

EWA WALASZCZYK, WALDEMAR PODGÓRSKI, DOMINIK MARZEC

WPLYW MAKROELEMENTÓW NA PROCES BIOSYNTETY KWASU SZCZAWIOWEGO Z GLICEROLU PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER*

Streszczenie

Kwas szczawiowy jest najprostszym organicznym kwasem dikarboksylovym. Równocześnie jest to bardzo rozpowszechniony kwas roślinny. Pomimo swoich toksycznych właściwości stosowany jest w produkcji żywności jako: inhibitor enzymatycznego brązowienia owoców, stabilizator poprawiający zapach produktów spożywczych i czynnik klarujący. Ze względu na zwiększające się ilości odpadowego glicerolu, powstającego w produkcji biodiesla, nasilają się badania dotyczące wykorzystania go jako źródła węgla w procesach biotechnologicznych.

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania glicerolu jako źródła węgla i energii w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego przez szczep *Aspergillus niger* W78C w hodowlach wstrząsanych oraz ustalenie optymalnego stężenia makroelementów w podłożu stosowanym w tym procesie.

Glicerol w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego okazał się dobrym źródłem węgla i energii. Najlepsze wyniki bioprodukcji – ponad 43 g dm⁻³ kwasu szczawiowego – uzyskano w wariancie z podłożem zawierającym: 1,30 g dm⁻³ NH₄NO₃, i po 0,3 g dm⁻³ KH₂PO₄ i MgSO₄·7H₂O. Brak fosforu w podłożu był czynnikiem krytycznym wzrostu biomasy, co znacząco ograniczało syntezę kwasu szczawiowego. Istotnym składnikiem podłoża był także azot. Hodowla realizowana w wariancie ze zbyt małym stężeniem tego pierwiastka (0,12 g NH₄NO₃ dm⁻³) charakteryzowała się słabym wzrostem biomasy i niskimi wartościami stężenia produktu. Obecność soli magnezu nie była krytyczna dla przebiegu procesu. Brak dodatku do podłoża tego składnika ograniczał przyrost produktu o około 2 g dm⁻³.

Słowa kluczowe: kwas szczawiowy, *Aspergillus niger*, biosynteza, glicerol, biodiesel

Wprowadzenie

Kwas szczawiowy jest najprostszym organicznym kwasem dikarboksylovym, jednym z najbardziej rozpowszechnionych kwasów roślinnych. Składa się z dwóch bezpośrednio ze sobą połączonych grup karboksylowych, z czego wynikają jego szczególne właściwości fizykochemiczne, m.in. właściwości redukujące, nietrwałość termiczna, kompleksowanie jonów metali, np. żelaza, aluminium, litu [8]. Jego zasto-

Mgr inż. E. Walaszczyk, dr hab. inż. W. Podgórski, prof. UE, mgr inż. D. Marzec, Katedra Bioutylizacji Odpadów Rolno-Spożywczych, Instytut Chemii i Technologii Żywności, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, ul. Komandorska 118-120, 53-345 Wrocław

sowanie jest dosyć szerokie. W produkcji żywności stosowany jest jako: inhibitor enzymatycznego brązowienia owoców, stabilizator poprawiający zapach produktów spożywczych i czynnik klarujący [16].

Kwas szczawiowy jest produktem ubocznym w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*. Pierwsze próby określenia warunków i mechanizmów formowania tego kwasu, jako metabolitu *A. niger*, podjęli Bomstein, Cleland i Johnson [3, 5]. Skład medium hodowlanego przez nich zaproponowany został opracowany na podstawie składu podłoża stosowanego do biosyntezy kwasu cytrynowego [19]. Autorzy ci przebadali wpływ podstawowych mikro- oraz makroelementów i stwierdzili, że do biosyntezy kwasów organicznych przez *Aspergillus niger*, oprócz źródła węgla, niezbędne są sole zawierające azot, fosfor, magnez, cynk i żelazo.

