

IONSKA KROMATOGRAFIJA KAO ROBUSNA METODA ZA PRAĆENJE KRATKOLANČANIH ORGANSKIH KISELINA U BIOREAKTORU ZA PROIZVODNJU PHA

L. Furač*, M. Cvetnić, L. Jaklenec, D. Bramberger, L. Večenaj, A. Rakas, K. Bule Možar, D. Lastovčić, M. Markić, Š. Ukić[†], T. Bolanča, D. Kučić Grgić

Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb

*Ifurac@fkit.unizg.hr

UVOD

Poli(hidroksialkanoati) (PHA) predstavljaju skupinu biorazgradivih biopolimera koje mikroorganizmi sintetiziraju prirodnim putem, najčešće fermentacijom biomase. Hlapive organske kiseline, nastale anaerobnom digestijom, važan su izvor ugljika u bioprocesima proizvodnje PHA. Njihov sastav i koncentracija značajno utječu na kinetiku rasta mikroorganizama i prinos polimera. U ovom radu ispitan je utjecaj mješavina kratkolančanih organskih kiselina (octena, propionska, valerijanska kiselina i limunska kiselina) u različitim koncentracijama na rast bakterije *Cupriavidus necator*. Rast biomase praćen je mjerenjem optičke gustoće (OD) tijekom vremena, dok su promjene u koncentracijama pojedinih kiselina određene primjenom ionske kromatografije (IC). Poseban naglasak stavljen je na primjenu IC metode kao robusnog i selektivnog analitičkog alata za istovremeno određivanje više organskih kiselina u kompleksnom bioprocesnom mediju. Rezultati pokazuju da IC metoda omogućuje pouzdano praćenje dinamike potrošnje supstrata i promjena u sastavu kiselina tijekom procesa.

EKSPERIMENTALNI DIO

IC metoda

- instrument:** ionski kromatograf Wayneal IC6600
- kolona:** NovaChrom HS-5A-P3 4,0 x2 50 mm
- protok:** 1 mL/min
- mobilna faza:** gradijent KOH
- volumen injektiranja:** 50 µL
- temperatura kolone:** 35°C
- struja supresora:** 90 mA
- trajanje analize:** 80 min

