

УДК 66.021.2.065.5

Н.Г. ДЕМИНА, Н.Ф. РУМЯНЦЕВА, С.В. АНТОНОВА, Д.А. ЛУКЬЯНОВ, А.С. ФЕДОРОВ, П.Ю. БОНДАРЕНКО, А.Ю. ГУЛЕВИЧ, В.Г. ДЕБАБОВ*

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: debabov@genetika.ru

Выделение янтарной кислоты из ферментационных растворов методом прямой кристаллизации

Показано, что янтарная кислота может быть выделена из культуральной жидкости (КЖ), полученной при выращивании как бактерий *Escherichia coli* при нейтральных рН, так и дрожжей *Yarrowia lipolytica* при низких значениях рН. Метод основан на прямой кристаллизации целевого продукта из КЖ, включает небольшое число простых стадий, не связан с использованием органических растворителей, мембран и ионообменных смол. Единственными расходными материалами являются активированный уголь и соляная кислота. Такой способ обеспечивает высокий выход (80—90%) и 97%-ную чистоту кристаллов янтарной кислоты.

Ключевые слова: культуральная жидкость, очистка активированным углем, прямая кристаллизация, янтарная кислота.

Янтарная кислота (этан-1,2-дикарбоновая) в 2004 г. включена Министерством энергетики США в список 12 соединений, которые должны стать основой для перехода химии с нефтяного на возобновляемое сырье [1].

В настоящее время разработана технология микробиологического производства янтарной кислоты. В 2014 г. 70% всего данного продукта в промышленности (около 40 тыс. т) было получено с помощью микробного синтеза. Вместе с тем, в мире еще не существует общепринятой технологии производства биоянтарной кислоты. Для ее биосинтеза компании используют различные бактерии (*Escherichia coli*, *Basfia succiniproducer*, *Corynebacterium glutamicum*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) и разные способы

очистки продукта из ферментационных растворов (см., например, [2, 3]).

Все процессы с использованием бактерий проводятся анаэробно и при нейтральном рН и, следовательно, в КЖ присутствуют соли янтарной кислоты. Сама кислота образуется при добавлении щелочи для поддержания рН в процессе ферментации и минеральной кислоты для выделения продукта из солей. Процесс с использованием дрожжей может проходить при более низком рН, что позволяет экономить реагенты. Вместе с тем, ферментация с использованием дрожжей осуществляется при аэробных условиях, что снижает конверсию глюкозы в янтарную кислоту и увеличивает энергозатраты, связанные с аэрацией.

Демина Наталья Георгиевна, Румянцева Надежда Фридриховна, Антонова Светлана Владимировна, Лукьянов Дмитрий Александрович, Федоров Александр Сергеевич, Бондаренко Павел Юрьевич, Гулевич Андрей Юрьевич, Дебабов Владимир Георгиевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; КЖ — культуральная жидкость; ОП — оптическая плотность; ОП₆₀₀ — оптическая плотность при длине волны 600 нм.

* Автор для переписки.

До 60% затрат при производстве биоянтарной кислоты может приходиться на процесс ее выделения и очистки из ферментационной жидкости (КЖ). В литературе описаны десятки методов очистки, включая ионный обмен, мембранные технологии, этерификацию, реагентную экстракцию, осаждение в виде кальциевой соли, прямую кристаллизацию и др. [3, 4]. Каждый из предлагаемых методов очистки имеет свои преимущества и недостатки, однако все они характеризуются многостадийностью и использованием широкого набора реагентов.

Целью данной работы была адаптация эффективного способа выделения янтарной кислоты из ферментационных растворов бактерий и дрожжей — продуцентов янтарной кислоты с использованием метода прямой кристаллизации продукта.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы. Штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* [6] и бактерий *E. coli* [5] были получены в Институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов в предыдущие годы [5—7].

