

### **Otrzymywanie kwasu cytrynowego z udziałem *Aspergillus niger* metodą hodowli wglębnej w podłożach z glicerolem**

Celem podjętych w ramach niniejszej pracy badań była maksymalizacja biosyntezy kwasu cytrynowego w podłożach zawierających glicerol poprzez zastosowanie okresowych i zasilanych okresowych hodowli wglębnych *Aspergillus niger*.

W pierwszym etapie prowadzonych badań, spośród 19 szczepów *Aspergillus niger* na podstawie uzyskanych wyników, dokonano wyboru szczepu *Aspergillus niger* PD-66, który w podłożach zawierających glicerol bezwodny lub glicerol odpadowy charakteryzował się najwyższą szybkością, wydajnością i efektywnością biosyntezy kwasu cytrynowego.

Dla wybranego szczepu, w oparciu o funkcję użyteczności, ustalono optymalny skład podłoża hodowlanego do biosyntezy kwasu cytrynowego z użyciem glicerolu bezwodnego oraz glicerolu odpadowego. Proces biosyntezy, w którym jako źródło węgla wykorzystano glicerol bezwodny, przebiegał najkorzystniej w podłożu hodowlanym o składzie: glicerol bezwodny –  $150,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  –  $2,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Gdy głównym źródłem węgla był glicerol odpadowy, wówczas skład podłoża hodowlanego był następujący: glicerol techniczny –  $120,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  –  $3,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Kolejny etap badań dotyczący oceny wpływu początkowego stężenia glicerolu na efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego w podłożu hodowlanym, potwierdził przydatność użytej metody optymalizacji wielokryterialnej do projektowania procesów biotechnologicznych. W warunkach optymalnego składu podłoża zawierającego glicerol bezwodny jako główne źródło węgla w okresowych hodowlach wglębnych prowadzonych w bioreaktorze, szczep *Aspergillus niger* PD-66 produkował kwas cytrynowy z najwyższą szybkością, wydajnością i efektywnością biosyntezy kwasu cytrynowego ( $R_P=0,513 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $Y_{P/S}=82,05\%$ ;  $K_{ef}=42,10 \text{ \%} \cdot \text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

W kolejnym etapie badań, w celu maksymalizacji wydajności i efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* PD-66, badano wpływ dodatku sacharozy do

podłoża hodowlanego. W podłożach z glicerolem bezwodnym oraz odpadowym, które suplementowano sacharozą w ilości 10%, szybkość i wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego były wyższe niż w hodowlach bez dodatku sacharozy. Najwyższą szybkość, wydajność i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego ( $R_p=0,607 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ;  $Y_{P/S}=95,80\%$ ;  $K_{ef}=58,15 \text{ \%}\cdot\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ) uzyskano w hodowlach prowadzonych w podłożach z glicerolem bezwodnym i 10% dodatkiem sacharozy.

Kolejne próby intensyfikacji biosyntezy kwasu cytrynowego przy zastosowaniu zasilanych okresowych hodowli wglębnych nie powiodły się. Jednorazowe zasilenie hodowli glicerolem bezwodnym w stężeniu  $35 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  wpłynęło na zmniejszenie stężenia biomasy, hamowało biosyntezę kwasu cytrynowego oraz przyczyniło się do zmniejszenia szybkości objętościowej i właściwej zużycia substratu.

Ewelina Jędrzejko

### **Biosynthesis of citric acid from glycerol in *Aspergillus niger* submerged cultures**

The aim of the study was to maximize the citric acid biosynthesis in media containing glycerol by using batch culture and fed batch culture of *Aspergillus niger*.

In the first stage of the study, out of the 19 *Aspergillus niger* strains, the *Aspergillus niger* PD-66 was selected. It was characterized by the highest rate, yield and efficiency of citric acid biosynthesis in the media containing anhydrous glycerol or crude glycerol.

For the selected strain, based on the usability function, the optimum composition of the culture medium for citric acid biosynthesis with anhydrous glycerol as well as waste glycerol was determined. The biosynthesis with use of anhydrous glycerol as a carbon source was most preferred in a culture medium of the following composition: anhydrous glycerol –  $150,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  –  $2,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . When the main source of carbon was crude glycerol, the optimal composition of the culture medium was as follows: crude glycerol–  $120,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  –  $3,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

In the next stage of the study, the effect of initial concentration of glycerol in the culture medium on yield and efficiency of citric acid biosynthesis was assessed. The results of these studies confirmed the usefulness of the multicriteria optimization method for the design of biotechnological processes. Under optimum composition of the substrate with anhydrous glycerol as the main carbon source in batch culture in the bioreactor, *Aspergillus niger* PD-66 produced citric acid at the highest rate, yield and efficiency of citric acid biosynthesis ( $R_P=0,513 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $Y_{P/S}=82,05\%$ ;  $K_{ef}=42,10 \text{ \%} \cdot \text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

In the next stage of the study, to maximize the yield and efficiency of citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger* PD-66, the effect of sucrose addition to the culture medium containing anhydrous and crude glycerol was studied. The rate and yield of citric acid biosynthesis were higher in the medium supplemented with 10% of sucrose than in cultures without the addition of sucrose. The highest rate, yield and efficiency of citric acid biosynthesis were obtained in cultures with anhydrous glycerol and 10% of sucrose.

Further attempts to intensify the biosynthesis of citric acid using fed batch cultures failed. One-time supply of  $35 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  anhydrous glycerol resulted decreasing in biomass concentration, inhibition of citric acid biosynthesis, and decreasing in volume rate and substrate consumption.

Evelina J. Quanta