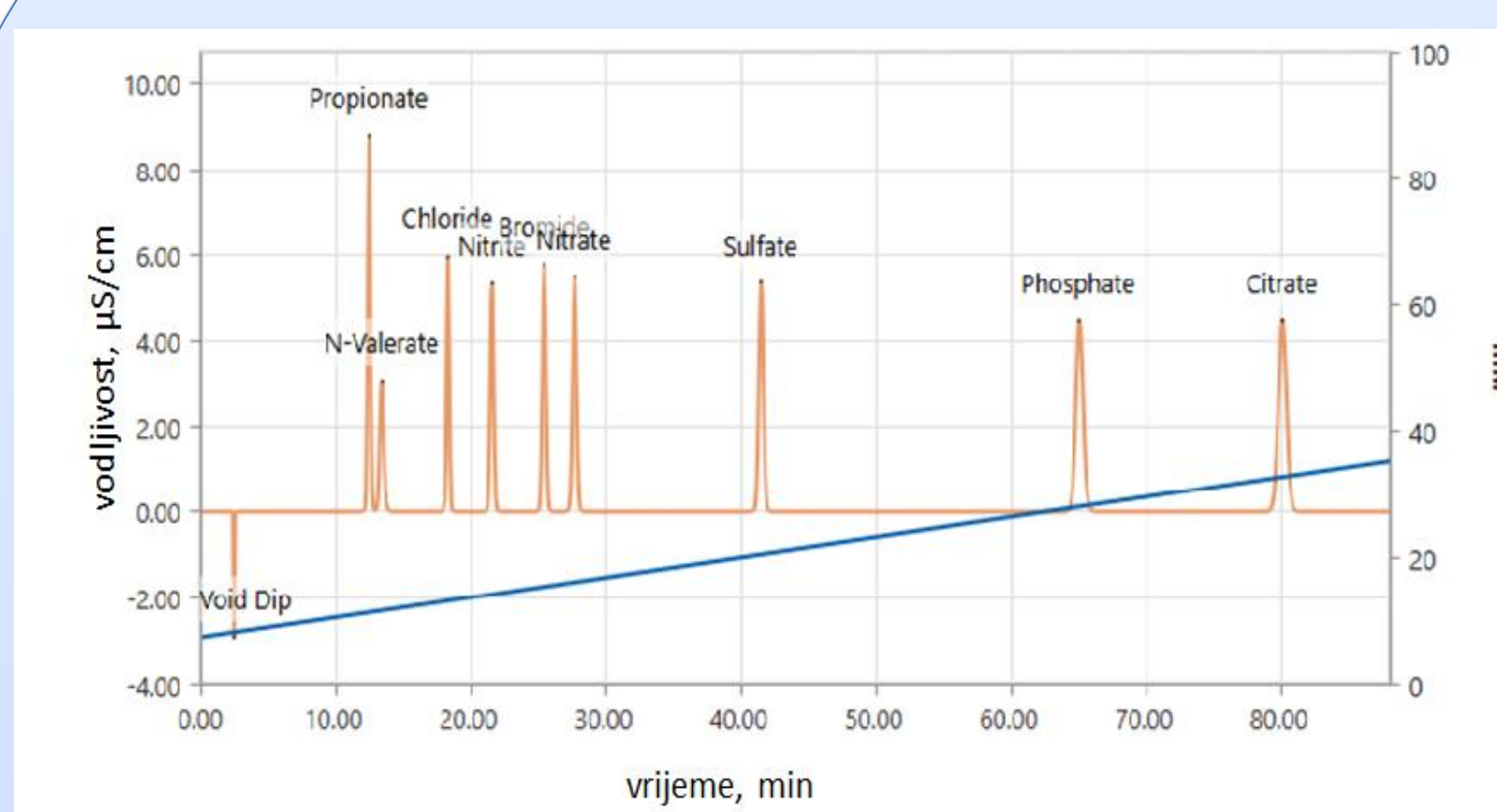


Utjecaj mješavine kiselina na rast biomase :

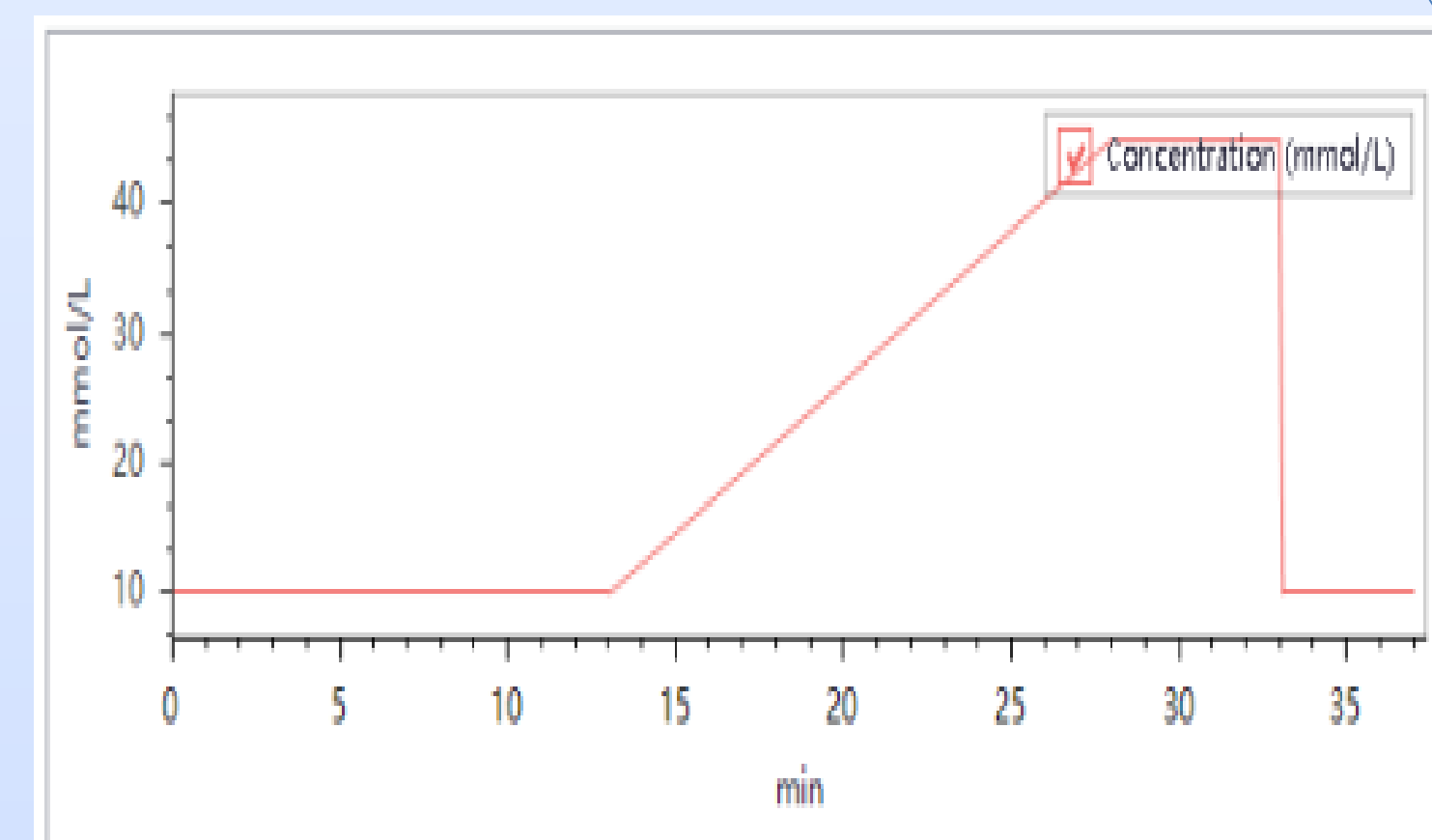
- mikroorganizam:** *Cupriavidus necator*
- laboratorijski bioreaktor:** $V = 1$ L
- hranjiva podloga :** mineralni medij
- izvori ugljika i prekursori za sintezu PHA :**
 - octena kiselina, $\gamma_0(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5$ g /L
 - propionska kiselina, $\gamma_0(\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}) = 0,5$ g /L
 - limunska kiselina, $\gamma_0(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 0,5$ g /L
 - valerijanska kiselina, $\gamma_0(\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH}) = 0,5$ g /L
- pokus je proveden uz aeraciju i miješanje pri $t = 30^\circ\text{C}$ i kontrolu pH = 6-8
- tijekom procesa periodično su uzimani uzorci za analizu:
 - praćena je potrošnja organskih kiselina tijekom kultivacije
 - koncentracije organskih kiselina određene su razvijenom IC metodom
 - rast kulture procijenjen je određivanjem koncentracije biomase odnosno optičkom gustoćom (OD)