Ферментация с использованием дрожжей. Посевной материал *Y. lipolytica* выращивали в пробирках в течение 24 ч при 30° на качалке при 250 об/мин в 10 мл минеральной среды следующего состава (все реактивы отечественного производства марки «х.ч.» или «ч.д.а.»), г/л: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 6,0; KH_2PO_4 — 0,71; NH_4Cl — 11,77; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,65; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,65; CaCl_2 — 0,111; лимонная кислота — 1,8; раствор микроэлементов — 4,6 мл (состава, г/л: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 6,0; KI — 0,088; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 3,0; H_3BO_3 — 0,2; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,955; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 42,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 65,0); H_2SO_4 концентрированная — 0,5; глюкоза — 25; L-лейцин — 1,0. В качестве источника витаминов вносили биотин — 0,2 мг/л и тиамин — 1,0 мг/л. pH среды доводили до 7,0 с помощью 10 М раствора NaOH. Содержимое 4 пробирок вносили в посевную колбу емкостью 750 мл, содержащую 100 мл раствора того же состава, и выращивали в тех же условиях 24 ч.

Y. lipolytica культивировали также в ферментере объемом 3 л с рабочим объемом 1 л (BiostatB, Brown Biotech). Посев осуществляли внесением 100 мл раствора из посевной колбы. Состав среды был тот же, что и при выращивании посевного материала, но концентрация глюкозы была увеличена до 95 г/л. Расход воздуха составил

1 л/мин, температура — 30°, частота вращения мешалки — 700 об/мин. В ферментере контролировали значение pH (датчик Mettler Toledo, In Pro 3030, Швейцария) и концентрацию кислорода (датчик Mettler Toledo, In Pro 6800).

Ферментацию осуществляли в два этапа. На первом этапе pH поддерживали на уровне 5,5 путем добавления 10 М раствора NaOH. Через 42 ч ОП₆₀₀ суспензии достигала 30, и эту суспензию использовали на втором этапе в качестве посевного материала.

Второй этап культивирования проводили в том же ферментере и тех же условия роста за исключением того, что начальная концентрация глюкозы была 50 г/л. Среду в ферментере инокулировали 10% посевного материала, полученного на первой стадии. На этом этапе поддержание pH не осуществляли и производили подпитку раствором глюкозы (700 г/л). После 54 ч ферментации КЖ собирали и анализировали в ней конечную концентрацию янтарной кислоты, которая составляла 45 г/л. Содержание в КЖ компонентов типовой ферментации приведено в табл. 1.

Ферментация с использованием бактерий. Посевной материал выращивали в пробирках на среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы. Далее процесс осуществляли в две стадии: аэробной ферментации — для получения биомассы и анаэробной — для биосинтеза янтарной кислоты.

Для выращивания в ферментере объемом 1 л его заполняли 450 мл нейтрализованной комбинированной среды (3 г/л KH_2PO_4 , 6,8 г/л $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1 г/л NaCl; 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,25 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 мг/л тиамина; 40 мл/л кислотного гидролизата пшеничного глютеина, 100 мг/л ампициллина (коммерческий лекарственный препарат), 2 г/л глюкозы). Аэробное накопление биомассы происходило при 37°, частоте вращения мешалки 800 об/мин и потоке воздуха 0,6 л/л/мин. После достижения ОП₆₀₀ биомассы ~20 аэрацию прекращали и концентрацию глюкозы доводили до 70 г/л. Далее ферментер работал без аэрации; частота вращения мешалки составляла 250 об/мин; pH поддерживали на уровне около 7,0 с помощью 12,5%-ного раствора NH_4OH . Через среду барботировали углекислый газ со скоростью 0,5 л/ч. Культивирование останавливали через 48 ч. Концентрация янтарной кислоты к концу ферментации составляла 49 г/л (см. табл. 1).