Obok tradycyjnych, stosowanych w syntezie mikrobiologicznej, substratów w rodzaju cukru białego, skrobi, syropów glukozowych, hydrolu glukozowego, czy melasy [7, 10, 11, 12, 16] pojawiają się nowe niekonwencjonalne źródła węgla i energii. Ostatnio duże zainteresowanie badaczy wzbudza glicerol, co wynika z rosnącego problemu zagospodarowania odpadowej gliceryny powstającej w procesie produkcji biodiesla [1, 14, 18]. Ustawą o biokomponentach i biopaliwach ciekłych [21] wprowadzono od 2007 r. obowiązek ich stosowania, a zgodnie z rozporządzeniem Rady Ministrów w tej sprawie [17] i Dyrektywą UE [6], dodatek biokomponentów do paliw powinien wzrastać do 7,1 % w 2013 r. i do 20 % w 2020 r. [22]. Prognozuje się więc, że ilość powstającego odpadowego glicerolu przekroczy jego rynkowe zapotrzebowanie [10], a problemy z jego zagospodarowaniem wpłyną na ekonomiczność produkcji tego biopaliwa [18, 20].

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania glicerolu jako jedyne źródła węgla i energii w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego przez szczep *Aspergillus niger* W78C w hodowlach wstrząsanych oraz ustalenie optymalnego stężenia makroelementów w podłożu stosowanym w tym procesie.

Material i metody badań

W badaniach stosowano szczep *Aspergillus niger* W78C pochodzący z kolekcji Instytutu Chemii i Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

Hodowle prowadzono na podłożach syntetycznych z glicerolem (99,5 %), rozcieńczonym wodą wodociągową do stężenia $150 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Podłoża uzupełniano źródłami makroelementów w postaci: NH_4NO_3 , KH_2PO_4 i $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Odczyn podłoży ustalano kwasem mineralnym na poziomie 6,0 jednostek pH. Hodowle prowadzono przez 20 dni w temp. $30 \text{ }^\circ\text{C}$, w kolbach o pojemności 750 cm^3 wypełnionych 125 cm^3 podłoża, umieszczonych na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o częstotliwości 148 ruchów min^{-1} i amplitudzie 3,5 cm.

Skład chemiczny podłoży zastosowanych w procesie biosyntezy kwasu szczawowego (tab. 1) był modyfikacją podłoża zaproponowanego przez Bomstein, Cleland i Johnson [3, 5]. Zastępując wodę destylowaną wodą wodociągową, która zawiera wystarczającą ilość mikroelementów, można było pominąć dodatki soli cynku i żelaza oraz innych mikroelementów [7, 11, 15]. Zamiast szeroko stosowanych węglowodanów, jako źródła węgla i energii, do biosyntezy kwasu szczawowego [2, 4, 7, 12, 13, 16] zastosowano glicerol.

Tabela 1

Skład podłoży hodowlanych.
Composition of culture media.

Wariant nr Variant No.	Opis wariantów Description of variants	Makroelementy w podłożu [g·dm ⁻³] Macro-elements in medium [g·dm ⁻³]		
		NH ₄ HO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O
1	punkty czynnikiowe factorial points	0,60	0,10	0,10
2		0,60	0,10	0,50
3		0,60	0,50	0,10
4		0,60	0,50	0,50
5		2,00	0,10	0,10
6		2,00	0,10	0,50
7		2,00	0,50	0,10
8		2,00	0,50	0,50
9	punkty gwiazdne star points	0,12	0,30	0,30
10		2,48	0,30	0,30
11		1,30	0,00	0,30
12		1,30	0,64	0,30
13		1,30	0,30	0,00
14		1,30	0,30	0,64
15	punkty centralne center points	1,30	0,30	0,30
16		1,30	0,30	0,30

Źródło:/ Source: Badania własne / The authors' own study

Kwasy organiczne oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Perkin Elmer) przy użyciu kolumny Aminex HPX-87H (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA) oraz detektora UV/VIS o długości fali 210 nm (Perkin Elmer). Fazą mobilną był 5 mM H₂SO₄. Szybkość przepływu wynosiła 0,6 cm³·min⁻¹, a temp.

