

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Optymalizacja produkcji 2,3-butanodiolu przez szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 metodą płaszczyzny odpowiedzi

MARIUSZ LESIECKI, ADRIAN CZERNIAK, DAGMARA LEŚNIAK, EWELINA PŁÓCIENNIK
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU,
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI

Słowa kluczowe: 2,3-butanodiol, *Bacillus licheniformis*, metoda płaszczyzny odpowiedzi

STRESZCZENIE

W pracy wykorzystano metodę płaszczyzny odpowiedzi w celu zoptymalizowania biosyntezy 2,3-butanodiolu przez szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. Oceniono wpływ stężenia ekstraktu drożdżowego oraz jonów CH_3COO^- , Fe^{2+} i Mn^{2+} na końcową zawartość 2,3-butanodiolu w płynie pohodowlanym. Doświadczenie optymalizacyjne zaprojektowano w oparciu o plan D-optymalny obejmujący 25 wariantów hodowli. Zaobserwowano istotny ($p < 0,05$) wpływ stężenia ekstraktu drożdżowego oraz jonów CH_3COO^- i Mn^{2+} na syntezę diolu. Na podstawie analizy statystycznej uzyskano optymalne wartości analizowanych zmiennych, wynoszące ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): ekstrakt drożdżowy – 4, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ – 4, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 oraz $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, które odpowiadały końcowemu stężeniu 2,3-butanodiolu na poziomie $8,9\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Optimisation of 2,3-butanediol production by *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 strain using response surface method

Keywords: 2,3-butanediol, *Bacillus licheniformis*, response surface method

ABSTRACT

Response surface method was used in this work in order to optimise the biosynthesis of 2,3-butanediol by strain *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. The effect of yeast extract and concentration of CH_3COO^- , Fe^{2+} and Mn^{2+} ions was evaluated on the final level of 2,3-butanediol in fermentation broth. The optimisation experiment was planned according to D-optimal design and consisted of 25 runs. Obtained results showed significant influence ($p < 0,05$) of the yeast extract, CH_3COO^- and Mn^{2+} concentration on the studied process. On the basis of statistic analysis, optimal values of analyzed variable were determined as follows ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): yeast extract – 4, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ – 4, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, that corresponded to $8,9\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ final 2,3-butanediol concentration.

1. WPROWADZENIE

Rosnące ceny ropy naftowej jako surowca do produkcji wielu powszechnie stosowanych materiałów wymuszają konieczność poszukiwania alternatywnych metod ich pozyskiwania. W ostatnich latach obserwuje się coraz szybszy rozwój procesów opartych o biotechnologię, w których wykorzystywane są mikroorganizmy lub ich składniki jako naturalne katalizatory procesów produkcyjnych [1, 2]. Mikrobiologiczna biokonwersja surowców odnawialnych, jak np. odpady z przemysłu rolno-spożywczego, coraz częściej zastępuje tradycyjne metody syntezy chemicznej w odniesieniu do coraz większej liczby wartościowych substancji [3]. Jedną z takich substancji jest 2,3-butanodiol (butan-2,3-diol), słabo lotny związek z grupy alkoholi dihydroksylowych, o masie cząsteczkowej $90,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ i wzorze chemicznym $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$, pozyskiwany na dużą skalę z ropy naftowej i stosowany w produkcji między innymi syntetycznej gumy, plastyfikatorów, związków zmiękczających wodę, rozpuszczalników, dodatków do paliw oraz jako składnik kosmetyków i farmaceutyków [4].

Pierwsze doniesienia na temat produkcji 2,3-BD z wykorzystaniem mikroorganizmów pochodzą z początku XX wieku. Harden i Walpole w 1906 r. uzyskali ten związek na drodze biokonwersji z użyciem bakterii z rodzaju *Klebsiella*. W późniejszych latach odkryto, że również szczep z gatunku *Bacillus polymyxa* jest w stanie produkować 2,3-BD w hodowlach zawieszinowych. Pierwsze próby hodowli na skalę przemysłową zostały przeprowadzone w 1933 r. przez Fulmera i współpracowników. Rozwój badań, w tym udoskonalenie metod produkcji na skalę przemysłową, nastąpił w okresie II wojny światowej, co wiązało się z dużym zainteresowaniem 2,3-butanodiolem jako surowcem do produkcji syntetycznej gumy. Po zakończeniu wojny badania nie były kontynuowane ze względu na możliwość pozyskiwania 2,3-BD z taniego źródła, jakim była ropa naftowa. Wzrost cen tego surowca, który nastąpił w latach 70. XX wieku i trwa do dziś, przyspieszył badania nad mikrobiologiczną produkcją tego związku [2, 4].

