

Waldemar Podgórski, Elżbieta Gąsiorek, Władysław Leśniak
Katedra Biotechnologii Żywności
Akademia Ekonomiczna we Wrocławiu

PRODUKTY UBOCZNE Z PRZEROBU BURAKÓW CUKROWYCH JAKO SUBSTRATY DO BIOSYNTETY KWASU CYTRYNOWEGO

Streszczenie

Zastosowanie metod hodowli wglębnej i hodowli w podłożach stałych grzybów strzępkowych z gatunku *Aspergillus niger* pozwoliło na wykorzystanie produktów ubocznych powstających w produkcji cukru białego do biosyntezy kwasu cytrynowego. Ilość otrzymanego produktu przy zastosowaniu melasy buraczanej wyniosła 110 g/dm, a wysłodków buraczanych 173 g/kg. Dodatek melasy do wysłodków w ilości 20% pozwolił na dalszy wzrost ilości uzyskanego kwasu do 204 g/kg.

Słowa kluczowe: produkty uboczne, wysłodki buraczane, melasa buraczana, biosynteza, kwas cytrynowy, *Aspergillus niger*

Wprowadzenie

Kwas cytrynowy stosowany jest w produkcji żywności, napojów bezalkoholowych i alkoholowych, w przemyśle olejarskim, farmaceutycznym, metalurgicznym, chemicznym, kosmetycznym, tekstylnym, tytoniowym, tworzyw sztucznych i innych. W ostatnich latach obserwuje się zwiększoną dynamikę produkcji tego kwasu ze względu na zastosowanie cytrynianów w proszkach do prania i środkach czystości, jako zamienników uciążliwych dla środowiska fosforanów [Podgórski 2002]. Do produkcji kwasu cytrynowego najlepiej nadają się substraty o wysokim współczynniku czystości chemicznej, w których zawartość przyswajalnych źródeł węgla jest zbliżona do 100%. Definiowany, limitowany substratowo skład podłoża sprzyja blokadzie przemian cyklu kwasów trójkarboksylowych na etapie syntezy kwasu cytrynowego poprzez inaktywację enzymów odpowiedzialnych za jego dalsze przemiany.

Stosowanie czystych surowców do produkcji kwasu cytrynowego jest jednak mało ekonomiczne, dlatego ostatnio zwraca się uwagę na surowce tańsze, często produkty uboczne lub nawet odpadowe powstające w produkcji przemysłowej. Na uwagę zasługują między innymi odpady powstające w produkcji cukru [Gąsiorek

1999; Ikram-ul-Haq i in. 2002]. Szczególnie interesującą alternatywę dla drogiego cukru białego stanowi melasa i wysłodki buraczane. Melasa może być przerabiana zarówno metodą hodowli powierzchniowej (SF) jak i metodą wglębną (SmF). Bardziej efektywna jest hodowla wglębna, jednakże może być ona stosowana wyłącznie do przerobu surowców płynnych lub rozpuszczalnych w wodzie. Zagospodarowanie odpadów stałych, w tym wysłodków buraczanych, wymaga natomiast wykorzystania hodowli drobnoustrojów w podłożach stałych (ang. solid-state (SSF)) [Gąsiorek 1999, Podgórski i in. 2004a; Podgórski i in. 2004b; Holker i in. 2004].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wyników badań nad zastosowaniem produktów odpadowych i ubocznych powstających w produkcji cukru z buraków cukrowych i porównanie ich z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu znacznie droższego produktu końcowego przerobu buraków, jakim jest cukier biały.

Materiały i metody

W badaniach stosowano: - cukier biały, - wysłodki buraczane o następującym składzie (%): woda 8-12, sucha substancja 88-92. W skład suchej substancji wysłodków wchodziły: celuloza i hemicelulozy 34-38, pektyny 34-40, cukry 4-7, białka 6,5-8,0, tłuszcze 0,5-0,7, związki mineralne 3,5-4,5; - melasę buraczaną o składzie (%): sucha substancja 82,4, cukry ogółem 57,07, cukry redukujące 0,7, substancje niecukrowe 25,3, popiół 9,5, azot ogólny 1,8. Hodowle w podłożach stałych (SSF) prowadzono w poziomym reaktorze obrotowym Biosol (AE Wrocław), o pojemności całkowitej 7 dm³. Hodowle wglębne - prowadzono w reaktorach zbiornikowych z mieszałem (STR) MicroFerm Fermenter MF114 (New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick, USA oraz Biomer 10 - (AE Wrocław), o pojemności całkowitej odpowiednio 14 i 7 dm³. Kwas cytrynowy (C₆H₈O₇·H₂O) oznaczano metodą HPLC oraz metodą miareczkową z zastosowaniem pirydyny i bezwodnika octowego. Aktywność endoglukanazową oznaczano przy użyciu 1% roztworu karboksymetylocelulozy (Sigma) w 0,05 M buforze octanowym o pH 4,8 jako substratu CM-celulazy. Aktywność egzoglukanazową oznaczano przy użyciu bibuły filtracyjnej Whatman nr 1 jako substratu dla FP-azy.

