pireta.

Zaproponowany model kinetyczny dobrze opisuje fermentację bursztynową.

### LITERATURA

- Lin S.K.C., Du C., Koutinas A., Wang R., Webb C., 2008. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* *Biochem. Eng. J.* 41, 128–135. DOI:10.1016/j.bej.2008.03.013
- Kurzrock T., Weuster-Botz D., 2010. Recovery of succinic acid from fermentation broth *Biotech. Let.* 32, 331–339. DOI: 10.1007/s10529-009-0163-6
- Song H., Lee S.Y., 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation *Enz. Microb. Techn.* 39, 352–361. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.043
- Guettler M.V., Jain M.K., Soni B.K., 1996. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. US Patent 5,504,004.
- Liu Y.P., Zheng P., Sun Z.-H., Ni Y., Dong J.-J., Zhu L.-L., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* *Bioresour. Tech.* 99, 1736–1742. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.03.044
- Luedeking R., Piret E.L., 2000. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH *Biotechnol. Bioeng.* 67, 393–401. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<393::AID-BIT3>3.0.CO;2-U
- Corona-Gonzalez R.I., Bories A., Gonzalez-Alvarez V., Pelayo-Ortiz C., 2008. Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130 *Process Biochem.* 43, nr 10, 1047–1053. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.05.011

## Zasady recenzowania artykułów przeznaczonych do publikacji w czasopiśmie „Inżynieria i Aparatura Chemiczna”

(zgodne z wytycznymi zamieszczonymi na stronach portalu *Polska Bibliografia Naukowa*,  
który jest częścią Systemu Informacji o Szkolnictwie Wyższym:

[https://pbn.nauka.gov.pl/static/doc/wytyczne\\_dotyczace\\_procedury\\_recenzowania.pdf](https://pbn.nauka.gov.pl/static/doc/wytyczne_dotyczace_procedury_recenzowania.pdf))

- Do oceny każdej publikacji powołuje się co najmniej dwóch niezależnych recenzentów spoza jednostki.
- Recenzent podpisuje oświadczenie o niewystępowaniu konfliktu interesów, przy czym za konflikt interesów uznaje się zachodzące między recenzentem a autorem:
  - a) bezpośrednie relacje osobiste (pokrewieństwo, związki prawne, konflikt),
  - b) relacje podległości zawodowej,
  - c) bezpośrednia współpraca naukowa w ciągu ostatnich dwóch lat poprzedzających przygotowanie recenzji.
- Recenzja ma formę pisemną i kończy się jednoznacznym wnioskiem co do dopuszczenia artykułu do publikacji lub jego odrzucenia.
- Zasady kwalifikowania lub odrzucenia publikacji oraz formularz recenzencki są podawane do publicznej wiadomości w numerach czasopisma oraz na stronie internetowej czasopisma pod adresem: [http://inzynieria-aparatura-chemiczna.pl/pdf/Formularz\\_recenzji.pdf](http://inzynieria-aparatura-chemiczna.pl/pdf/Formularz_recenzji.pdf)
- Nazwiska recenzentów poszczególnych publikacji/numerów nie są ujawniane. Redakcja raz w roku podaje do publicznej wiadomości listę współpracujących recenzentów. Lista drukowana jest w ostatnim numerze w danym roku kalendarzowym oraz dostępna jest na stronie internetowej czasopisma pod adresem: <http://inzynieria-aparatura-chemiczna.pl/kolegium-redakcyjne/>