Mikrobiologiczna produkcja 2,3-BD opiera się na wykorzystaniu naturalnego metabolizmu bakterii, zdolnych do asymilacji monosacharydów (heksoz i pentoz) w tzw. mieszanej fermentacji kwasowej [5]. W trakcie jej trwania formuje się kilka produktów pośrednich, między innymi diacetyl i acetoina [4]. Wspólną cechą obu szlaków jest

konieczność wstępnej biokonwersji cukrów do pirogronianiu, co następuje w szlaku metabolicznym Embdena-Meyerhofa [6]. Kluczową rolę w dalszej konwersji pirogronianu do 2,3-BD i produktów pobocznych odgrywają: syntaza α -acetomleczanowa [EC 4.1.3.18], dekarboksylaza α -acetomleczanowa [EC 4.1.1.5] oraz dehydrogenaza 2,3-BD [EC 1.1.1.4] [7]. Wysoka wrażliwość kilku enzymów tego szlaku na obecność tlenu sprawia, że 2,3-BD syntetyzowany jest tylko w warunkach silnej limitacji tlenowej, która występuje zwykle w późnej fazie logarytmicznej wzrostu drobnoustrojów. W tych warunkach pirogronian jest wstępnie przekształcany do acetoiny z α -acetomleczanem jako produktem pośrednim. Acetoina ulega następnie redukcji do 2,3-BD przy użyciu dehydrogenazy 2,3-BD [4].

Celem badań była ocena przydatności szczepu *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 do biosyntezy 2,3-butanodiolu na podłożu syntetycznym. Dodatkowo, podjęto próbę określenia wpływu stężenia poszczególnych składników podłoża na końcową zawartość 2,3-BD w płynie hodowlanym.

2. MATERIAŁY I METODY

W badaniach wykorzystano szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. Czystą kulturę mikroorganizmu przechowywano w 4°C na skosach agarowych (2% bacto-microbial agar, Difco). Bakterie pasażowano na świeże skosy co dwa miesiące.

Przed rozpoczęciem fermentacji zasadniczej przeprowadzono etap propagacji mikroorganizmów, który polegał na wykonaniu w odstępach 24 h dwóch kolejnych pasażów biomasy bakteryjnej do świeżej porcji pożywki płynnej (Nutrient Broth, Biocorp, Polska). Następnie wykonano kolejny pasaż komórek do bulionu o zwiększonej zawartości glukozy ($30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$). Medium to stanowiło inokulat dla hodowli produkcyjnych.

W dalszej części badań szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 wykorzystano w testach optymalizacyjnych składu pożywki produkcyjnej. Doświadczenia zaplanowano i wykonano zgodnie metodologią płaszczyzny odpowiedzi, w oparciu o plan D-optymalny. Analizę wyników przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Design-Expert® Software 8.0 (Stat-Ease, USA). Medium hodowlane wzbogacono założonymi ilościami ekstraktu drożdżowego (YE, ang. *Yeast Extract*) oraz jonami CH_3COO^- , Fe^{2+} i Mn^{2+} w postaci soli siarczanowych lub octanowych (Tab. 1).