Wyniki badań i ich omówienie

Optymalny skład podłoża definiowanego dla biosyntezy kwasu cytrynowego jest stosunkowo prosty i zawiera rozpuszczone w wodzie wodociągowej (g/dm): cukier biały 150 – 200, NH₄NO₃ 2,0, KH₂PO₄ 0,2, MgSO₄·7H₂O 0,2. Odczyn środowiska 2,6 – 2,8. Zastosowanie tak zdefiniowanego ilościowo podłoża do fermentacji kwasu cytrynowego metodą wglębną pozwala na uzyskanie wysokiej wydajności produktu ($Y_{P/S}$) na poziomie wyższym od 90% (tabela 1).

Tabela 1. Podstawowe parametry hodowli wstępnej *Aspergillus niger* w podłożach z cukrem białym, melasą buraczaną i hodowli w podłożach stałych na wystódkach buraczanych

Table 1. Basic parameters of submerged cultures of *Aspergillus niger* on substrates with white sugar, beet molasses, and cultivation in solid state substrates of beet pulp

Określenie	Oznaczenie	J.m	Metoda hodowli wstępnej			Metoda hodowli w podłożach stałych	
			Optymalne podłoże definiowane	Optymalne podłoże kompleksowe	Optymalne podłoże kompleksowe	Optymalne podłoże kompleksowe	
			Intensywne natlenianie	Intensywne natlenianie	Sterowanie aktywnością oddechową	Dodatek melasy	
Substrat	-	-	Cukier biały	Melasa	Melasa	Wysłodki	Wysłodki
Szczep <i>A.niger</i>	-	-	W78B	W78B	W78B	S	S
Wsp. czyst. podłoża	α	%	~100	64	64	<4	<4
pH początkowe	-	-	2,7	6	6	5,4	5,5
pH końcowe	-	-	1,6	3,1	2,8	2,9	2,9
Cukier początk.	S	g/kg	150	126	129	45,0	180
Cukier końcowy	S_k	g/kg	<1	3	2	150	111
Kwas cytrynowy	P	g/kg	138 (3,0)	49,4 (2,1)	110 (2,7)	173 (3,2)	204 (3,1)
Biomasa	X	g/kg	11	13,9	14,5	28,7	25,6
Czas fermentacji	t	dni	6,2	9,0	6,8	6,0	6,0
Wydajność	$Y_{P/S}$	%	92	39	87	17	20
Produktywność	Q_p	g/dm ³ /h	0,92	0,23	0,68	1,44	2,13

W nawiasach podano odchylenie standardowe od prezentowanych w tabeli wartości średnich

Zamiana czystego substratu na melasę buraczaną spowodowała zmniejszenie wydajności kwasu cytrynowego z około 90 do 39%, czyli więcej niż o połowę. Przyczyną tego zjawiska była destrukcja kontrolnych właściwości definiowanego medium hodowlanego na skutek wprowadzenia z melasą buraczaną szeregu makro i mikroelementów, które sprzyjały raczej wzrostowi biomasy drobnoustrojów niż

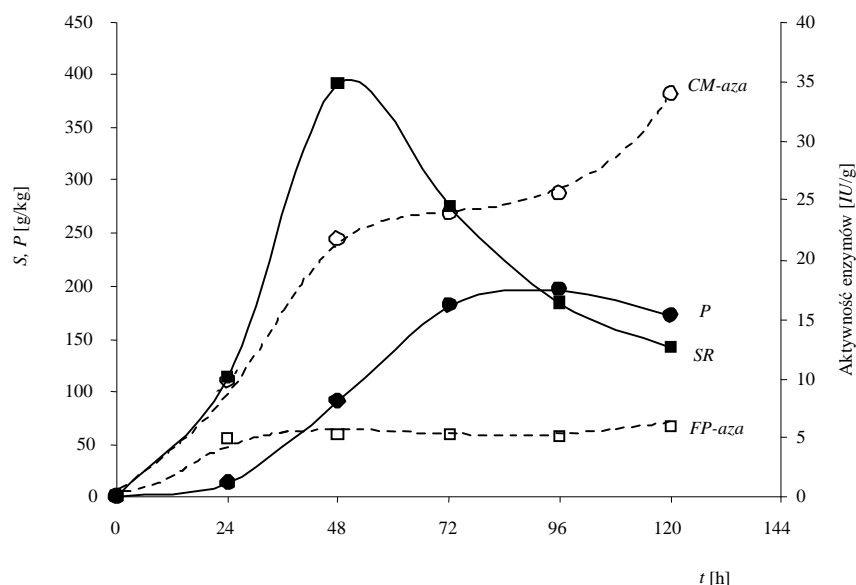
nadprodukcji kwasu cytrynowego. Istotne znaczenie w kształtowaniu niższej wydajności fermentacji miał także brak możliwości obniżenia odczynu podłoża ze względu na znaczną buforowość stosowanego surowca.