Выделение янтарной кислоты. Для тестирования возможностей метода прямой кристаллизации очистке подвергали ферментационные растворы с невысокой концентрацией янтарной кисло-

Состав ферментационных растворов для очистки янтарной кислоты

Штамм	pH	Янтарная кислота, г/л	Сахара, г/л	Сырая биомасса*, г/л	Органические кислоты, г/л
<i>Yarrowia lipolytica</i>	3,6	45	Глюкоза — 29,9 Фруктоза — 0,3	36,6	Уксусная — 3,11 Пропионовая — 1,40 Фумаровая — 0,05 Лимонная — 0,80 α -Кетоглутаровая — 2,48 Аспарагиновая — 0,98 Пировиноградная — 1,60
<i>Escherichia coli</i>	8,8	49	Глюкоза — 34,7 Глицерин — 2,0	24,6	Уксусная — 3,70 Пропионовая — 1,10 Фумаровая — 0,05 Лимонная — 0,04 α -Кетоглутаровая — 0,30 Яблочная — 0,35

* Биомассу отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 8000 об/мин (14,9 G).

ты и с высокой остаточной концентрацией глюкозы (см. табл. 1).

Выделение проводили с использованием одних и тех же ферментационных растворов в трех повторностях. В стандартном опыте объем КЖ составлял 400 мл. Клетки отделяли от ферментационной жидкости центрифугированием в течение 30 мин при 14900 g. Выход влажной биомассы указан в табл. 1. В надосадочной жидкости КЖ, полученной после бактериальной ферментации, pH доводили до 6,5 добавлением концентрированной HCl (отечественного производства, х.ч.) и пропускали ее через слой активированного угля (Sigma-Aldrich, меш 100—400, необработанный порошок), помещенного в высокий стеклянный фильтр. Надосадочную жидкость, полученную после дрожжевой ферментации, очищали на угле без изменения pH, т.е. при pH 3,6. Количество угля варьировали от 13% до 6% (масса/объем) (процент от надосадочной жидкости). Сорбент отмывали дистиллированной водой в объеме, десятикратно превышающем массу угля. pH объединенного фильтрата и промывных вод доводили до 2,0 концентрированной соляной кислотой, и смесь упаривали на ротаторном испарителе при 60° до концентрации янтарной кислоты 140—150 г/л. Кристаллизация проходила в холодильнике при 5° в течение 24 ч. Кристаллы отделяли на охлажденном

стеклянном фильтре № 16 отечественного производства, промывали ледяной водой и высушивали 8 ч при 60°. В результате получали хорошо сформированные кристаллы белого цвета. Чистота продукта составляла около 97%.

Аналитические процедуры. Концентрацию органических кислот в осветленной центрифугированием КЖ определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографа Alliance (Separations Modul Waters 2695, Photodiode Array Detector Waters 2996) и колонки YMC-Triart со следующими характеристиками: 18,5 мкм, 12 нм, (250 × 4,6) мм. Детекцию осуществляли при длине волны 210 нм. В качестве элюента использовали 0,1%-ную H₃PO₄. Скорость протока составляла 1,0 мл/мин, температура — 30°, время анализа — 20 мин.

Содержание сахаров в растворах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance фирмы Waters с рефрактометрическим детектором Waters 2414. Использовали колонку YMC-Pack Polyamine II (5 мкм, 12 нм, 250 мм Ч 4,6 мм). Состав подвижной фазы был следующий: ацетонитрил—H₂O—этилацетат (76:40:4), скорость протока была равна 1,5 мл/мин, температура — 50°, время анализа — 10 мин.

Обработку всех хроматографических данных проводили с использованием компьютерной системы “Empower Pro”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферментационные растворы, использованные в данном исследовании, содержали большое количество глюкозы (около 30 г/л) и заметные количества других примесей, особенно органических кислот (около 10 г/л для дрожжей и 5 г/л для бактерий, см. табл. 1).

Объем отделенной центрифугированием влажной биомассы составил 2—3,5% от объема КЖ. Такое же количество янтарной кислоты теряется с биомассой (табл. 2).

Осветленную центрифугированием КЖ пропускали через слой активированного угля, подготовленного, как описано в разделе «Условия эксперимента», и помещенного в высокий стеклянный фильтр. Процедура очистки на угольном фильтре описана выше. Время пропускания раствора составляло около 30 мин.