20 °C. Stężenie biomasy oznaczano przez odfiltrowanie i suszenie w temp. 105 °C do stałej masy.

Do planowania wariantów badawczych zastosowano statystyczną metodę optymalizacji eksperymentów w postaci centralnego planu kompozycyjnego Boxa-Wilsona [7]. Optymalizowano stężenie makroelementów w postaci soli: NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, będących źródłem azotu, fosforu i magnezu. Do opracowania wyników stosowano system analizy danych Statistica, wersja 9 StatSoft, Inc., 2009.

Wyniki i dyskusja

W tab. 2. przedstawiono wyniki uzyskane w poszczególnych wariantach hodowlanych. Otrzymane wartości rzeczywistego stężenia produktu pozwalają na opisanie procesu następującym równaniem kwadratowym:

$$[\text{OA}] = 4,6 + 36,2[\text{N}] - 17,0[\text{N}]^2 + 56,8[\text{P}] - 95,4[\text{P}]^2 + 21,4[\text{Mg}] + 3,2[\text{Mg}]^2 + 15,6[\text{N}][\text{P}] - 2,2[\text{N}][\text{Mg}] - 67,9[\text{P}][\text{Mg}],$$

gdzie nawiasy oznaczają stężenie produktu oraz makroelementów w podłożu w $[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$.

Na podstawie powyższego równania opisującego zależności pomiędzy składnikami podłoża a ilością uzyskanego produktu można obliczyć wartości stężenia kwasu szczawiowego, które teoretycznie powinno się uzyskać w poszczególnych wariantach hodowlanych (tab. 2 – kwas szczawiowy, wartości spodziewane).

Największe stężenie produktu ($43,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskano w wariacie 16. hodowli w podłożu o składzie: NH_4NO_3 $1,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, KH_2PO_4 $0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wartość spodziewana stężenia kwasu szczawiowego w tym wariacie wyniosła $37,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wynik rzeczywisty procesu różnił się od spodziewanego o około $6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wysokie rzeczywiste stężenie produktu uzyskano również w wariacie 2. ($42,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) (NH_4NO_3 $0,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, KH_2PO_4 $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Jednak wynik ten był obciążony błędem i zgodnie z modelem statystycznym ilość kwasu szczawiowego w tym podłożu powinna wynieść $33,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Interesująca jest analiza efektów niedoborów makroelementów w podłożu i wniosków wynikających z modelu matematycznego. W wariacie 11. hodowli, charakteryzującym się brakiem dodatku fosforu do podłoża, nastąpił słaby rozwój grzybni, co w konsekwencji spowodowało małą szybkość i ilość tworzonego metabolitu. Końcowe stężenie kwasu szczawiowego wyniosło $9,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wynik ten został przez model uznany za błędny. Wartość spodziewana stężenia produktu kształtowała się bowiem na poziomie $28,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zatem różnica między wartością uzyskaną a spodziewaną była bardzo wysoka i wyniosła $19 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Powtórzenie eksperymentów z podłożami przedstawionymi w tab. 1. potwierdziło poziom uzyskanych i przedstawionych w tab. 2. wartości rzeczywistych stężenia produktu, dokumentując tym samym, że obecność fosforu w podłożu jest czynnikiem krytycznym efektywności przebiegu całego procesu [9].

Tabela 2

Wyniki procesu biosyntezy kwasu szczawiowego z poszczególnych wariantów hodowlanych.
Results of oxalic acid biosynthesis from individual variants of culture media.

