



EFEKTYWNOŚĆ BIOSYNTETY KWASU CYTRYNOWEGO W ZASILANYCH OKRESOWYCH HODOWLACH WGLĘBNYCH


Ewelina Książek  , Małgorzata Janczar-Smuga 

UE we Wrocławiu, Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny

Streszczenie. Kwas cytrynowy jest stosowany w wielu dziedzinach przemysłu. Jego światowa produkcja sięga około 1,8 miliona ton rocznie, a rynek kwasu cytrynowego należy do najszybciej rozwijającego się segmentu rynku dodatków do żywności. Powodem ciągłego wzrostu produkcji i zapotrzebowania na kwas cytrynowy jest jego szerokie zastosowanie – począwszy od przemysłu spożywczego przez farmaceutyczny aż do metalurgicznego. Rosnące na świecie zapotrzebowanie na kwas cytrynowy jest bodźcem do poszukiwania alternatywnych źródeł węgla do jego biosyntezy. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu momentu zasilenia podłoża hodowlanego glicerolem na szybkość i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* w zasilanych okresowych hodowlach wglębnych. W tym celu podłoże hodowlane zasilano glicerolem bezwodnym w ilości $35,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w 65., 93. i 113. godzinie bioprocesu. Analiza wyników badań wykazała, że najwyższe końcowe stężenie kwasu cytrynowego $P_K = 143,33 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i największą całkowitą wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego w stosunku do wprowadzonego substratu $Y_{P/S} = 95,80\%$ (m/m) uzyskano w niezasilanych okresowych hodowlach wglębnych. Najkorzystniejsze parametry charakteryzujące przebieg zasilanych okresowych hodowli wglębnych uzyskano w hodowlach zasilonych glicerolem pod koniec czwartej doby, czyli w 93. godzinie bioprocesu. Końcowe stężenie kwasu cytrynowego w tych hodowlach wynosiło $118,40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, a całkowita wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego wyniosła 77,10% (m/m).

Słowa kluczowe: kwas cytrynowy, glicerol, biosynteza, *Aspergillus niger*, hodowle wglębne

Ewelina Książek  <https://orcid.org/0000-0001-6416-0458>; Małgorzata Janczar-Smuga  <https://orcid.org/0000-0002-7745-6343>

 ewelina.ksiazek@ue.wroc.pl; ewelina.dymarska@ue.wroc.pl

© Copyright by Wydawnictwo SGGW

WSTĘP

Kwas cytrynowy jest obecny w komórkach roślinnych i zwierzęcych oraz płynach fizjologicznych organizmu człowieka. Dla organizmów żywych jest on niezbędnym metabolitem w szeregu reakcji cyklu Krebsa, w wyniku którego następuje utlenianie glukozy do ditlenku węgla i wody z wydzieleniem energii [Berg i in. 2002, Goldberg i in. 2006, Apelblat 2014].

Ze względu na swoją nieszkodliwość, a także właściwości chelatujące i sekwestrujące jony metali kwas cytrynowy jest stosowany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz chemicznym, a nawet metalurgicznym. Jego roczna produkcja na świecie wynosi około 1,8 miliona ton, a rynek kwasu cytrynowego należy do najszybciej rozwijającego się segmentu dodatków do żywności. Powodem ciągłego wzrostu produkcji i zapotrzebowania na kwas cytrynowy jest jego szerokie zastosowanie nie tylko w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, ale także w produkcji biopolimerów, ochronie środowiska oraz biomedycynie [Singh Dhillon i in. 2011, Najafpour 2015, Vandenberghe i in. 2017, The National Center 2018, BioPortfolio 2019]. Dotychczas w przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego powszechnie stosowana jest metoda hodowli wglębnych z udziałem szczepów *Aspergillus niger*. Głównymi substratami w produkcji kwasu cytrynowego są melasa buraczana, sacharoza oraz syrop glukozowy [Sauer i in. 2013]. Rosnące na świecie zapotrzebowanie na kwas cytrynowy jest bodźcem do prowadzenia prac nad doskonaleniem technologii produkcji w celu poprawy wydajności biosyntezy kwasu cytrynowego oraz obniżenia kosztów produkcji. Prowadzone badania koncentrują się m.in. na zastosowaniu niekonwencjonalnych surowców jako substratów do biosyntezy kwasu cytrynowego. Przedmiotem badań są między innymi odpady z przetwórstwa owocowo-warzywnego, porafinacyjne kwasy tłuszczowe, otręby, a także glicerol [Soccol i in. 2006, Papagianni 2007, Singh Dhillon i in. 2011, Najafpour 2015, Vandenberghe i in. 2017, The National Center 2018].

Glicerol powstaje jako odpadowa frakcja w produkcji biopaliw do silników wysoko- ciśnieniowych, tzw. biodiesla. Wzrost produkcji biodiesla w ostatnich latach generuje problem zagospodarowania fazy glicerynowej. Glicerol może stanowić źródło węgla i energii w procesie produkcji kwasu cytrynowego przez drobnoustroje. Wykorzystanie szczepów *Aspergillus niger* do biosyntezy kwasu cytrynowego, z użyciem glicerolu jako jedyne- go źródła węgla, nie było dotąd przedmiotem szeroko zakrojonych badań. Zastosowanie czystego glicerolu jako głównego źródła węgla było badane przez zespół Foryś [Foryś i in. 2007]. Autorzy w wyniku przeprowadzonych badań uzyskali $59,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu cytrynowego produkowanego z wydajnością $0,39 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. W innych badaniach wykorzystujących glicerol jako źródło węgla w hodowlach *Aspergillus niger* był on stosowany głównie w kombinacji z innymi substratami. Zespół Schneider w hodowlach prowadzonych w podłożach stałych z wykorzystaniem odpadów pochodzących z produkcji oleju tungowego jako głównego źródła węgla zastosował dodatek glicerolu w zakresie od 0 do 40%. Autorzy największą wydajność ($350,0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) otrzymali po 7 dniach hodowli, przy dodatku 20% glicerolu [Schneider i in. 2014].