Tabela 1 Poziomy minimalny (-1), pośredni (0) oraz maksymalny (+1) dla badanych zmiennych w procesie optymalizacji składu pożywki produkcyjnej dla szczepu *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059

Table 1 Minimal (-1), medium (0) and maximal (+1) levels of studied variables in *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 production medium optimisation process

Zmienna Variable	Kod Code	Wartość kodowa Coded value		
		-1	0	1
Ekstrakt drożdżowy [g·dm ⁻³]	A	0,50	2,25	4,00
CH ₃ COONH ₄ [g·dm ⁻³]	B	0,50	2,25	4,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O [g·dm ⁻³]	C	0,10	0,20	0,30
MnSO ₄ ·H ₂ O [g·dm ⁻³]	D	0,10	0,20	0,30

Hodowle prowadzono w kolbach stożkowych Erlenmayera o objętości 250 cm³. Składniki pożywek, zgodnie z planem doświadczenia (Tab. 2), rozpuszczono w 100 cm³ wody destylowanej, po czym suplementowano źródłem węgla w postaci glukozy (30 g·dm⁻³) oraz CaCO₃ (3 g·dm⁻³) jako czynnikiem zapewniającym buforowość medium. Następnie za pomocą stężonych roztworów NaOH oraz H₂SO₄ regulowano pH medium do wartości 6,8. Całość poddawano procesowi sterylizacji termicznej w autoklawie (121°C, 30 min). Po wystudzeniu, do kolb dodawano 10 cm³ inokulum bakteryjnego i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, przy częstotliwości wytrząsania 150 obr·min⁻¹. Po zakończeniu procesu fermentacji analizowano płyn pochodzący pod kątem zawartości cukrów, kwasów i dioli oraz produkcji biomasy.

Kinetykę produkcji 2,3-BD wyznaczono w 3,5-litrowym bioreaktorze BIOFLO III (New Brunswick Scientific, USA) dla pożywki o najwyższej produkcji diolu (wariant 3, Tab. 2). Kulturywacje prowadziło w objętości roboczej 1,3 dm³, przy szybkości przepływu powietrza 0,2 vvm, szybkości obrotów mieszadła 150 obr·min⁻¹, w temperaturze 37°C. W czasie procesu utrzymywano wartość pH na poziomie 6,8 za pomocą 40% (w/w) NaOH. Próby pobierano co 1 h i określono w nich zawartości cukrów, kwasów i dioli oraz produkcję biomasy.

Analizę zawartości cukrów, kwasów i dioli wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) za pomocą chromatografu Merck

Hitachi (zestaw zawierał: automatyczny podajnik próbek L-7250, pompę L-7100 z detektorem RI L-7490). Do oznaczeń użyto kolumny Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm (BIORAD). Jako eluent stosowano 0,001 N H₂SO₄ przy przepływie 0,5 ml·min⁻¹. Oznaczenia wykonano w temperaturze 50°C. Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem pomiaru powierzchni pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem Merck-Hitachi Chromatography Data Station Software). Analizę zawartości biomasy bakteryjnej przeprowadzono wyznaczając suchą masę próbki metodą wagową według normy PN-90/A-75101/03. Oznaczenie polegało na bezpośrednim suszeniu substancji do stałej masy, w określonej temperaturze i w określonych warunkach ciśnienia.

3. WYNIKI I DISKUSJA

W Tabeli 2 przedstawiono wyniki uzyskane w poszczególnych wariantach hodowlanych. Na ich podstawie, w oparciu o analizę wariancji (Tab. 3), wyznaczono wielkość współczynników w równaniu regresji opisującym produkcję 2,3-BD [g·dm⁻³]:

$$Y = 1,54 A + 1,46 B - 0,27 C + 0,57 D + 1,01 AB + 0,18 AC + 0,15 AD - 0,1 BC + 0,26 BD + 0,02 CD \quad (1)$$

Równanie to przedstawia zależności pomiędzy zawartością składników podłoża a ilością uzyskanego produktu i pozwoliło obliczyć teoretyczną wielkość stężenia 2,3-BD, które powinno zostać osiągnięte w poszczególnych wariantach hodowlanych.