Wariant Variant	Kwas szczawiowy (OA) [g·dm ⁻³] Oxalic acid (OA) [g·dm ⁻³]			Kwas cytrynowy (CA) [g·dm ⁻³] Citric acid (CA) [g·dm ⁻³]	Homofermentaty- wność [%] Chemical selectivity [%] OA · 100/ (OA + CA)	Biomasa [g·dm ⁻³] Biomass [g·dm ⁻³]
Nr No.	otrzyman e obtained	spodziewane expected	różnica difference	otrzymane obtained		
1	34,5	27,3	7,2	16,3	67,9	7,5
2	42,6	33,4	9,2	22,9	65,0	7,5
3	25,4	28,1	-2,8	6,5	79,6	10,3
4	11,0	23,4	-12,4	5,0	68,7	8,2
5	25,5	18,1	7,4	42,2	37,7	10,6
6	27,0	23,0	4,0	39,9	40,4	11,1
7	19,8	27,7	-8,0	23,6	45,6	15,5
8	15,7	21,7	-6,0	13,7	53,4	21,4
9	10,6	18,3	-7,7	8,7	54,9	2,5
10	11,3	9,2	2,1	20,1	35,9	22,0
11	9,9	28,9	-19,0	0,0	100,0	0,1
12	39,2	26,1	13,1	21,9	64,2	14,2
13	35,6	37,6	-2,0	22,5	61,3	10,8
14	37,5	37,7	-0,3	18,2	67,3	13,4
15	35,4	37,3	-2,0	20,0	63,9	12,2
16	43,2	37,3	5,9	25,9	62,5	11,5

Źródło:/ Source: Badania własne / The authors' own study

Istotnym składnikiem podłoża był azot. Jego stężenie wpływało na ilość syntezowanej biomasy i ilość tworzonego produktu. W przypadku niedoboru tego pierwiastka występował niedostateczny wzrost grzybni (2,5 g·dm⁻³), natomiast w sytuacji nadwyżki stężenia w stosunku do zapotrzebowania, stężenie biomasy osiągało wartości maksymalne równe 22,0 g·dm⁻³. W wariantach hodowlanych z małą (0,12 g·dm⁻³) i dużą (2,48 g·dm⁻³) początkową zawartością NH₄NO₃ (warianty 9. i 10.) rzeczywiste stężenie produktu było około 4-krotnie mniejsze (odpowiednio 10,6 i 11,3 g·dm⁻³) niż stężenie maksymalne (43,2 g·dm⁻³) uzyskane w procesie, w którym stężenie początkowe NH₄NO₃ wynosiło 1,3 g·dm⁻³.

Obecność soli magnezu nie wpływała w istotny sposób na wyniki biosyntezy (wariant 13. i 14.). Brak tego składnika w podłożu ograniczył przyrost produktu

o $1,9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, a więc w zakresie błędu statystycznego zastosowanej metody. Model statystyczny również nie wskazał na istotność tego makroelementu w kontekście nadprodukcji kwasu szczawiowego, a wartości spodziewane w obu wariantach podłoża były bardzo zbliżone do siebie i do ilości rzeczywiście uzyskanych.

W trakcie hodowli tworzyły się także znaczne ilości produktu ubocznego, jakim był kwas cytrynowy (tab. 2). W kilku wariantach stężenie tego metabolitu przewyższało nawet stężenie produktu głównego (warianty 5, 6, 7, 10). Jedynie w wariantcie 11., charakteryzującym się brakiem fosforu, kwas cytrynowy nie tworzył się w ogóle.

Przedstawione w pracy uzyskane wartości stężenia kwasu szczawiowego są wyższe niż uzyskane przez innych autorów wykorzystujących w badaniach technikę hodowli wstrząsanej i stosujących surowce węglowodanowe. Camaselle i wsp. [4] oraz Bohlmann i wsp. [2] po 10 dniach hodowli *Aspergillus niger* uzyskali odpowiednio $27,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu szczawiowego z sacharozy oraz $21,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ z serwatki, natomiast Madal i Banerjee [13] $20,6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ z glukozy po 9 dniach hodowli.

Uzyskana w niniejszej pracy ilość kwasu szczawiowego ($43 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) w podłożu z glicerolem była jednak mniejsza niż otrzymana przez nich w eksperymentach z użyciem cukru białego, w których maksymalna ilość produktu wyniosła $65 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ przy wyższym współczynniku homofermentatywności całego procesu [7].

