RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235896**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426667**

(22) Data zgłoszenia: **14.08.2018**

(51) Int.Cl.
C07C 51/42 (2006.01)
B01D 61/42 (2006.01)
C07C 59/347 (2006.01)

(54) **Sposób wydzielania kwasu alfa-ketoglutarowego (AKG) z rzeczywistych płynów pofermentacyjnych techniką elektrodializy z membraną bipolarną**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
24.02.2020 BUP 05/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.11.2020 WUP 17/20

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
MATEUSZ SZCZYGIEŁDA, Szamotuły, PL
KRYSTYNA PROCHASKA, Suchy Las, PL

PL 235896 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania kwasu alfa-ketoglutarowego (AKG) z rzeczywistych płynów pofermentacyjnych z zastosowaniem techniki elektrodializy z membraną bipolarną (EDBM).

Kwas alfa-ketoglutarowy jest jedną z substancji naturalnie występujących w organizmach żywych jako związek pośredni w cyklu kwasów trikarboksylowych oraz w biosyntezie aminokwasów. Dzięki swym chemicznym i funkcjonalnym właściwościom kwas AKG jest interesującym związkiem o szerokim spektrum aplikacyjnym (Blonde-Cynober F., Aussel C., Cynober L., Nutrition, 19, 73–75, 2003; Kamzolova S. V., Morgunov I. G., Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, 5517–5525, 2013; Wu N., Yang M., Gaur U., Xu H., Yao Y., Li D., Biomol. Ther., 24, 1–8, 2016; Song Y., Li J., Shin H-D., Liu L., Du G., Chen J., Bioresour. Technol., 219, 716–724, 2016; Bayliak M. M., Lylyk M. P., Shmihel H. V., Sorohynska O. M., Semchyshyn O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V., Comp. Biochem. Physiol., 204, 28–39, 2017). Używany jest w produkcji dodatków do żywności, suplementów diety, farmaceutyków, biodegradowalnych polimerów i preparatów stosowanych w rolnictwie. Ponadto kwas AKG stosuje się jako substrat w biochemicznej diagnostyce np. zapalenia wątroby, zawału mięśnia sercowego, dystrofii mięśniowej i in. Stwierdzone właściwości prozdrowotne kwasu AKG stanowią o możliwości jego stosowania jako dodatku do żywności (często w kompleksach np. z aminokwasami).

Kwas alfa-ketoglutarowy (AKG) jest jednym z kwasów organicznych, stanowiących przykład tzw. *zielonych chemikaliów*, które mogą być otrzymywane drogą biokonwersji jako efekt metabolizmu drobnoustrojów (Chernyavskaya O. G., Shishkanova N. V., Il'chenko A. P., Finogenova T. V., Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 152–158, 2000; Holz M., Otto C., Kretzschmar A., Yovkova V., Aurich A., Pötter M., Marx A., Barth G., Appl. Microbiol. Biotechnol., 89, 1519–1526, 2011; Yin X., Madzak C., Du G., Zhou J., Chen J., Appl. Microbiol. Biotechnol., 96, 1527–1537, 2012; Rywińska A., Juszczyk P., Wojtanowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W., Biomass Bioenerg., 48, 148–166, 2013; Cybulski K., Rymowicz W., Tomszewska-Hetman L., Rywińska A., Inż. Ap. Chem., 54, 74–76, 2015; Zeng W., Du G., Chen J., Li J., Zhou J., Process Biochem., 50, 1516–1522, 2015; Guo H., Su S., Madzak C., Zhou J., Chen H., Chen G., Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 9875–9884, 2016).