Najwyższe stężenie produktu (8,9 g·dm⁻³) uzyskano w wariancie numer 3 hodowli w podłożu o następującym składzie: ekstrakt drożdżowy 4 g·dm⁻³, CH₃COONH₄ 4 g·dm⁻³, FeSO₄·7H₂O 0,1 g·dm⁻³ oraz MnSO₄·H₂O 0,3 g·dm⁻³. Wartość spodziewana stężenia 2,3-BD w tym wariancie wynosiła 8,2 g·dm⁻³ i różniła się od wyniku rzeczywistego o około 8%, co wskazywało, że uzyskany model został dobrze dopasowany do danych doświadczalnych. Wysokie rzeczywiste stężenie produktu uzyskano również w wariancie numer 11 (7,9 g·dm⁻³), w którym pożywka składała się z następujących składników: ekstrakt drożdżowy 4 g·dm⁻³, CH₃COONH₄ 4 g·dm⁻³, FeSO₄·7H₂O 0,3 g·dm⁻³ oraz MnSO₄·H₂O 0,3 g·dm⁻³. Wynik ten był w znacznej mierze zbliżony do wartości oczekiwanej, która wynosiła 7,8 g·dm⁻³. Z kolei, najniższe rzeczywiste stężenie 2,3-BD (0,2 g·dm⁻³) odnotowano w wariancie numer 15, gdzie

Tabela 2 Skład pożywek fermentacyjnych stosowanych w doświadczeniu optymalizacyjnym wraz z teoretyczną oraz uzyskaną w doświadczeniu produkcją 2,3-BD

Table 2 The composition of the fermentation media used in optimisation experiment with theoretical and obtained 2,3-BD production

Numer wariantu Run number	Zmienna Variable				Stężenie 2,3-BD [g·dm ⁻³] Concentration 2,3-BD [g·dm ⁻³]		Wydajność rzeczywista Obtained efficiency [g _{2,3-BD} /g _{glukozy}]
	A	B	C	D	Wartość przewidywana Predicted value	Wartość uzyskana Obtained value	
1	4,00	2,25	0,20	0,20	4,50	5,00	0,18
2	0,50	2,25	0,10	0,30	2,30	3,00	0,11
3	4,00	4,00	0,10	0,30	8,20	8,90	0,33
4	0,50	4,00	0,20	0,30	2,60	2,20	0,08
5	4,00	4,00	0,10	0,30	8,20	7,80	0,28
6	4,00	0,50	0,20	0,30	2,50	1,70	0,06
7	4,0	0,50	0,30	0,10	1,60	1,20	0,04
8	2,25	0,50	0,10	0,30	2,10	1,70	0,06
9	4,00	0,50	0,10	0,10	1,60	2,20	0,08
10	0,50	4,00	0,30	0,10	0,70	0,60	0,02
11	4,00	4,00	0,30	0,30	7,80	7,90	0,29
12	0,50	4,00	0,10	0,10	1,80	2,70	0,10
13	0,50	0,50	0,10	0,20	1,30	1,20	0,04
14	0,50	0,50	0,30	0,30	0,80	0,40	0,01
15	0,50	0,50	0,20	0,10	0,80	0,20	0,01
16	4,00	0,50	0,10	0,10	1,60	1,20	0,04
17	2,25	2,25	0,15	0,20	3,10	3,40	0,13
18	0,50	0,50	0,30	0,30	0,80	1,20	0,04
19	4,00	4,00	0,20	0,10	6,10	5,70	0,21
20	2,25	4,00	0,20	0,20	4,40	3,70	0,14
21	0,50	4,00	0,10	0,10	1,80	1,30	0,05
22	0,50	4,00	0,30	0,10	0,70	1,10	0,04
23	2,25	0,50	0,20	0,20	1,60	3,40	0,13
24	0,50	2,25	0,20	0,20	1,30	0,70	0,03
25	2,25	2,25	0,30	0,20	2,80	3,80	0,14

poszczególne składniki pożywki dodawano w minimalnych ilościach (ekstrakt drożdżowy 0,5 g·dm⁻³, CH₃COONH₄ 0,5 g·dm⁻³, FeSO₄·7H₂O 0,2 g·dm⁻³ oraz MnSO₄·H₂O 0,1 g·dm⁻³). Wartość spodziewana w tym przypadku wynosiła 0,8 g·dm⁻³ 2,3-BD. Szczegółowa analiza statystyczna otrzymanych rezultatów pozwoliła stwierdzić, że produkcja 2,3-BD w największym stopniu uzależniona była od stężenia ekstraktu drożdżowego oraz jonów octanowych i manganianowych obecnych w pożywce fermentacyjnej.