Niewielkie zainteresowanie wykorzystaniem glicerolu jako głównego substratu do biosyntezy kwasu cytrynowego z udziałem szczepów *Aspergillus niger* może wynikać z tego, że substancje zawarte w glicerolu mogą mieć inhibitoryczny wpływ na przebieg

procesu, a sam glicerol może wywoływać represję kataboliczną węgla w stosowanych szczepach *Aspergillus niger*. Rozwiązaniem problemu wykorzystania glicerolu jako źródło węgla i energii może być zastosowanie hodowli z zasilaniem. Badaniem wpływu zasilanych okresowych hodowli węglnych *Aspergillus niger* prowadzonych w podłożach z sacharozą na szybkość i wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego zajmował się Pietkiewicz. W swoich badaniach najkorzystniejsze wyniki otrzymał w hodowlach zasilanych jednorazową dawką sacharozy w ilości $41,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ pod koniec trzeciej doby hodowli. W tak prowadzonych hodowlach uzyskano wysokie końcowe stężenie kwasu cytrynowego ($P_K = 121,8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) oraz dużą wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego ($Y_{P/S} = 81,2\%$), a współczynnik efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego wynosił $69,6 \text{ \%}\cdot\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$. Autor w zasilanych okresowych hodowlach węglnych uzyskał końcowe stężenie kwasu cytrynowego i wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego o około 20% wyższe w porównaniu z tradycyjnymi hodowlami okresowymi [Pietkiewicz 2002].

Przytoczone powyżej argumenty skłoniły autorów tej pracy do podjęcia badań nad oceną przydatności zasilanych okresowych hodowli węglnych *Aspergillus niger*, prowadzonych w podłożach zawierających bezwodny glicerol, do biosyntezy kwasu cytrynowego. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu momentu zasilenia podłoża hodowlanego glicerolem na szybkość i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* w zasilanych okresowych hodowlach węglnych.

MATERIAŁ

Podłoże hodowlane

Do sporządzania podłoża hodowlanych jako źródło węgla i energii stosowano glicerol bezwodny cz.d.a. pochodzący z Firmy Chempur Piekary Śląskie, o czystości 99,5% i pH 5,0 oraz sacharozę w postaci cukru białego „Słodka łyżeczka” pochodzącego z Cukrowni „Ropczyce” SA. Podłoże hodowlane, obok glicerolu bezwodnego i sacharozy, zawierało w swoim składzie również: NH_4NO_3 cz.d.a. (Firma Chempur Piekary Śląskie), KH_2PO_4 cz.d.a. (Firma Chempur Piekary Śląskie), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ cz.d.a. (Firma Chempur Piekary Śląskie) i wodę wodociągową. Podłoże hodowlane stosowane w okresowych hodowlach węglnych (BC) zawierało [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: glicerol bezwodny – 135,0; sacharozę – 15,0; NH_4NO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2. Do oceny wpływu momentu jednorazowego zasilenia hodowli glicerolem bezwodnym w ilości $35,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ na szybkość i wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego zastosowano początkowy skład podłoża hodowlanego [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: glicerol – 100,0, sacharozę – 15,0; NH_4NO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2.

Mikroorganizm i przygotowanie inokulum

W badaniach stosowano szczep *Aspergillus niger* PD-66 pochodzący z kolekcji czystych kultur Katedry Biotechnologii i Analizy Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Czyste kultury *Aspergillus niger* PD-66 przechowywano na słupkach ziemniaczanych, w temperaturze 4–5°C i co 4 miesiące pasażowano je na świeże podłoże.

Jako inokulum (zawiesina zarodników służąca do założenia kultury komórkowej) stosowano zawiesinę konidiów *Aspergillus niger* w wodzie demineralizowanej. W celu przygotowania inokulum do szklanej kolby płaskodennej o pojemności 750 cm³ wprowadzano 100 cm³ wody demineralizowanej oraz 0,5 cm³ Tween 80 (o składzie: kwas oleinowy $\geq 58,0\%$, kwasy linolowy, palmitynowy i stearynowy). Kolbę z podłożem sterylizowano w autoklawie, w temperaturze 121°C przez 30 min. Po sterylizacji i ochłodzeniu do kolby wprowadzano konidia (zarodniki grzybów powstające w wyniku rozmnażania bezpłciowego) *Aspergillus niger* znajdujące się na jednym słupku ziemniaczanym. Tak przygotowane zawiesiny konidiów pozostawiano w temperaturze pokojowej na około 6 h, co pewien czas wstrząsając.

Warunki hodowli wgłębnych

Badania z zastosowaniem okresowych hodowli wgłębnych oraz zasilanych okresowych hodowli wgłębnych prowadzono w bioreaktorze laboratoryjnym Biomer 10 o pojemności całkowitej 7,0 dm³ i roboczej 5,0 dm³. Do bioreaktora laboratoryjnego wprowadzano przygotowane podłoże hodowlane i sterylizowano w temperaturze 121°C przez 30 min. Razem z bioreaktorem sterylizowano środek przeciwpianowy, podłoże służące do zasilania hodowli okresowych oraz węże pomp dozujących środek przeciwpianowy do fermentora. Do bioreaktora zawierającego 5 dm³ sterylnego podłoża hodowlanego wprowadzano obliczoną i odmierzoną objętość inokulum, tak aby stężenie konidiów wynosiło 10⁵·cm⁻³. Hodowle prowadzono w temperaturze 30°C, przy ciągłym mieszaniu i napowietrzaniu. W celu zapewnienia odpowiedniego poziomu stężenia tlenu rozpuszczonego w podłożu hodowlanym wraz z przyrostem biomasy grzybni w kolejnych dniach trwania bioprocessu stopniowo podnoszono szybkość obrotową wału mieszadła z 300 do 800 obr·min⁻¹ i zwiększano szybkość napowietrzania z 0,13 do 0,30 dm³·dm⁻³·min⁻¹.

METODY

Metody analityczne

Próbki podłoża przed oznaczeniami odwirowywano z wykorzystaniem wirówki laboratoryjnej Sigma® 4K15, przy prędkości 8000 obr·min⁻¹ przez 15 min. Zawartość kwasów organicznych i glicerolu w podłożu hodowlanym oznaczano chromatograficznie, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), na chromatografii Perkin Elmer wyposażonym w detektor UV/VIS CE oraz detektor RI Perkin Elmer Series 200, przy długości fali 210 nm. W czasie analiz stosowano kolumnę Knauer Eurokat H65, utrzymywaną w temperaturze 60°C w termostacie Cobrabid Type KB-5506. Prędkość przepływu próbki ustalono na poziomie 0,6 cm³·min⁻¹, z zastosowaniem wody do HPLC (Firma Chempur Piekary Śląskie) jako eluentu. Czas trwania analizy wynosił 30 min. Każdą próbkę filtrowano przez nylonowy filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm. Objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła 20 μl.