Потери при осветлении дрожжевой КЖ составили около 12% и в 2 раза превосходили потери для бактериальной КЖ (около 6%) (см. табл. 2). Возможно, это связано с различием pH осветляемых растворов. В предварительном эксперименте мы пытались осветлить фильтрацией через уголь КЖ после снижения ее pH до 2,0, но в этом случае нам не удалось получить кристаллы янтарной кислоты. Определение оптимума pH в процессе угольной очистки потребует дополнительных исследований.

Осветленные растворы упаривали в вакууме при 60° на роторном испарителе. Эта стадия не приводит к потере целевого продукта. Такие потери (с маточным раствором) неизбежны при кристаллизации; они составляли 7—9% для обоих растворов. В табл. 2 суммированы данные по выходу янтарной кислоты в процессе очистки. Для бакте-

риальной КЖ он составил около 90%, а для дрожжевой — около 80% при одинаковой чистоте конечного продукта, равной примерно 97%. При очистке удаляются практически все сахара и большая часть органических кислот (рисунок). В конечном продукте детектируется небольшая примесь фумаровой кислоты (около 0,2%).

Маточные растворы, которые содержат глюкозу в высокой концентрации (60—120 г/л), а сумму органических кислот и янтарную кислоту — в низких (около 10 г/л и 12—15 г/л, соответственно) вряд ли целесообразно использовать для дальнейшей очистки янтарной кислоты. Вместе с тем, все содержащиеся в маточном растворе компоненты при необходимости могут без особых трудностей подвергнуться биологической очистке.

Полученные нами данные превосходят результаты, описанные китайскими исследователями [8], использовавшими сходный метод для очистки янтарной кислоты из КЖ *Actinobacillus succinogenes*. В приведенной статье были достигнуты выход янтарной кислоты в 70% и чистота продукта 90%, при этом было использовано большое количество угля (20% масса/объем). В работе не приводится марка угля и постадийные потери, что затрудняет детальное сравнение наших данных с данными цитируемой статьи [8].

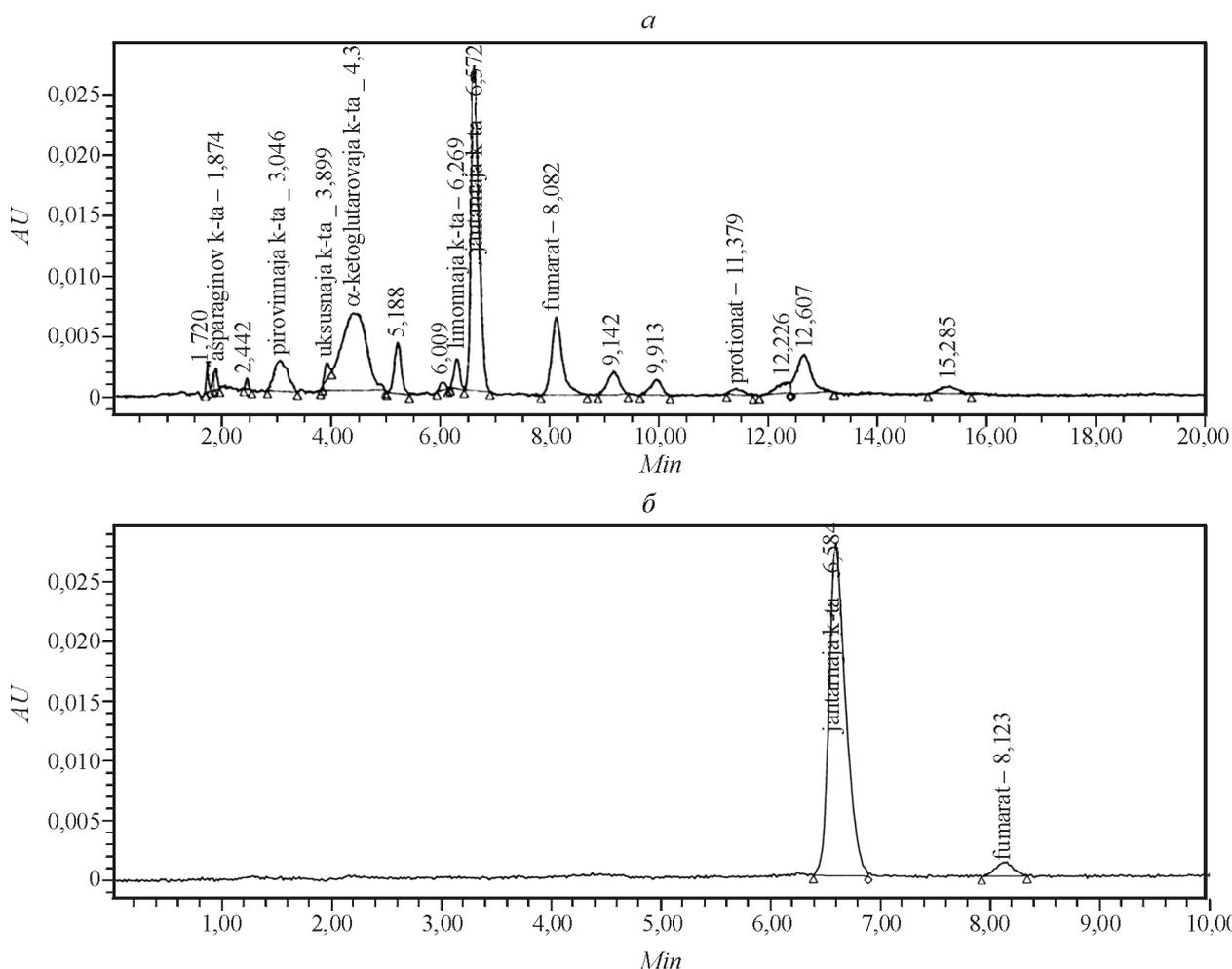
Очевидно, что при попытках масштабирования приведенного здесь метода могут встретиться трудности с отделением биомассы, особенно в случае с бактериями. В литературе описано удаление клеток *E.coli* методом ультрафильтрации. Так, была создана схема непрерывного отбора КЖ через систему полых волокон с возвращением биомассы в ферментер [9]. За 55 ч культивирования из ферментера объемом 7 л было отобрано 1,5 л КЖ. Эту жидкость смешивали с активированным уг-