W czasie fermentacji obserwowano prostoliniowe zwiększanie syntezy diolu wraz ze wzrostem

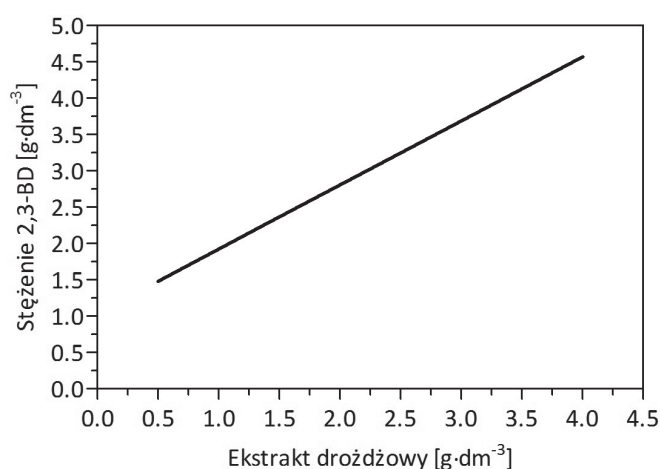
ilości ekstraktu drożdżowego obecnego w płynie hodowlanym (Rys. 1).

Zjawisko to związane było w sposób pośredni ze wzrostem biomasy bakteryjnej. Ekstrakt drożdżowy, jako jedno ze źródeł azotu organicznego najefektywniej wykorzystywanych przez mikroorganizmy, zawiera w swoim składzie łatwo przyswajalne krótkołańcuchowe polipeptydy oraz wolne aminokwasy i dzięki temu bierze udział w procesach biosyntezy komórkowej. Biorąc pod uwagę fakt, że produkcja 2,3-BD, który jest tzw. metabolitem pierwszorzędowym, związana jest ze wzrostem komórek drobnoustrojów, sądzić moż-

Tabela 3 Analiza wariancji dla procesu optymalizacji składu pożywki produkcyjnej

Table 3 Analysis of variance of production medium optimisation process

Źródło Source	Suma kwadratów Sum of squares	Stopnie swobody Degree of freedom	Średni kwadrat Mean square	Wartość F F value	Prawdopodobieństwo Probability
Model	132,61	10,00	13,26	16,96	< 0,0001
A - YE [g·dm ⁻³]	37,39	1,00	37,39	47,83	< 0,0001
B - CH ₃ COONH ₄ [g·dm ⁻³]	33,20	1,00	33,20	42,47	< 0,0001
C - FeSO ₄ ·7H ₂ O [g·dm ⁻³]	1,09	1,00	1,09	1,39	0,2583
D - MnSO ₄ ·H ₂ O [g·dm ⁻³]	4,35	1,00	4,35	5,57	0,0338
Reszta Residual	10,94	14,00	0,78		
Brak dopasowania Lack of fit	8,20	9,00	0,91	1,66	0,3
Błąd czysty Pure error	2,75	5,00	0,55		

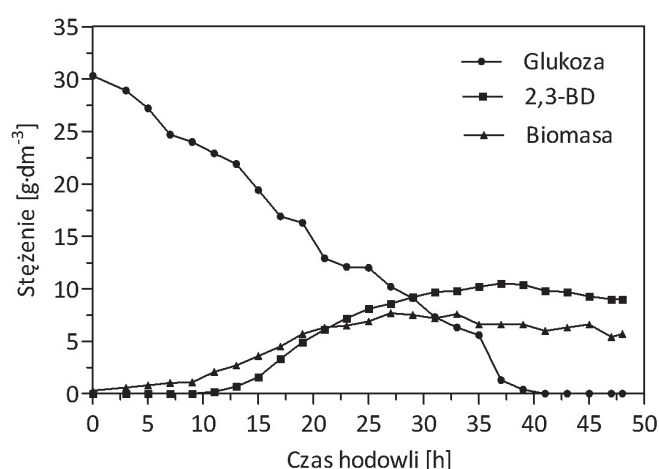


Rysunek 1 Wpływ dodatku ekstraktu drożdżowego na efektywność procesu fermentacji 2,3-butanodiolowej

Figure 1 Effect of yeast extract addition level on 2,3-butanediol fermentation efficiency

na, że ekstrakt drożdżowy wpływał pośrednio na produkcję diolu właśnie poprzez stwarzanie odpowiednich warunków do namnażania komórek bakteryjnych. Potwierdziła to również obserwacja kinetyki produkcji 2,3-BD, gdzie obserwowano wzrost stężenia diolu skorelowany ze wzrostem biomasy (Rys. 2).