Stężenie cukrów redukujących w podłożach hodowlanych, po uprzednim odwirowaniu biomasy, oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika

DNS (kwas 3,5-dinitrosalicylowy). W celu pomiaru absorbancji stosowano spektrofotometr Marcel Media. Absorbancję próbki analizowano przy długości fali 540 nm wobec próbki kontrolnej.

Analiza statystyczna

Do oceny przebiegu hodowli obliczono następujące parametry kinetyczne: szybkość objętościową wzrostu biomasy (R_X), średnią szybkość objętościową biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego (R_P), wydajność biosyntezy biomasy substratu ($Y_{X/S}$), wydajność biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego w stosunku do wprowadzonego substratu ($Y_{P/S}$), współczynnik efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego (K_{ef}). Do wykonania obliczeń i prezentacji danych zastosowano pakiet Microsoft Excel – Microsoft Office 365.

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem programu Statistica 12.0 (Statsoft Inc.). Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. Do stwierdzenia, czy między badanymi grupami występują istotne statystycznie różnice wykorzystano analizę wariancji ANOVA.

WYNIKI I DISKUSJA

Parametry kinetyczne charakteryzujące wzrost biomasy, zużywanie substratu i biosyntezę kwasu cytrynowego w okresowych hodowlach wglębnych (BC) *Aspergillus niger* PD-66 prowadzonych w bioreaktorze przedstawiono w tabeli 1.

Analiza wyników badań wykazała, że w okresowych hodowlach wglębnych końcowe stężenie kwasu cytrynowego (P_K) wynosiło $143,33 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Średnia szybkość objętościowa (R_P) biosyntezy kwasu cytrynowego wynosiła $0,607 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, całkowita wydajność ($Y_{P/S}$) biosyntezy kwasu cytrynowego w stosunku do wprowadzonego substratu osiągnęła wartość 95,80% (m/m), a współczynnik efektywności (K_{ef}) biosyntezy kwasu cytrynowego był równy $58,15 \% \cdot \text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$.

Przebieg okresowej hodowli wglębnej oraz kształtowanie się wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących biosyntezę kwasu cytrynowego, zużywanie substratu oraz wzrost biomasy przedstawiono na rysunkach 1, 2 i 3.

Nagromadzanie kwasu cytrynowego w podłożu hodowlanym rozpoczęło się po upływie drugiej doby hodowli. Szybkość objętościowa biosyntezy kwasu cytrynowego wzrastała w trakcie hodowli i utrzymywała się na wysokim poziomie aż do ostatniej doby hodowli (rys. 1).

W pierwszej dobie hodowli obserwowano znaczny wzrost szybkości objętościowej zużycia substratu ($R_S = 0,820 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$). W następnej dobie szybkość objętościowa zużycia substratu spadła i ponownie zaczęła wzrastać w czwartej dobie hodowli (rys. 2).

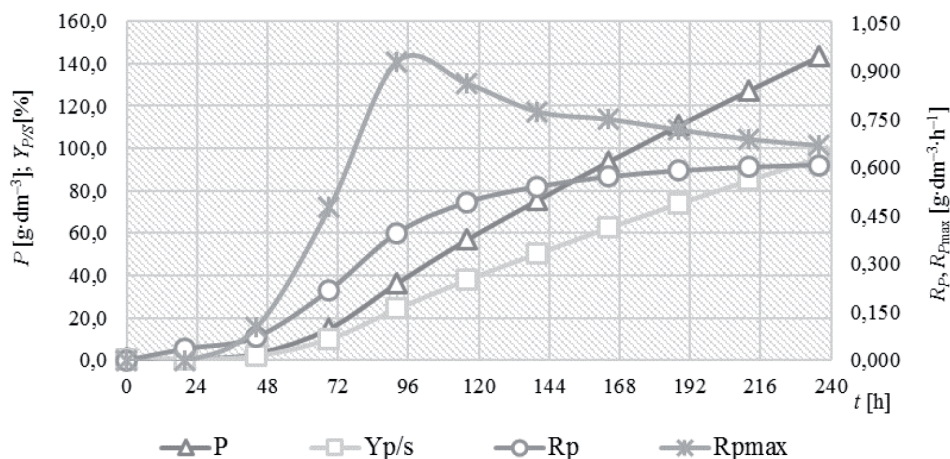
Największą szybkość objętościową biosyntezy biomasy (R_X), wynoszącą $0,130 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ stwierdzono w trzeciej dobie hodowli (rys. 3).

W kolejnym etapie badań, po dokonaniu analizy przebiegu okresowych hodowli wglębnych *Aspergillus niger* PD-66, badano przydatność zasilanych okresowych hodowli wglębnych (FBC) do produkcji kwasu cytrynowego. W tym celu podłoże hodowlane

Tabela 1. Podstawowe parametry kinetyczne charakteryzujące biosyntezę kwasu cytrynowego w okresowych hodowlach wglębnych *Aspergillus niger* PD-66 prowadzonych w bioreaktorze

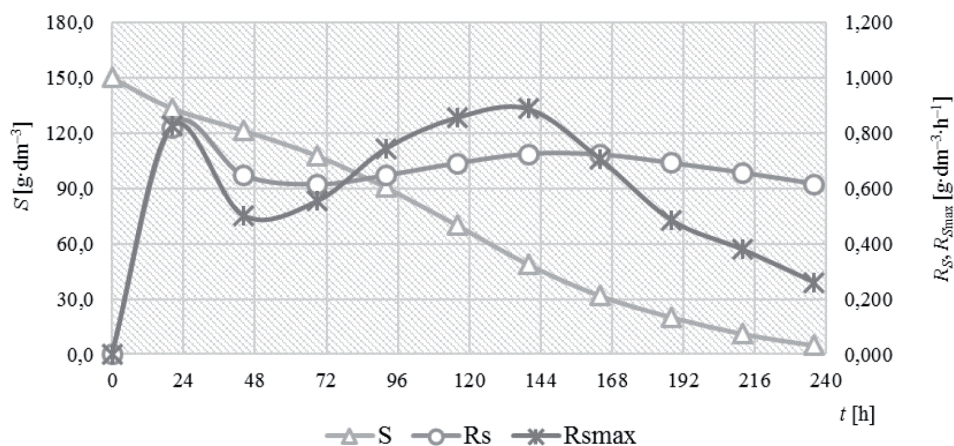
Table 1. Kinetic parameters of citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger* PD-66 in submerged batch cultures