REZULTATI

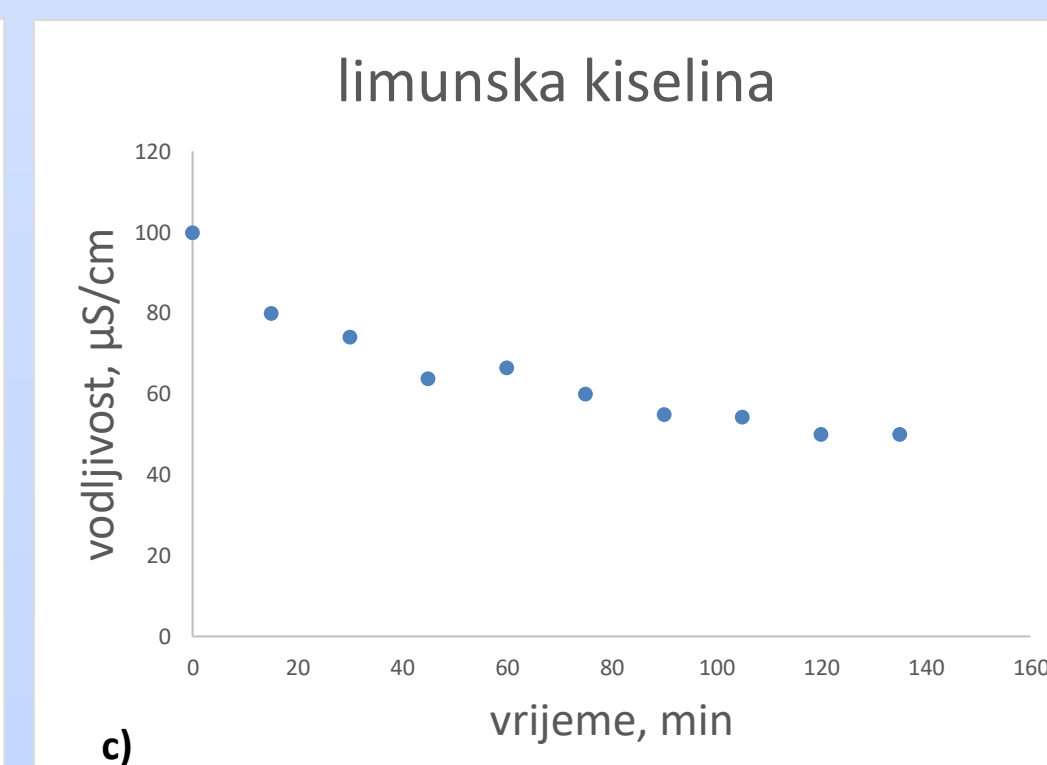
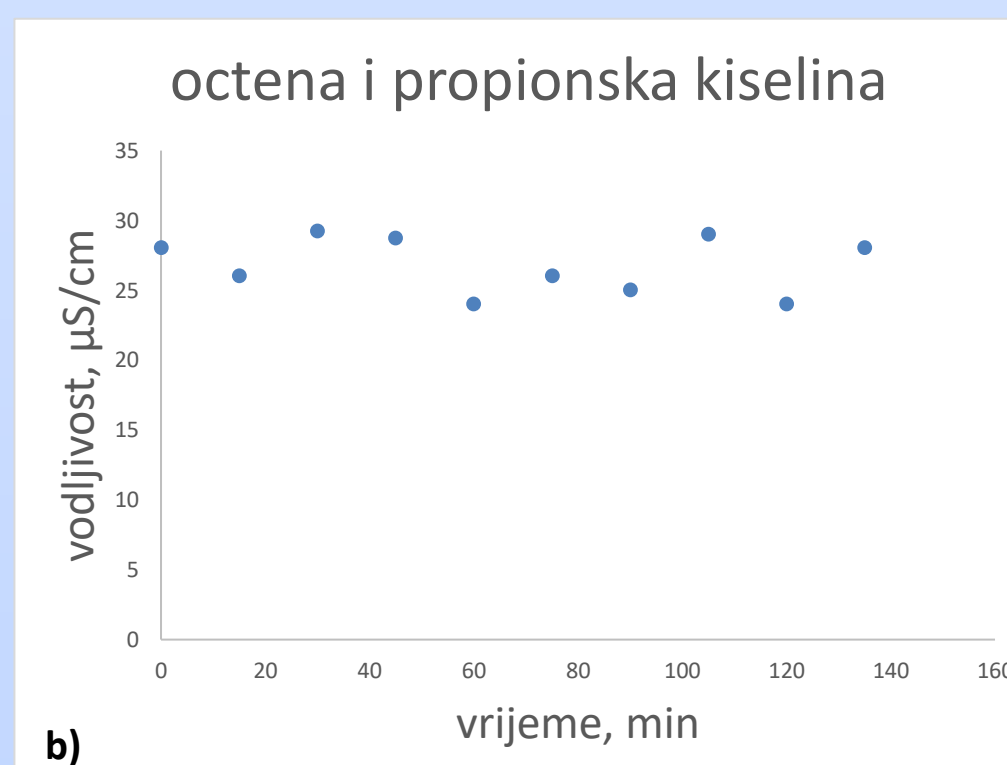
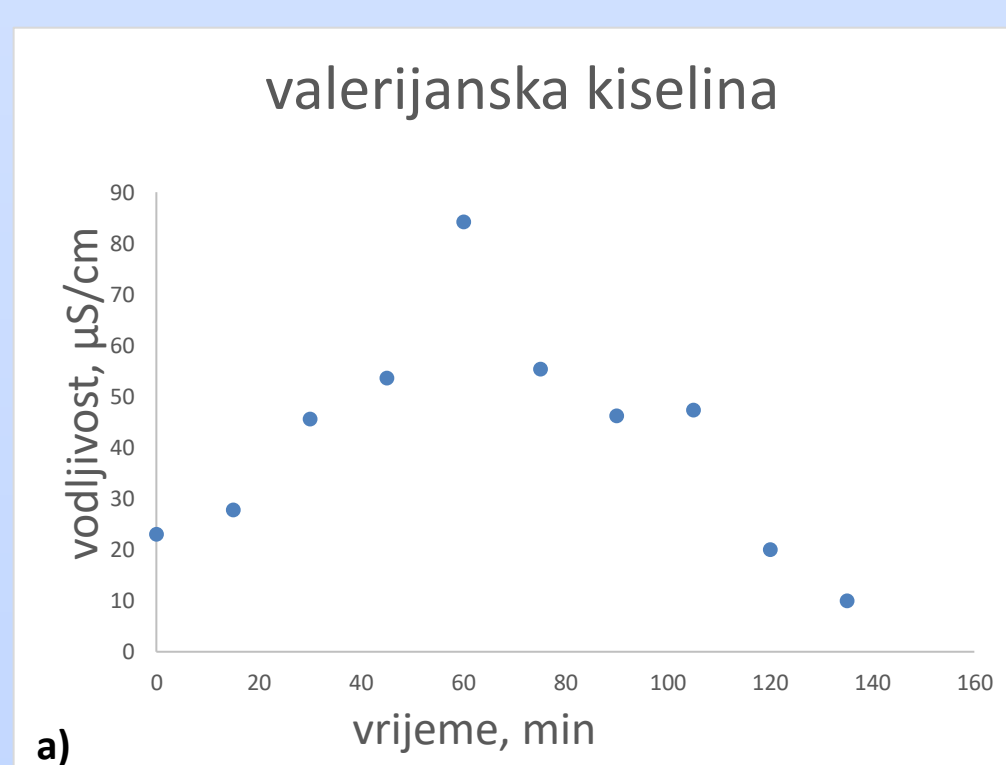
IC metoda