Podobne wnioski przedstawił Xiao i wsp. twierdząc, że produkcja acetoiny, bezpośredniego intermediatu w procesie syntezy 2,3-BD, związana jest ze wzrostem biomasy bakteryjnej [8]. Szczep *Bacillus subtilis* CICC 10025, który wykorzystywano w tych badaniach, tym efektywniej produkował pożądany związek, im więcej biomasy komórkowej obecnej było w płynie hodowlanym, a to z kolei związane było z suplementowaniem medium organicznego źródłem azotu.

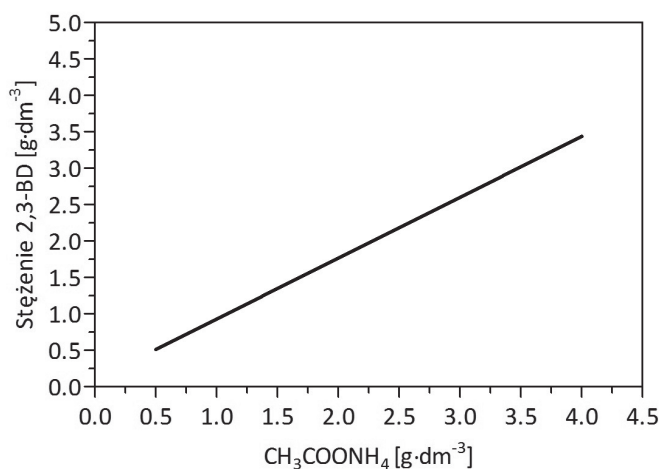


Rysunek 2 Kinetyka procesu syntezy 2,3-butanodiolu przez szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059

Figure 2 Kinetic of 2,3-butanediol synthesis by strain *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059

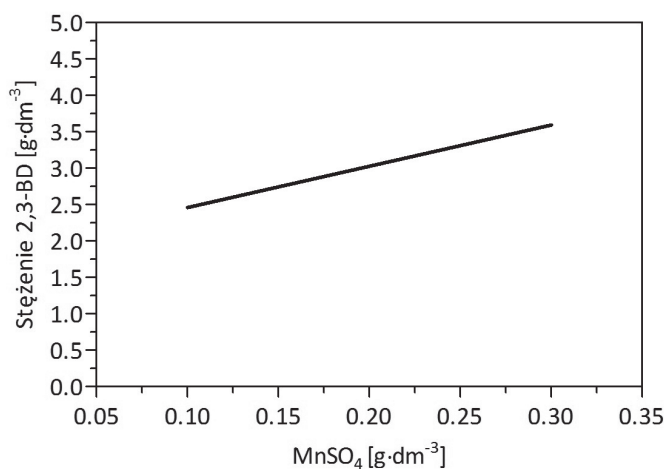
Yu i Sandler również zaobserwowali wzrost produkcji 2,3-BD przy zwiększającej się ilości biomasy komórkowej w płynie hodowlanym [9]. W swojej pracy wykorzystali oni szczep *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724, badając wpływ rodzaju źródła azotu na przyrost biomasy i produkcję diolu. W tym wypadku azot organiczny w postaci ekstraktu drożdżowego okazał się znacznie lepszym i wydajniejszym suplementem pożywki produkcyjnej niż związki nieorganiczne, takie jak np. (NH₄)₂SO₄.

Na podstawie analizy wariancji stwierdzono, że w badanym zakresie zmiennych istotny statystycznie wpływ na efektywność procesu produkcji 2,3-BD miała również zwiększona dawka kwasu octowego (Rys. 3).