Przeprowadzone badania pozwalają na stwierdzenie, że glicerol może być potencjalnym źródłem węgla i energii w procesach biotechnologicznych, stwarzając możliwość zagospodarowania większej ilości powstającego odpadu z produkcji biopaliw.

Uzyskane wyniki wskazują także na potrzebę analizy i weryfikacji wniosków sugerowanych przez stosowane w planowaniu eksperymentów metody statystyczne. Model matematyczny nie zawsze dokładnie opisuje rzeczywistość i odzwierciedla skomplikowane procesy metaboliczne hodowanych drobnoustrojów. Wartości stężenia produktu uzyskane w niniejszej pracy w podłożu, w którym wystąpiło znaczne ograniczenie jednego z krytycznych dla biosyntezy kwasu szczawiowego składników, został uznany przez model za błędny. Powtórzenie wykonanych eksperymentów potwierdziło jednak poziom otrzymanych wartości rzeczywistych testowanego parametru.

Wnioski

1. Glicerol był dobrym źródłem węgla i energii dla szczepu *Aspergillus niger* W78C, stosowanym w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego metodą hodowli wstrząsanej.
2. Największe stężenie produktu ($43,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) uzyskano w podłożu hodowlanym o składzie: $1,30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $0,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ i $0,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Źródłem mikroelementów była natomiast woda wodociągowa.
3. Azot był istotnym składnikiem podłoża wpływającym na efektywność procesu biosyntezy kwasu szczawiowego. W wariantcie ze zbyt niskim stężeniem tego ma-

- kroelementu ($0,12 \text{ g NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{dm}^{-3}$) obserwowano słaby wzrost grzybni i niskie stężenia produktu. Zbyt wysokie stężenie NH_4NO_3 ($2,48 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) powodowało natomiast nadmierny przyrost biomasy, ograniczając tym samym ilość wytworzonego kwasu szczawiowego.
4. Obecność fosforu w podłożu była krytyczna dla wzrostu grzybni, co w konsekwencji ograniczało także ilość uzyskiwanego produktu.
 5. Brak magnezu nie był natomiast istotny dla przebiegu procesu. Jednakże jego obecność w podłożu sprzyjała przyrostowi produktu o $1,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Literatura

- [1] Andre A., Diamantopoulou P., Philippoussis A., Sarris D., Komaitis M., Papanikolaou S.: Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into addend-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind. Crops Prod.*, 2010, **31**, 407-416.
- [2] Bohlmann J.T., Cameselle C., Nunez M.J., Lema J.M.: Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part II: Optimisation of fermentation with milk whey as carbon source. *Bioprocess Eng.*, 1998, **19**, 337-342.
- [3] Bomstein R. A., Johnson M. J.: The mechanism of formation of citrate and oxalate by *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, 1952, **198** (1), 143-153.
- [4] Cameselle C., Bohlmann J.T., Nunez M.J., Lema J.M.: Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part I: Influence of sucrose and milk whey as carbon source. *Bioprocess Eng.*, 1998, **19**, 247-252.
- [5] Cleland W. W., Johnson M. J.: Studies on the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, 1956, **220** (2), 595-606.
- [6] Dyrektywa 2003/30/EC Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 8 maja 2005 r. w sprawie wspierania użycia w transporcie biopaliw lub innych paliw odnawialnych.
- [7] Foryś E., Podgórski W.: Application of replicated 2^3 full factorial central composite circumscribed design of experiment (CCC DOE) for the optimization of oxalate biosynthesis by *Aspergillus niger* W78C. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia*, 2004, **3** (1-2), 43-53.
- [8] Foryś E., Podgórski W.: Kwas szczawiowy i jego sole. Właściwości, otrzymywanie i zastosowanie. *Prace Nauk. AE we Wrocławiu. Technologia*. 2004, **11** (1018), 51-69.
- [9] Foryś E., Podgórski W., Kaczyńska M.: Wpływ makroelementów na proces biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez *Aspergillus niger* W78B. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia*, 2007, **6** (4), 31-37.
- [10] Lesisz M., Pindel M.: Lotos Biopaliwa – producent FAME w Grupie Lotos. *Przem. Chem.*, 2006, **12** (85), 1580-1584.
- [11] Leśniak W., Pietkiewicz J., Podgórski W.: Citric acid fermentation by trace metal resistant mutant of *Aspergillus niger* on starch and dextrose syrups. *Biotechnol. Lett.*, 2002, **24** (13), 1065-1067.
- [12] Leśniak W., Podgórski W., Pietkiewicz J.: Możliwości zastosowania hydrołu glukozowego do produkcji kwasu cytrynowego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 1986, **30** (6), 22-25.
- [13] Mandal S.K., Banerjee P.C.: Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 2005, **40**, 1605-1610.
- [14] Papanikolaou S., Aggelis G.: Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technol.*, 2009, **21**, 83-87.
- [15] Podgórski W.: Kinetyczny model wzrostu *Aspergillus niger* W78B w okresowym procesie biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego. *Inż. Apar. Chem.*, 2005, **44** (36), 79-80.