W wyniku szeregu doświadczeń stwierdzono, że skutecznym czynnikiem regulującym intensywność nadprodukcji kwasu cytrynowego w podłożach melasowych może być limitowanie dostępu tlenu pełniącego rolę substratu ograniczającego wzrost biomasy i blokadę przemian cyklu Krebsa na etapie dalszych przemian cytrynianu¹ [Podgórski 2002]. Stwierdzono, że wysokie natlenianie podłoża z melasą buraczną obniża zarówno aktywność kwasotwórczą grzybni w fazie akumulacji kwasu cytrynowego, jak i wydajność całego procesu, przyczyniając się, w warunkach wysokiego pH, do intensyfikacji syntezy kwasu glukonowego, którego stężenie w podłożu może być zbliżone do ilości kwasu cytrynowego. Parametrami kontrolnymi intensywności natleniania hodowli, skutecznie regulującymi efektywność fermentacji, mogą być parametry metaboliczne *Aspergillus niger* mierzone w sposób ciągły w postaci objętościowej szybkości przyswajania tlenu (QO_2) i wydzielania dwutlenku węgla (QCO_2), odzwierciedlające aktywność oddychową hodowanego szczepu [Podgórski 2004].

W fazie akumulacji produktu (od 72 h) utrzymywano stężenie tlenu rozpuszczonego na niskim poziomie, około 10% stanu nasycenia, co korzystnie ograniczało intensywność oddychania *A. niger*. W efekcie, duża szybkość asymilacji tlenu (QO_2) przy stosunkowo małej szybkości wydzielania dwutlenku węgla (QCO_2) hamowała rozwój biomasy i sprzyjała wzrostowi szybkości biosyntezy kwasu cytrynowego. W rezultacie przeprowadzonych badań uzyskano wzrost stężenia kwasu cytrynowego z około 50 do ponad 110 g/dm³ (tabela 1). Maksymalna produktywność fermentacji kształtowała się na poziomie 1,5 g/dm³/h, natomiast wartość średnia tego parametru dla całego procesu wyniosła 0,7 g/dm³/h. W wyniku fermentacji uzyskano wydajność produktu ($Y_{P/S}$) na poziomie 90%, czyli zbliżoną do wydajności otrzymywanych w podłożach z cukrem białym, przy nieco niższej produktywności procesu. Melasa, ze względu na swoją postać, mogła być przerabiana metodą hodowli wglębnej, natomiast wysłodki buraczane wymagały zastosowania hodowli w podłożach stałych. Głównym źródłem węgla i energii w wysłodkach buraczanych nie jest łatwo przyswajalna przez mikroorganizmy sacharoza, jak to ma miejsce w przypadku stosowania cukru białego lub melasy buraczanej, lecz celuloza, hemicelulozy, pektyny i tłuszcze, czyli substraty, których utylizacja wymaga znacznie bardziej rozwiniętego aparatu enzymatycznego drobnoustrojów. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że szybkość rozkładu celulozy do cukrów prostych nie stanowi czynnika limitującego efektywność biosyntezy kwasu

¹ W podłożach definiowanych rolą substratów ograniczających normalny rozwój *a.niger* pełni azot i fosfor.

cytrynowego. Co więcej, zastosowanie hodowli w podłożach stałych pozwoliło na uzyskanie znacznie wyższych ilości produktu, nie tylko w stosunku do fermentacji wgłębnej podłoży melasowych, ale również w odniesieniu do podłoży definiowanych z cukrem białym (tabela 1, rys. 1).



SR – stężenie substancji redukujących, P – stężenie produktu, t – czas, CM-aza – stężenie enzymu CM-azy, FP-aza – stężenie enzymu FP-azy

SR – concentration of reducing substances, P – product concentration, t – time, CM-ase – concentration of the CM-ase enzyme, FP-ase – concentration of FP-ase

Rys. 1. Kształtowanie się wybranych wartości parametrów hodowli *Aspergillus niger* w podłożach stałych na wysłodkach buraczanych

Fig. 1. Selected parameter values of *Aspergillus niger* cultivation on solid substrates of beet pulp

Dalszą poprawę efektywności procesu biosyntezy uzyskano poprzez dodanie do wysłodków melasy w ilości 20%. Ilość otrzymanego kwasu cytrynowego była w tym przypadku najwyższa i wyniosła 204 g/kg (tabela 1). Z analizy danych Tabeli 1 wynika jednak, że hodowla w podłożach stałych charakteryzuje się niższymi wartościami otrzymywanych wydajności w stosunku do hodowli wgłębnej. Nie jest to jednak cecha metody, a raczej efekt różnicy w rodzaju stosowanych substratów. Przyczyną niższych wydajności uzyskiwanych z użyciem wysłodków jest przede wszystkim gorsza przyswajalność produktów hydrolizy polisacharydów (głównie celulozy), będących podstawowym źródłem węgla, w stosunku do łatwo przyswajalnej przez pleśnie sacharozy zawartej w cukrze białym i melasie.