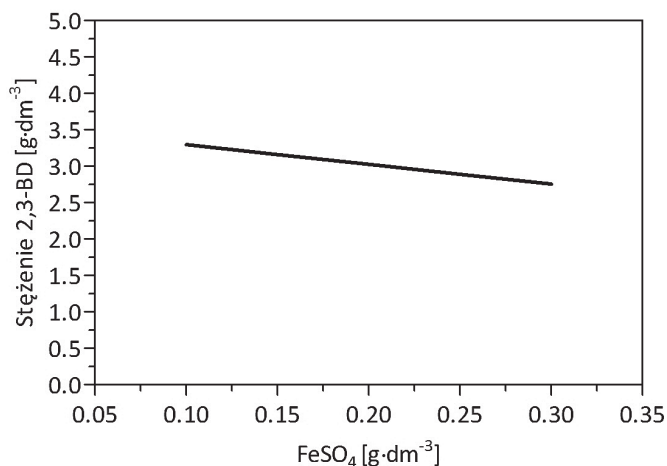
Rysunek 3 Wpływ dodatku soli octanowej na efektywność procesu fermentacji 2,3-butanodiolowej

Figure 3 Effect of acetate salt addition level on 2,3-butanediol fermentation efficiency



Rysunek 4 Wpływ soli manganianowej na efektywność procesu fermentacji 2,3-butanodiolowej

Figure 4 Effect of manganese salt on 2,3-butanediol fermentation efficiency



Rysunek 5 Wpływ soli żelazowej na efektywność procesu fermentacji 2,3-butanodiolowej

Figure 5 Effect of ferric salt on 2,3-butanediol fermentation efficiency

Powiązanie to można z rolą tego składnika, który jest aktywatorem ekspresji genów kodujących białka enzymatyczne biorące udział w syntezie diolu (m.in. dehydrogenazy 2,3-BD). Jony octanowe są również włączane do szlaku metabolicznego produkcji 2,3-BD w postaci α -acetomleczanu. Ich obecność wpływa na szybkość tworzenia się acetoiny – bezpośredniego prekursora diolu [4]. Również Nakashimada i współ. zaobserwowali, na podstawie badań szczepu *Peaenibacillus polymyxa* ATCC 12321, że suplementowanie pożywki kwasem octowym znacząco podnosiło wydajność syntezę 2,3-BD w stosunku do innych testowanych składników (kwas: mlekowy, masłowy, bursztynowy, walerianowy, propionowy) [10]. Dodatkowo, obecność jonów octanowych w medium hodowlanym inhibowała znacząco produkcję innych metabolitów, takich jak kwas mlekowy, oraz obniżała wydzielanie się wodoru. Podobne rezultaty osiągnięto również w przypadku szczepu *Enterobacter aerogenes* [11]. Na skutek suplementacji pożywki produkcyjnej kwasem octowym stwierdzono wzrost wydajności 2,3-BD oraz obniżenie syntezę pozostałych produktów dodatkowych (kwasów organicznych). Wykazano jednak, że proces ten był zależny od stopnia dysocjacji kwasu octowego.

Czynnikiem warunkującym wydajną produkcję 2,3-BD przez szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 okazała się również odpowiednia dawka jonów pierwiastków dwuwartościowych. Na podstawie badań Garga i Jaina jako czynniki poddawane testom wytypowano związki soli manganu i żelaza [12]. Otrzymane rezultaty pozwoliły stwierdzić, że istotny statystycznie wpływ na proces syntezę metabolitu posiadał tylko ten pierwszy składnik (Rys. 4), przy czym wzrost jego stężenia w płynie hodowlanym skutkowało proporcjonalnym zwiększeniem syntezę 2,3-BD. W badanym zakresie (0,1 – 0,3 g·dm⁻³) jony żelaza nie miały wpływu na produkcję 2,3-BD (Rys. 5).