Slika 1. Kromatogram klasičnih aniona i ispitivanih kratkolančanih organskih kiselina



Slika 2. Gradijent mobilne faze razvijene IC metode



Slika 3. Ovisnost vodljivosti o vremenu za a) valerijansku , b) octenu i propionsku i c) limunsku kiselinu, $\gamma_0(\text{kiselina}) = 0,5$ g /L, $t = 30^\circ\text{C}$

Koncentracija limunske kiseline kontinuirano se smanjivala tijekom cijelog procesa, što upućuje na njezinu potrošnju kao izvora ugljika i energije.

Nasuprot tome, koncentracija valerijanske kiseline u početnoj je fazi porasla, nakon čega je postupno opadala prema kraju eksperimenta, što sugerira njezino naknadno uključivanje u metaboličke procese.

Koncentracije octene i propionske kiseline tijekom eksperimenta pokazivale su oscilacije oko početnih vrijednosti bez jasnog trenda povećanja ili smanjenja.

Tablica 1. Promjena optičke gustoće (OD) *Cupriavidus necator* u vremenu

optička gustoća (OD)	vrijeme /min
0,7424	0
0,8882	10
0,9705	30
1,9566	45
2,3345	60
2,5636	75
2,7185	90
2,9575	105
2,9811	120
3,1864	130

Iz tablice 1. vidljivo je da OD raste pri čemu je vidljiva faza prilagodbe do 30 min, nakon čega slijedi izražen rast bakterijske kulture od 30 do 45 min te faza usporavanja nakon 75 min. Brzina rasta bakterijske kulture opada tijekom 105 do 120 min što upućuje na nedostatak hranjive tvari ili nakupljanje toksičnih tvari koji usporavaju rast stanica.

ZAKLJUČAK

Razvijena IC metoda omogućila je uspješnu separaciju većine ispitivanih organskih kiselina i klasičnih aniona uz dobru ponovljivost i pouzdanost mjerenja. Glavno ograničenje metode predstavlja nepotpuna separacija octene i propionske kiseline, zbog čega njihova istovremena kvantifikacija zahtijeva daljnju optimizaciju kromatografskih uvjeta.

Preliminarnim praćenjem koncentracija organskih kiselina tijekom kultivacije bakterije *Cupriavidus necator* utvrđeno je preferencijalno iskorištavanje limunske kiseline, dok su koncentracije octene i propionske kiseline ostale relativno stabilne. Promjene koncentracije valerijanske kiseline upućuju na njezinu uključenost u metaboličke procese i moguću ulogu u sintezi PHA kopolimera.

Dobiveni rezultati potvrđuju važnost kontrole sastava i koncentracije organskih kiselina tijekom bioprocesa te pokazuju da je ionska kromatografija prikladan alat za njihovo praćenje u sustavima proizvodnje PHA.

Preliminarna istraživanja rasta bakterijske kulture *Cupriavidus necator* mjerenjem OD upućuju da je nakon faze prilagodbe izražen rast pri čemu se kao izvor ugljika za rast stanica koristi limunska kiselina. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u kinetiku rasta navedene bakterijske kulture.

ZAHVALA

Istraživanje je provedeno u okviru projekta BioSmart (112101) koji financira Europska unija – NextGenerationEU u okviru izvora 581 – Mehanizam za oporavak i otpornost, kao dio programa financiranja javnih visokoškolskih ustanova i javnih istraživačkih instituta.