Таблица 2

Постадийные потери при очистке янтарной кислоты*

Стадии	Культуральная жидкость дрожжевой ферментации, %	Культуральная жидкость бактериальной ферментации, %
Отделение биомассы	96±1	96±1
Осветление углем	84±1	93±1
Упаривание	84±1	93±1
Кристаллизация и сушка	78±1	88±1

* В таблице даны % от первоначального содержания янтарной кислоты в ферментационной жидкости.



Хроматограмма дрожжевой КЖ после отделения клеток центрифугированием (состав органических кислот приведен в табл. 1) (а) и хроматограмма очищенной кристаллической янтарной кислоты (б). Примесь фумаровой кислоты в очищенном продукте составляет 0,2 %

лем (5% масса/объем), выдерживали 4 ч при температуре 30°, фильтровали, упаривали в вакууме при 60°, доводили pH раствора до 2,0 концентрированной серной кислотой и подвергали его кристаллизации в течение 24 ч при 4°. Кристаллы отделяли и сушили. Выход составил 75% при чистоте продукта 98—99%. Эти результаты сопоставимы с нашими данными.

Главным препятствием в использовании ультрафильтрации в промышленных масштабах является засорение мембран. Изучение механизма этого явления в процессе очистки янтарной кислоты продолжается [10].

Предложенный недавно для выделения янтарной кислоты метод ATPS (Aqueous Two-Phase System) не требует ультрафильтрации и центрифугирования для отделения бактериальных клеток (они остаются в водно-солевой фазе) и дает хороший выход (77%) и высокую чистоту продукта

(98,7%). Недостатком метода является использование органических растворителей (ацетон, метанол) и необходимость регенерации растворителей и сульфата аммония [11].

Для получения янтарной кислоты с помощью дрожжей, которые достаточно легко могут быть удалены из раствора сепарацией, предложенный метод прямой кристаллизации кажется наиболее простым и вполне масштабируемым процессом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (уникальный идентификатор REMEF162514X0005) с использованием уникальной научной установки (УНУ) Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (Уникальный идентификатор REMEF159214X0002).