Dwuwartościowe jony manganu jako kofaktor enzymów szlaku metabolicznego fermentacji 2,3-BD (dekarboksylazy α -acetomleczanu, dehydrogenazy acetoiny i reduktazy acetoiny) zapewniały prawidłowe ich funkcjonowanie. Sprowadzało się to do utrzymywania właściwej konformacji i specyficzności centrów aktywnych enzymów, przez co zapewniona była odpowiednia dostępność enzymów dla substratów [13, 14]. Juni i Heym dodatkowo sprawdzili interakcje innych kofaktorów z enzymami szlaku metabolicznego produkcji

2,3-BD [15]. Na podstawie tych badań stwierdzono, że jony Mn^{2+} obok jonów Mg^{2+} oraz Co^{2+} zapewniały najefektywniejszą konwersję substratów do diolu. Mniejszy efekt uzyskano stosując jony Ca^{2+} , Ni^{2+} oraz Cd^{2+} .

4. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań optymalizacyjnych wykazano zdolność szczepu *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 do efektywnej biosyntezy 2,3-butanodiolu na podłożu syntetycznym. Wydajność produkcji wynosiła $0,33 \text{ g}_{2,3\text{-BD}}/\text{g}_{\text{glukozy}}$ i była zbliżona do rezultatów osiągniętych przy zastosowaniu innych mikroorganizmów, również patogennych.

Dodatkowo stwierdzono, że produkcja 2,3-BD przez szczep *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059

zależała od obecnego w płynie hodowlanym stężenia ekstraktu drożdżowego, CH_3COONH_4 oraz $MnSO_4 \cdot H_2O$. Dla każdego z tych składników, wraz ze zwiększaniem jego zawartości w pożywce, odnotowywano wzrost syntezy 2,3-BD. Czynnikiem istotnie zwiększającym wydajność procesu fermentacji 2,3-BD był kwas octowy, pełniący funkcję aktywatora szlaku metabolicznego syntezy diolu. Z kolei odpowiednio wysokie stężenie jonów dwuwartościowych (w postaci $MnSO_4 \cdot H_2O$) zapewniało prawidłowe funkcjonowanie enzymów tego szlaku, a poprzez to wpływało na końcowy poziom 2,3-BD. Ponadto zaobserwowano, że produkcja 2,3-BD skorelowana była ze wzrostem biomasy komórkowej bakterii, przy czym zależność ta wykazywała charakter prostoliniowy. Suplementacja medium $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ nie wpływała istotnie na produkcję diolu.

LITERATURA

- [1] Ragauskas A. J., Williams C. K., Davison B. H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C. A.: The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311, 2006, 484-498.
- [2] Xiao-Jun J., He H., Ping-Kai O.: Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review, *Biotechnol. Adv.*, 29, 2011, 351-364.
- [3] Hatti-Kaul R., Tornvall U., Gustafsson L., Borjesson P.: Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.*, 25, 2007, 119-124.
- [4] Celińska E., Grajek W.: Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnol. Adv.*, 27, 2009, 715-725.
- [5] Caspi R.: Acetoin biosynthesis I; Acetoin biosynthesis II; Butanediol biosynthesis. *MetaCyc encyclopedia of metabolic pathways*. Available via: <http://metacyc.org/>, 2008.
- [6] Jansen N. B., Tsao G. T.: Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 27, 1983, 85-99.
- [7] Gottshalk G.: *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag; New York, 1986.
- [8] Xiao Z. J., Liu P. H., Qin J. Y., Xu P.: Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 2006, 61-68.

- [9] Yu E. K. C., Saddler J. N.: Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. *Applied and Envir. Microbiol.*, 44, 1982, 777-784.
- [10] Nakashimada Y., Mabwoto B., Kashiwamuba T., Kakizono T., Nishion N.: Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *J. of Biosc. And Bioeng.*, 90, 2000, 661-664.
- [11] Zeng A. P., Biebl H., Deckwer W. D.: Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiol. And Biotechnol.*, 33, 1990, 485-489.
- [12] Garg S. K., Jain A.: Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technol.*, 51, 1995, 103-109.
- [13] Radler F., Zorg J.: Characterization of the enzyme involved in formation of 2-butanol from meso-2,3-butanediol by lactic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 1986, 206-210.
- [14] Mallonee D. H., Speckman R. A.: Development of a mutant strain of *Bacillus polymyxa* showing enhanced production of 2,3-butanediol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1988, 168-171.
- [15] Juni E., Heymi G. A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetyl-methylcarbinol and diacetyl. *J. Bacteriol.*, 72, 1956, 746-753.