Hodowla mikroorganizmów w podłożach stałych stwarza szansę na ekonomiczną bioutylizację szeregu innych odpadów przemysłu rolno-spożywczego. Odpady te mogłyby być zastosowane do bioprodukcji białek, enzymów, kwasów organicznych, dodatków do żywności, biopestycydów, grzybów, barwników, gumy ksantanowej, hormonów itd. [Soccol i Vandenberghe 2003; Podgórski i in. 2004].

Wnioski

1. Zastosowanie melasy buraczanej i optymalizacja jej przerobu metodą fermentacji węgłej, polegająca na regulacji dostępu tlenu do komórek drobnoustrojów, pozwoliła na otrzymanie stężenia kwasu cytrynowego w ilości 110 g/dm³.
2. Wysłodki buraczane przerabiane metodą hodowli w podłożach stałych umożliwiają uzyskanie stężenia produktu w ilości 170 g/kg¹, a więc na poziomie znacznie przewyższającym rezultaty uzyskane nie tylko na melasie ale również w odniesieniu do podłoży definiowanych z cukrem białym.
3. Najlepsze rezultaty fermentacji uzyskano wzbogacając wysłodki buraczane w 20% dodatek melasy. Pozwoliło to na wzrost ilości otrzymanego produktu do 204 g/kg¹.
4. Przeprowadzone badania wykazały wysoką przydatność produktów ubocznych przerobu buraków cukrowych (melasy buraczanej i wysłodków) do produkcji wysokowartościowego metabolitu syntezy mikrobiologicznej, jakim jest kwas cytrynowy, stwarzając szansę na ich wartościowsze niż dotychczas zastosowanie (pasza dla zwierząt lub substrat do produkcji etanolu).

Bibliografia

Gąsiorek E., 1999. Badania nad biosyntezą kwasu cytrynowego metodą hodowli w podłożu stałym (solid state). Praca doktorska. AE Wrocław.

Holker U., Hofer M., Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64 (2) 175-86.

Ikram-ul-Haq., Sikander A., Qadeer M.A., Javed I. 2002. Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. *Electronic Journal of Biotechnology* [online], 5(2).

Podgórski W. 2002. Kształtowanie aktywności oddechowej i kwasotwórczej *Aspergillus niger* podczas produkcji kwasu cytrynowego w podłożach z melasą trzcinową. (Modeling of respiratory and acidogenic activity of *Aspergillus niger*

during citric acid production in cane molasses media). Prace Nauk. 914. Monografie i opracowania nr 144, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej, Wrocław.

Podgórski W. 2004. Monitorowanie aktywności metabolicznej *A. niger* w procesie sterowania biotransformacją glukozy do kwasu glukonowego w systemie on-line. Biotechnologia, 1 (64) 169-186.

Podgórski W., Gąsiorek E., Leśniak W. 2004a. Using of organic wastes from sugar factory as raw materials for organic acids production. 31th International Conference of Chemical Engineering, SSCHE 2004. Tatranské Matliare. 074, s. 1-8.

Podgórski W., Gąsiorek E., Leśniak W., Gadomski K. 2004b. Bioutilization and biotransformation of wastes and byproducts from food industry into organic acids. Acta Sci. Pol. Biotechnologia, 3 (1-2) 55-66.

Soccol C. R., Vandenberghe L.P.S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochem. Eng. J., 13 (2-3) 205-218.

USING BYPRODUCTS AND ORGANIC WASTES FROM SUGAR BEET PROCESSING AS RAW MATERIALS FOR BIOLOGICAL CITRIC ACID PRODUCTION

Summary

Using two methods of fermentation: submerged and solid state for cultivation of *Aspergillus niger* allowed utilizing byproducts originated in white sugar production for citric acid biosynthesis. The amount of product obtained from beet molasses and sugar beet pulp amounted to 110 g/dm³, and 173 g/kg¹ respectively. Enrichment of sugar beet pulp with 20% of molasses increased citric acid concentration up to 204 g/kg¹.

Key words: byproducts, beet pulp, beet molasses, biosynthesis, citric acid, *Aspergillus niger*