Symbol	Jednostka Unit	Parametr – Parameter	Wartość Value
t	h	czas trwania hodowli culture time	236
G_0	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	początkowe stężenie glicerolu w podłożu initial concentration of glycerol in the medium	135,00
S_{SC}	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	początkowe stężenie sacharozy w podłożu initial sucrose concentration in the medium	15,00
S_0	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	początkowe stężenie substratu (glicerol + sacharoza) w podłożu initial substrate concentration (glycerol + sucrose) in the substrate	150,00
G_K	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	końcowe stężenie glicerolu w podłożu final concentration of glycerol in the medium	4,76
R_S	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$	średnia szybkość objętościowa zużywania substratu the average volume rate of substrate consumption	0,605
$R_{S\max}$	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$	maksymalna szybkość objętościowa zużywania substratu maximum surface speed of substrate consumption	0,888
X_K	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	końcowe stężenie biomasy w podłożu final biomass concentration in the substrate	13,32
R_X	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$	średnia szybkość objętościowa wzrostu biomasy average volume rate of biomass growth	0,056
μ	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	szybkość właściwa wzrostu biomasy specific speed of biomass growth	0,0030
P_K	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$	końcowe stężenie jednowodnego kwasu cytrynowego w podłożu final concentration of citric acid monohydrate in the medium	143,33
R_P	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$	średnia szybkość objętościowa biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego the average volume rate of the biosynthesis of citric acid monohydrate	0,607
$R_{P\max}$	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$	maksymalna szybkość objętościowa biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego maximum volume rate of the biosynthesis of citric acid monohydrate	0,962
Y_{XS}	% (m/m)	wydajność biosyntezy biomasy biomass biosynthesis efficiency	8,900
Y_{PS}	% (m/m)	wydajność biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego biosynthesis efficiency of citric acid monohydrate	95,80
K_{ef}	$\% \cdot \text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$	współczynnik efektywności biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego coefficient of efficiency of citric acid monohydrate biosynthesis	58,15



Rys. 1. Przebieg zmian wartości podstawowych parametrów kinetycznych charakteryzujących stężenie kwasu cytrynowego (P), wydajność ($Y_{p/s}$), szybkość objętościową (R_p), maksymalną szybkość objętościową (R_{pmax}) biosyntezy kwasu cytrynowego w okresowej hodowli wstępnej *Aspergillus niger* PD-66

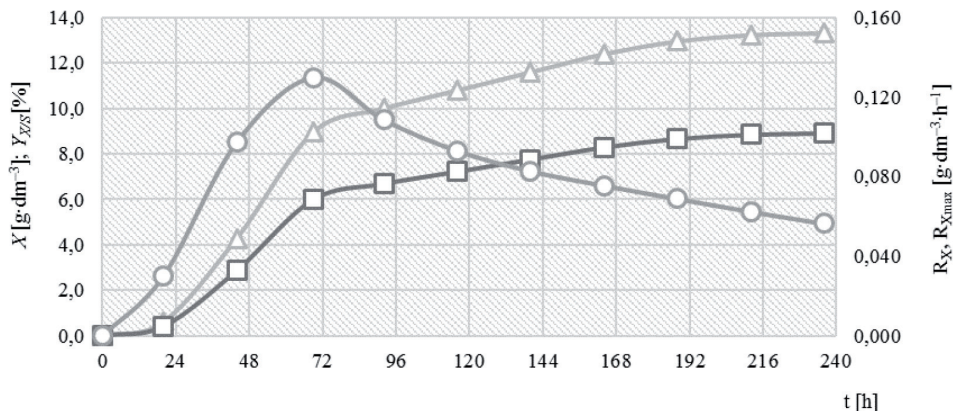
Fig. 1. Time course of changes of citric acid concentration (P), yield ($Y_{p/s}$) and volumetric rate (R_p) and maximum volumetric rate (R_{pmax}) of citric acid concentration in submerged batch culture of *Aspergillus niger* PD-66



Rys. 2. Przebieg zmian wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących stężenie substratu (glicerol + sacharoza) (S), szybkość objętościową (R_s), maksymalną szybkość objętościową (R_{smax}) jego zużycia w okresowej hodowli wstępnej *Aspergillus niger* PD-66

Fig. 2. Time course of changes of substrate concentration (glycerol + sucrose) (S), volumetric rate of substrate consumption (R_s), maximum volumetric rate of substrate consumption (R_{smax}) in submerged batch culture of *Aspergillus niger* PD-66

zasilano glicerolem bezwodnym w ilości $35,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ w 65., 93. i 113. godzinie bioprocesu. W ten sposób badano wpływ momentu jednorazowego zasilania podłoża hodowlanego na szybkość i wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego.



Rys. 3. Przebieg zmian wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących stężenie biomasy (X), wydajność ($Y_{X/S}$), szybkość objętościową (R_X) jej wzrostu w okresowej hodowli wglębnej *Aspergillus niger* PD-66

Fig. 3. Time course of changes of substrate concentration biomass concentration in culture medium (X), yield of biomass with respect to the introduced substrate ($Y_{X/S}$), volumetric rate of biomass growth (R_X) in submerged batch culture of *Aspergillus niger* PD-66

Wyniki badań wpływu momentu jednorazowego zasilenia hodowli glicerolem bezwodnym na kształtowanie się wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących wzrost biomasy, zużywanie substratu i biosyntezę kwasu cytrynowego w zasilanych okresowych hodowlach wglębnych *Aspergillus niger* PD-66 prowadzonych w bioreaktorze przedstawiono w tabeli 2.

Po dokonaniu analizy uzyskanych wyników stwierdzono, że najkorzystniejsze wartości parametrów charakteryzujących przebieg hodowli uzyskano w hodowlach zasilonych glicerolem bezwodnym pod koniec czwartej doby. Końcowe stężenie kwasu cytrynowego w tych hodowlach wynosiło $118,40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, a całkowita wydajność biosyntezy kwasu cytrynowego w stosunku do wprowadzonego substratu wynosiła $77,10\%$ (m/m). W tym wariantcie hodowli otrzymano również największą wartość współczynnika efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego ($K_{ef} = 35,23 \text{ \%}\cdot\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$). Opóźnienie zasilenia o jedną dobę wpłynęło na obniżenie wydajności biosyntezy kwasu cytrynowego ($Y_{P/S}$) o około 20% oraz zmniejszenie szybkości objętościowej biosyntezy kwasu cytrynowego (R_P) o $0,085 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$. Współczynnik efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego (K_{ef}) w hodowlach zasilonych w piątej dobie wyniósł jedynie $18,35 \text{ \%}\cdot\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ i był zdecydowanie niższy niż w tradycyjnych okresowych hodowlach wglębnych.