- [16] Podgórski W., Leśniak W.: Biochemical method of oxalic acid production from beet molasses. Chem. Pap., 2003, **57** (6), 408-412.
- [17] Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 15 czerwca 2007 r. w sprawie Narodowych Celów Wskaźnikowych na lata 2008-2013. Dz. U. 2007 r. Nr 110, poz. 757.
- [18] Rymowicz, W., Rywińska A., Gładkowski W.: Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. Chem. Pap., 2008, **62**, 239-246.
- [19] Shu P., Johnson M. J.: The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. J. Bacteriol. 1948, **56** (5), 577-585.
- [20] Tęcza W., Kijeński J., Jamróz M.E.: Etery alkilowe gliceryny jako efektywne dodatki do paliw silnikowych. Przem. Chem., 2006, **12** (85), 1594-1596.
- [21] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych. Dz. U. 2006 r. Nr 169, poz. 1199.
- [22] Wasilewicz-Nidebalska W., Kijeński J., Lipkowski A.W., Różycki K.: Postępy w rozwoju badań nad otrzymywaniem biodiesla. Przem. Chem., 2006, **12** (85), 1586-1591.

IMPACT OF MACRO-ELEMENTS ON OXALIC ACID BIOSYNTHESIS PROCESS BY *ASPERGILLUS NIGER* WITH GLYCEROL

S u m m a r y

Oxalic acid is the simplest organic dicarboxylic acid. At the same time, it is a very common plant acid. Despite its toxic properties, it is used in the food industry as an agent to inhibit enzymatic browning of fruits, as a stabilizer to improve the aroma of food products, and as a clarification agent. Owing to the increasing amounts of waste glycerol produced during the production of bio-diesel, there are more and more researches into the application of this waste product as a source of carbon in biotechnological processes.

The objective of this paper was to study the possibility of utilizing glycerol as a source of carbon and energy in the oxalic acid biosynthesis process by *Aspergillus niger* W78C in the shaking flasks-based cultures, as well as to determine the optimum concentration of macro-elements in the medium applied in the process.

In the biosynthesis process, glycerol appeared to be a good source of carbon and energy in the bio-production of oxalic acid. The best bioprocess results, more than 43 g dm⁻³ of oxalic acid, were obtained in the variant of the medium containing: 1.30 g dm⁻³ NH₄NO₃, and 0.3 g dm⁻³ of KH₂PO₄ and MgSO₄·7H₂O. The lack of phosphorus in the medium was a critical factor as regards the growth of biomass, and this fact significantly limited the production of oxalic acid. Nitrogen was found to be, also, an important component of the medium. The culture developed in the variant with a too low concentration level of this element (0.12 g NH₄NO₃ dm⁻³) was characterized by a low growth level of biomass and by low values of the product concentration. The presence of magnesium salt was not critical for the process to run. The lack of this component limited the increase in the growth of this product by ca. 2 g dm⁻³.

Key words: oxalic acid, *Aspergillus niger*, bio-synthesis, glycerol, biodiesel ☒