Получено 15.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Top Value Added Chemicals from Biomass [Eds. T. Werpy, G. Petersen]. — Washington DC:USD DE, 2004.
2. Дебабов В.Г. Перспективы производства биоянтарной кислоты // Биотехнология. — 2015. — № 2. — С. 27—32.
3. Kurzrock, T. Recovery of succinic acid from fermentation broth / T. Kurzrock, D. Wenster-Botz // Biotechnol. Lett. — 2010. — V. 32. — P. 331—339.
4. Ke-Ke, Cheng. Down stream processing of biotechnological produced succinic acid / Cheng Ke-Ke, Zhao Xue-Bing, Zeng Jing, Wu Ru-Chuu, Xu Yun-Zhen, Lin De-Hua, Zhang Ji-an-An // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — V. 95. — P. 841—850.
5. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* — продуцент янтарной кислоты (варианты) и способ получения янтарной кислоты с использованием этого штамма. // Патент РФ 2528056, С 12 N 1/21, С 12 P 7/46, С 12 N 15/63. 2014.
6. Синецкий С.П., Соболевская Т.И., Лукина Г.П., Юзбашев Т.В., Юзбашева Е.Ю., Лантев И.А., Выборная Т.В. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3753 — продуцент янтарной кислоты // Патент РФ 2487931, С 12 N 1/16, С 12 P 7/46, С 12 P 7/50, С 07 C 55/10. 2013.
7. Skorokhodova, A.Yu. Manipulating puruvate to acetyl-CoA conversion in *E.coli* for anaerobic succinate biosynthesis from glucose with the yield close to the stoichiometric maximum / A.Yu. Skorokhodova, A.A. Morzhakova, A.Yu. Gulevich, V.G. Deba-bov // J. Biotechnol. — 2015. — V. 214. — P. 33—42.
8. Qiang, Li. One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization / Li Qiang, Wang Dan, Wu Yong, Li Wangliang, Zhang Yunjian, Xing Jianmin, Su Zhiguo // Separ. Purif. Technol. — 2010. — V. 72. — P. 294—300.
9. Caixia, Wang. Novel membrane-based biotechnological alternative process for succinic acid production and chemical synthesis of bio-based poly(butylene succinate) / Wang Caixia, Ming Wei, Yan Daojiang, Zhang Congcong, Yang Mao-hua, Li Yilau, Zhang Yu, Guo Baohua, Wan Yinhua, Xing Janmin // Bioresource Technol. — 2014. — V. 156. — P. 6—13.
10. Caixia, Wang. Membrane fouling mechanism in ultrafiltration of succinic acid fermentation broth / Wang Caixia, Li Qiang, Tang Huang, Yan Daojiang, Zhou Wei, Xing Jianmin, Wan Yinhua // Bioresource Technol. — 2012. — V. 116. — P. 366—371.
11. Bo, Hua Gu. Aquensa two-phase system: An alternative process for recovery of succinic acid from fermentation broth / Hua Gu Bo, Zheng Pu, Yan Qiang, Lin Wei // Separ. Purif. Technol. — 2014. — V. 138. — P. 47—54.

N.G. DEMINA, N.F. RUMIANTSEVA, S.V. ANTONOVA, D.A. LUKIANOV, A.S. FEDOROV, P.Yu. BONDARENKO, A.Yu. GULEVICH, and V.G. DEBABOV*

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

e-mail: debabov@genetika.ru

Isolation of Succinic Acid from Fermentation Broths by Direct Crystallization

It has been shown that succinic acid can be isolated from culture liquid obtained by growing *Escherichia coli* at neutral pH or *Yarrowia lipolytica* yeast at low pH values. The method is based on the direct crystallization of the target product from CL, includes a few simple stages, and does not require organic solvents, membranes or ion-exchangers. Activated carbon and hydrochloric acid are the only consumables needed. The method permits to achieve a high yield (80—90%) and 97% purity of succinic acid.

Key words: direct crystallization, fermentation broth, purification by activated carbon, succinic acid.

* Author for correspondence.