Zasilenie hodowli glicerolem bezwodnym w trzeciej dobie spowodowało obniżenie końcowego stężenia kwasu cytrynowego o około $5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, a całkowitej wydajności biosyntezy kwasu cytrynowego o około 10% . W hodowlach zasilonych w trzeciej dobie nastąpiło znaczne wydłużenie czasu trwania hodowli oraz zmniejszenie szybkości objętościowej zużywania substratu ($R_S = 0,398 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) oraz szybkości objętościowej biosyntezy kwasu cytrynowego ($R_P = 0,372 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$).

Tabela 2. Parametry kinetyczne charakteryzujące biosyntezę kwasu cytrynowego w zasilanych okresowych hodowlach wglębnych *Aspergillus niger* PD-66 prowadzonych w bioreaktorze

Table 2. Kinetic parameters of citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger* PD-66 in fed submerged batch cultures

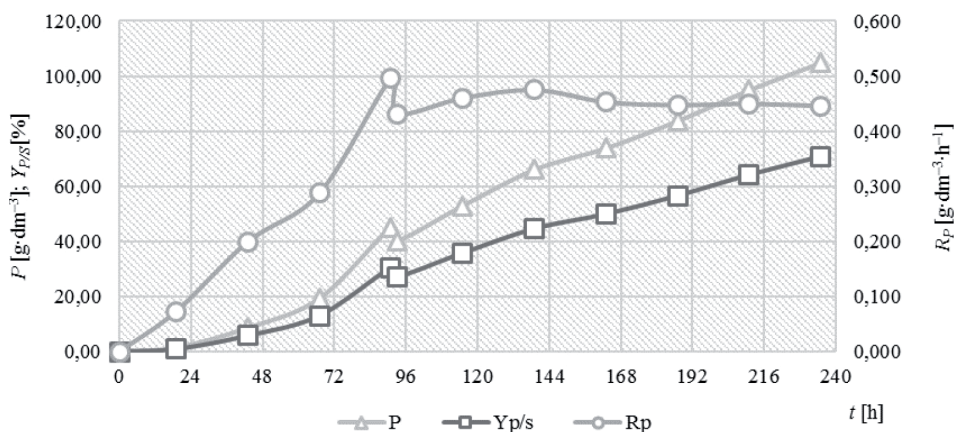
Symbol	Jednostka Unit	Parametr – Parameter	Moment zasilenia hodowli Feeding moment of the bead		
			t_f [h]		
			65	93	113
t	h	czas trwania hodowli culture time	305	259	209
G_0	$g \cdot dm^{-3}$	początkowe stężenie glicerolu w podłożu initial concentration of glycerol in the medium	100,0	100,0	100,0
S_{SC}	$g \cdot dm^{-3}$	początkowe stężenie sacharozy w podłożu initial sucrose concentration in the medium	15,0	15,0	15,0
G_Z	$g \cdot dm^{-3}$	ilość glicerolu dodanego w trakcie zasilania amount of glycerol added during feeding	35,0	35,0	35,0
G_S	$g \cdot dm^{-3}$	sumaryczne stężenie glicerolu w podłożu total concentration of glycerol in the medium	135,0	135,0	135,0
G_K	$g \cdot dm^{-3}$	końcowe stężenie glicerolu w podłożu final concentration of glycerol in the medium	27,8	6,5	33,9
S_0	$g \cdot dm^{-3}$	sumaryczne stężenie substratu (glicerol + sacharoza) total substrate concentration (glycerol + sucrose)	150,00	150,00	150,00
R_S	$g \cdot dm^{-3} \cdot h^{-1}$	średnia szybkość objętościowa zużywania substratu the average volume rate of substrate consumption	0,398	0,544	0,555
R_{Smax}	$g \cdot dm^{-3} \cdot h^{-1}$	maksymalna szybkość objętościowa zużywania substratu maximum surface speed of substrate consumption	0,724	0,839	0,840
X_K	$g \cdot dm^{-3}$	końcowe stężenie biomasy w podłożu final biomass concentration in the substrate	13,50	15,32	11,08
R_X	$g \cdot dm^{-3} \cdot h^{-1}$	średnia szybkość objętościowa wzrostu biomasy average volume rate of biomass growth	0,044	0,059	0,053
u	$g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	szybkość właściwa wzrostu biomasy specific speed of biomass growth	0,002	0,004	0,001
P_K	$g \cdot dm^{-3}$	końcowe stężenie jednowodnego kwasu cytrynowego w podłożu final concentration of citric acid monohydrate in the medium	113,50	118,40	66,20
R_P	$g \cdot dm^{-3} \cdot h^{-1}$	średnia szybkość objętościowa biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego average volume rate of the biosynthesis of citric acid monohydrate	0,372	0,457	0,317
R_{Pmax}	$g \cdot dm^{-3} \cdot h^{-1}$	maksymalna szybkość objętościowa biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego maximum volume rate of the biosynthesis of citric acid monohydrate	0,773	1,079	0,671
Y_{XS}	% (m/m)	wydajność biosyntezy biomasy biomass biosynthesis efficiency	9,10	10,21	7,40
Y_{PS}	% (m/m)	wydajność biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego biosynthesis efficiency of citric acid monohydrate	76,10	77,10	57,90
K_{ef}	$g \cdot dm^{-3} \cdot h^{-1}$	współczynnik efektywności biosyntezy jednowodnego kwasu cytrynowego coefficient of efficiency of citric acid monohydrate biosynthesis	28,31	35,23	18,35

Przebieg przykładowej zasilanej okresowej hodowli wglębnej (prowadzonej w podłożu hodowlanym zawierającym w początkowym składzie glicerol bezwodny o stężeniu $100,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ i sacharozę $15,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, do której w 93. godzinie dodano glicerol bezwodny w ilości $35,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$), oraz kształtowanie się wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących biosyntezę kwasu cytrynowego, zużycie substratu oraz wzrost biomasy przedstawiono na rysunkach 4, 5 i 6.

Z analizy przebiegu zasilanej okresowej hodowli wglębnej zasilonej jedną dawką glicerolu w 93. godzinie hodowli wynika, że w pierwszej dobie hodowli po dodaniu glicerolu bezwodnego zaobserwowano zmniejszenie szybkości objętościowej biosyntezy kwasu cytrynowego (R_p) o $0,064 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$. W kolejnej dobie szybkość objętościowa biosyntezy kwasu cytrynowego nie osiągnęła poziomu obserwowanego przed zasileniem, utrzymywała się jednak na stałym poziomie do ostatniej doby hodowli. Jednorazowe zasilenie glicerolem nie wpłynęło znacząco również na zmiany szybkości objętościowej wzrostu biomasy (R_x).

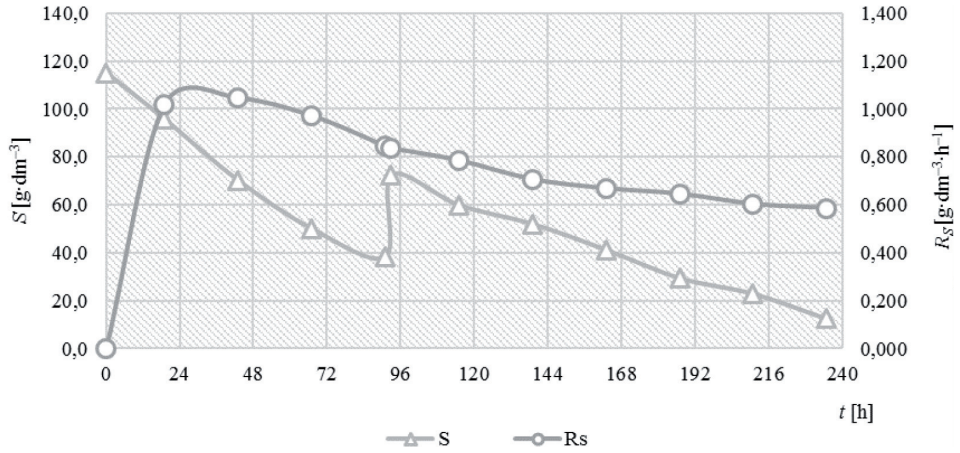
Porównanie przebiegu zasilanej okresowej hodowli wglębnej z tradycyjną hodowlą okresową wykazało, że jednorazowe zasilenie hodowli glicerolem bezwodnym przyczyniło się do zmniejszenia końcowego stężenia kwasu cytrynowego w podłożu hodowlanym oraz całkowitej wydajności biosyntezy kwasu cytrynowego o około 20%.

Analiza statystyczna wyników wykazała istotny wpływ jednorazowego zasilenia podłoża hodowlanego glicerolem na proces biosyntezy kwasu cytrynowego. Porównanie wyników uzyskanych w tych hodowlach z wynikami z tradycyjnych okresowych hodowli wglębnych wykazało, że jednorazowe zasilenie hodowli glicerolem bezwodnym w ilości $35,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, w każdym ze zbadanych momentów zasilenia, wyraźnie negatywnie wpły-



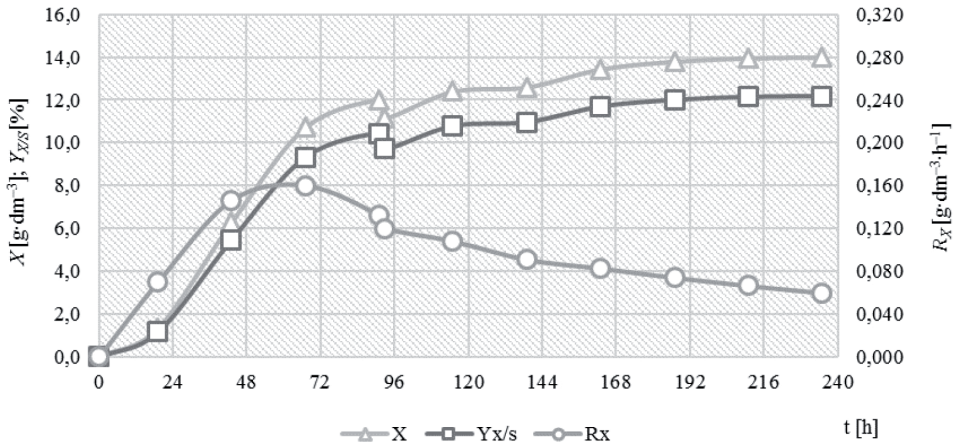
Rys. 4. Przebieg zmian wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących stężenie kwasu cytrynowego (P), wydajność ($Y_{p/s}$), szybkość objętościową (R_p) biosyntezy kwasu cytrynowego w zasilanej okresowej hodowli wglębnej *Aspergillus niger* PD-66, do której w 93. godzinie hodowli dodawano $35,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicerolu bezwodnego

Fig. 4. Time course of changes of citric acid concentration (P), yield ($Y_{p/s}$) and volumetric rate (R_p) and maximum volumetric rate (R_{pmax}) of citric acid concentration in fed submerged batch culture of *Aspergillus niger* PD-66 after 93 hours culture



Rys. 5. Przebieg zmian wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących stężenie substratu (S), szybkości objętościowej (R_s) jego zużycia w zasilanej okresowej hodowli wglębnej *Aspergillus niger* PD-66, do której w 93. godzinie hodowli dodawano 35,0 g·dm⁻³ glicerolu bezwodnego

Fig. 5. Time course of changes of substrate concentration (glycerol + sucrose) (S), volumetric rate of substrate consumption (R_s), maximum volumetric rate of substrate consumption (R_{Smax}) in fed submerged batch culture of *Aspergillus niger* PD-66 after 93 hours culture



Rys. 6. Przebieg zmian wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących stężenie biomasy (X), wydajność ($Y_{x/s}$) szybkość objętościową (R_x) jej wzrostu w zasilanej okresowej hodowli wglębnej *Aspergillus niger* PD-66, do której w 93. godzinie hodowli dodawano 35,0 g·dm⁻³ glicerolu bezwodnego

Fig. 6. Time course of changes of substrate concentration biomass concentration in culture medium (X), yield of biomass with respect to the introduced substrate ($Y_{x/s}$), volumetric rate of biomass growth (R_x) in submerged batch culture of *Aspergillus niger* PD-66 after 93 hours culture

nęło na wydajność i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego. Jednorazowe zasilenie glicerolem bezwodnym spowodowało obniżenie końcowego stężenia kwasu cytrynowego w podłożu hodowlanym o około 20%, a współczynnik efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego obniżył się nawet o 50%. Ponadto jednorazowe zasilenie źródłem węgla spowodowało wzrost stężenia nieprzefermentowanego glicerolu pozostającego w podłożu hodowlanym na końcu hodowli. Nagromadzenie kwasu cytrynowego w zasilanych okresowych hodowlach wglębnych rozpoczęło się już w drugiej dobie procesu, a w okresowych hodowlach wglębnych po ukończeniu drugiej doby procesu.

Z przeprowadzonych badań wynika, że jednorazowe zasilenie hodowli glicerolem wpływa negatywnie na biosyntezę kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*. Niekorzystny wpływ zasilenia podłoża hodowlanego glicerolem może być wynikiem wydłużenia czasu adaptacji drobnoustrojów do alternatywnego źródła węgla, co przejawia się w opóźnieniu wzrostu komórek *Aspergillus niger*. W komórkach *Aspergillus niger* glicerol ulega fosforylacji do 3-fosfoglicerolu, podobnie jak w przypadku *Aspergillus nidulans* i *Saccharomyces cerevisiae*. Tę reakcję katalizuje kinaza glicerynowa, która u *Saccharomyces cerevisiae* jest produktem genu GUT1 [Hondmann i in. 1991, Salazar Peña 2010, Nicol i in. 2012]. Następnie 3-fosfoglicerol pod wpływem dehydrogenazy 3-fosfoglicerynowej, zależnej od FAD^+ , ulega utlenieniu do fosfodihydroksyacetonu, który zostaje włączony do szlaku glikolitycznego. Pobór glicerolu przez drobnoustroje odbywa się na zasadzie transportu aktywnego, poprzez symport glicerol/ H^+ lub glicerol/ Na^+ i może być czynnikiem spowalniającym wzrost drobnoustrojów, co potwierdził zespół Kleina na przykładzie szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [Klein i in. 2017]. Zespół Swinnena wykazał, że maksymalna szybkość właściwa wzrostu biomasy (μ_{max}) *Saccharomyces cerevisiae* w podłożach z glicerolem bezwodnym w stężeniu 6% (v/v) wynosiła $0,15 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ [Swinnen i in. 2013]. W swojej pracy doktorskiej Salazar Peña także potwierdziła, że wzrost szczepu *Aspergillus niger* jest cztery razy wolniejszy w podłożach zawierających glicerol w porównaniu do szybkości wzrostu w podłożach z glukozą jako źródłem węgla [Salazar Peña 2010].

Zasilenie hodowli glicerolem w ilości $30,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ mogło wywołać zjawisko represji katabolicznej węgla, w wyniku której wysokie stężenia źródła węgla mogą hamować syntezę enzymów związanych z katabolizmem alternatywnego źródła węgla [Ruijter i Visser 2006, Jankiewicz 2007].

Zastosowanie glicerolu do produkcji kwasu cytrynowego przez grzyby strzępkowe *Aspergillus niger* w okresowych hodowlach wglębnych oraz zasilanych okresowych hodowlach wglębnych jest zagadnieniem nowym i mało poznanym. W literaturze brak wyników badań dotyczących zastosowania zasilanych hodowli okresowych *Aspergillus niger* do biosyntezy kwasu cytrynowego z użyciem glicerolu jako głównego źródła węgla. Zastosowanie zasilanych hodowli okresowych zostało zbadane głównie w kontekście produkcji kwasu cytrynowego w podłożach z glicerolem przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Rywińska i współpracownicy w okresowych zasilanych hodowlach wglębnych *Yarrowia lipolytica* uzyskali stężenie kwasu cytrynowego równe $139,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [Rywińska i in. 2009]. W prowadzonych przez autorów hodowlach początkowe stężenie glicerolu odpadowego wynosiło $80,0\text{--}100,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, a zasilenie podłoża hodowlanego glicerolem następowało w dwóch porcjach, w 24. i 48. godzinie hodowli, tak aby stężenie glicerolu w podłożu wyniosło $200,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [Rywińska i in. 2009]. Rywińska i Rymowicz w powtarzanych

zasilanych hodowlach okresowych (RBC) *Yarrowia lipolytica* w podłożach z glicerolem uzyskali $124,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu cytrynowego, produkowanego z wydajnością i produktywnością wynoszącą odpowiednio $0,77 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ i $0,85 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Prowadzone hodowle zasilało glicerolem co 3 dni w ilości 30%. Taka metoda produkcji kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica*, w porównaniu do tradycyjnych okresowych hodowli wglębnych, pozwoliła na uzyskanie większej wydajności procesu oraz wydłużyła czas intensywnej biosyntezy kwasu cytrynowego [Rywińska i Rymowicz 2010].

Zasilane okresowe hodowle wglębne zastosowano do produkcji kwasu propionowego przez *Propionibacterium acidipropionici* oraz *Propionibacterium freudenreichii* w podłożach hodowlanych zawierających w swoim składzie glicerol lub glukozę. Okresowe hodowle wglębne zasilane glicerolem pozwoliły na uzyskanie większej o około 50% wydajności procesu w porównaniu do hodowli zasilanych glukozą [Himmi i in. 2000]. Podobnie dużą wydajność biosyntezy kwasu bursztynowego wynoszącą 160% uzyskano w hodowlach *Anaerobiospirillum succiniciproducens* zasilanych glicerolem i ekstraktem drożdżowym [Lee i in. 2017].

WNIOSKI

1. Wykazano, że w jednorazowo zasilanych glicerolem bezwodnym okresowych hodowlach wglębnych wydajność kwasu cytrynowego i szybkość jego biosyntezy były mniejsze niż w tradycyjnych hodowlach okresowych. Zastosowana procedura wpływa także na zmniejszenie stężenia biomasy, hamuje biosyntezę kwasu cytrynowego oraz przyczynia się do zmniejszenia szybkości objętościowej i właściwej zużycia substratu.

2. W okresowych hodowlach wglębnych *Aspergillus niger* PD-66 uzyskano wyższą szybkość, wydajność i efektywność biosyntezy kwasu cytrynowego ($R_p = 0,607 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$; $Y_{P/S} = 95,80\%$; $K_{ef} = 58,15 \text{ \%}\cdot\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$), aniżeli w hodowlach zasilanych.

3. Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach wskazują na celowość ich kontynuacji. Dalsze badania sprzyjać powinny doskonaleniu metod produkcji kwasu cytrynowego, a także umożliwić lepsze poznanie szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za wydajną biokonwersję glicerolu przez *Aspergillus* oraz doprowadzić do powszechnego zastosowania glicerolu jako taniego substratu w przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego lub innych kwasów organicznych.

LITERATURA

- Apelblat A., 2014. Citric acid. Cham: Springer International Publishing, Basel.
- Berg J.M., Jeremy M., Tymoczko J.L., Stryer L., 2002. Biochemistry. W.H. Freeman, New York.
- Foryś E., Podgórski W., Kaczyńska M., 2007. Wpływ makroelementów na proces biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez *Aspergillus niger* W78B1. Acta Sci. Pol. Biotechnologia 6 (4), 31–37.
- Goldberg I., Rokem J.S., Pines O., 2006. Organic acids: old metabolites, new themes. J. Chem. Tech. Biot. 81 (10), 1601–1611.

- Himmi E.H., Bories A., Boussaid A., Hassani L., 2000. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Appl. Microbiol. Biot.* 53 (4), 435–440.
- Hondmann D.H.A., Busink R., Witteveen C.F.B., Vlsser J., 1991. Glycerol catabolism in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 137 (3), 629–636.
- Jankiewicz U., 2007. Wpływ warunków hodowli na poziom aktywności endopeptydazy syntetyzowanej przez glebowe bakterie *Pseudomonas fluorescens*. *Rocz. Glebozn.* 3/4, 84–94.
- Klein M., Swinnen S., Thevelein J.M., Nevoigt E., 2017. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environ. Microbiol.* 19 (3), 878–893.
- Lee J.W., Yi J., Kim T.Y., Choi S., Ahn J.H., Song H., Lee S.Y., 2016. Homo-succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*. *Metab. Eng.* 38, 409–417.
- Najafpour G.D., 2015. Production of citric acid. W: *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier B.V., Amsterdam, 363–373.
- The National Center for Biotechnology Information, 2018. Citric Acid. Pobrane z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=311>.
- Nicol R.W., Marchand K., Lubitz W.D., 2012. Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Appl. Microbiol. Biot.* 93 (5), 1865–1875.
- Papagianni M., 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.* 25 (3), 244–263.
- Pietkiewicz J.J., 2002. Biosynteza kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* w warunkach jedno- i wielostopniowych hodowli ciągłych. *Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Monografie i Opracowania* 100, 927.
- BioPortfolio, 2017. Biodiesel Market by Feedstock Type. Vegetable Oils (Soybean, Rapeseed, Palm), Animal Fats (Lard/White Grease, Poultry, Tallow), Brown Grease/ Trap Grease), Application (Fuel, Power Generation), and Region – Global Forecast to 2021 (India).
- Ruijter G.J., Visser J., 2006. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151 (2), 103–114.
- Rywińska A., Rymowicz W., 2010. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 37 (5), 431–435.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Wojtatowicz M., 2009. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in Fed-Batch Fermentation. *Food Technol. Biotech.* 47 (1), 1–6.
- Salazar Peña M., 2010. Systems biology of glucose sensing and repression in *Aspergillus niger*: lessons from genomics and transcriptomics. PhD thesis. Chalmers University of Technology.
- Sauer M., Mattanovich D., Marx H., 2013. Microbial production of organic acids for use in food. W: B. McNeil, D. Archer, I. Giavasis, L. Harvey (red.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing, Philadelphia, 288–320.
- Schneider M., Zimmer G.F., Cremonese E.B., Schneider R., Corbellini V.A., 2014. By-products from the biodiesel chain as a substrate to citric acid production by solid-state fermentation. *Waste Manage. Res.* 32 (7), 653–660.
- Singh Dhillon G., Kaur Brar S., Verma M., Tyagi R.D., 2011. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food. Bioprocess. Tech.* 4 (4), 505–529.
- Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food. Technol. Biotech.* 44 (2), 141–149.

- Swinnen S., Klein M., Carrillo M., McInnes J., Nguyen H.T., Nevoigt E. 2013. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnol. Biofuel.* 6 (1), #157.
- Vandenbergh L.P.S., Rodrigues C., Carvalho J.C., Medeiros A.B.P., Soccol C.R., 2017. Production and Application of Citric Acid. W: A. Pandey, S. Negi, C.R. Soccol (red.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V., Amsterdam, 557–575.

THE INFLUENCE OF FED BATCH CULTURE ON THE EFFICACY OF CITRIC ACID BIOSYNTHESIS

Summary. Citric acid has been used in many areas of industry. Its annual global production reaches about 1.8 million tonnes, and the citric acid market is one of the fastest growing segment of food additives. The reason for the continuous increase in citric acid production is its wide application in the food, chemical and pharmaceutical industry. The growing demand for citric acid in the world is a stimulus to work on the use of alternative carbon sources for its biosynthesis. The aim of this study was to evaluate the effect of the moment of feeding the medium with glycerol on the rate and efficiency of citric acid biosynthesis in fed batch submerged cultures. For this purpose, the culture medium was feed with anhydrous glycerol at a concentration of $35.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ at 65.93 and 113 hours of the bioprocess. Studies using submerged cultures and fed submerged cultures were carried out in a laboratory bioreactor with a working volume of 5.0 dm^3 . For the preparation of culture media anhydrous glycerol and sucrose, as an energy and carbon source, were used. In the study the strain *Aspergillus niger* PD-66 from the collection of the Department of Biotechnology and Food Analysis, Wrocław University of Economics was used. Subsequent attempts to intensify the biosynthesis of citric acid using a fed batch culture gave unsatisfying results. The best results of the volumetric rate, efficiency and effectiveness of citric acid biosynthesis in submerged cultures of the *Aspergillus niger* PD-66 were obtained ($R_p = 0.607 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$; $Y_{p/S} = 95.80\%$; $K_{ef} = 58.15 \text{ \%}\cdot\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$). The most preferred values of the parameters characterizing the course of fed submerged cultures were obtained in cultures fed with glycerol at 93rd hour of the bioprocess. A single supply of $35 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ anhydrous glycerol resulted in a decrease in biomass concentration, inhibition of citric acid biosynthesis and in reduced volume rate and substrate consumption. The results obtained in the conducted studies indicate the desirability of their continuation. Subsequent research should promote the improvement of citric acid production methods and allow better understanding of the metabolic pathways responsible for the efficient glycerol bioconversion of *Aspergillus*. In addition, they should lead to the widespread use of glycerol as a cheap substrate in the industrial production of citric acid or other organic acids.

Key words: citric acid, glycerol, biosynthesis, *Aspergillus niger*, submerged culture