Biotechnologiczna konwersja źródeł węgla (glicerolu, melasy, n-parafin, serwatki, etanolu, i in.) z zastosowaniem mikroorganizmów do małocząsteczkowych związków organicznych, stanowi przyjazną dla środowiska metodę pozyskiwania cennych surowców. Jednakże, powstały w procesie biokonwersji płyn pofermentacyjny jest bardzo złożoną mieszaniną, która obok głównego produktu, np. kwasu AKG zawiera znaczne ilości biomasy oraz szereg zanieczyszczeń, takich jak: reszty nieprzereagowanych substratów, organiczne związki niejonowe oraz liczne sole nieorganiczne. Ponadto, należy pamiętać, że powstały kwas (np. AKG) obecny w medium pofermentacyjnym występuje nie w formie kwasowej, a jako sól (najczęściej sodowa) danego kwasu karboksylowego. Wśród metod wydzielania głównych produktów biokonwersji z płynu pofermentacyjnego ważną rolę odgrywają techniki membranowe. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na możliwość stosowania prądowych technik separacji membranowej (elektrodializa klasyczna czy elektrodializa z membraną bipolarną), które są szczególnie przydatne w procesach odseparowania i zatężania takich produktów biokonwersji, jak kwasy karboksylowe (Pengfei Wei, Ao Xia, Qiang Liao, Chihe Sun, Richen Lin, Enhancing fermentative hydrogen production with the removal of volatile fatty acids by *electrodialysis*, Bioresource Technology, 263 (2018) 437–443; Xin-Rong Pan, Wen-Wei Li, Liang Huang, Hou-Qi Liu, Han-Qing Yu, Recovery of high-concentration volatile fatty acids from wastewater using an acidogenesis--*electrodialysis* integrated system, Bioresource Technology, 260 (2018) 61–67; Shyam Suwal, Jiayi Li, Abigail S. Engelberth, Jen-Yi Huang, Application of electromembrane separation for recovery of acetic acid in lignocellulosic bioethanol production, Food and Bioproducts Processing, 109 (2018) 41–51; Nikola Pandurić, Anita Šalić, Bruno Zelić, Fully integrated biotransformation of fumaric acid by permeabilized baker's yeast cells with in situ separation of L-malic acid using ultrafiltration, acidification and *electrodialysis*, Biochemical Engineering Journal, 125 (2017) 221–229; Rhys Jon Jones, Jaime Massanet-Nicolau, Martijn J. J. Mulder, Giuliano Premier, Alan Guwy, Increased biohydrogen yields, volatile fatty acid production and substrate utilisation rates via the *electrodialysis* of a continually fed sucrose fermenter, Bioresource Technology, Volume 229 (2017) 46–52; D. Arslan, Y. Zhang, K. J. J. Steinbusch, L. Diels, H. De Wever, In-situ carboxylate recovery and simultaneous pH control with tailor-configured bipolar membrane *electrodialysis* during continuous mixed culture fermentation, Separation and Purification Technology, 175 (2017) 27–35; Haiping Luo, Xing Cheng, Guangli Liu, Yajing Zhou,

Wenkai Teng, Citric acid production using a biological *electrodialysis* with bipolar membrane, Journal of Membrane Science, 523 (2017) 122–128; Yaoming Wang, Zenghui Zhang, Chenxiao Jiang, Tongwen Xu, Recovery of gamma-aminobutyric acid (GABA) from reaction mixtures containing salt by *electrodialysis*, Separation and Purification Technology, 170 (2016) 353–359; Chandan Kundu, So-Yeon Jeong, Jae-Won Lee, Bioethanol production from deacetylated yellow poplar pretreated with oxalic acid recovered through *electrodialysis*, Bioresource Technology, 208 (2016) 170–177; George Q. Chen, Franziska I. I. Eschbach, Mike Weeks, Sally L. Gras, Sandra E. Kentish, Removal of lactic acid from acid whey using *electrodialysis*, Separation and Purification Technology, Volume 158 (2016) 230–237; Jian Xu, Xian-Feng Su, Jia-Wei Bao, Yang-Qiu Chen, Zhong-Gui Mao, Cleaner production of citric acid by recycling its extraction wastewater treated with anaerobic digestion and *electrodialysis* in an integrated citric acid–methane production process, Bioresource Technology, 189 (2015) 186–194; Rhys Jon Jones, Jaime Massanet-Nicolau, Alan Guwy, Giuliano C. Premier, Matthew Reilly, Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional *electrodialysis*, Bioresource Technology, 189 (2015), 279–284.

Należy zaznaczyć, że zastosowanie elektrodializy z membraną bipolarną pozwala nie tylko na skuteczne wydzielenie kwasu karboksylowego z płynu pofermentacyjnego, ale równocześnie umożliwia konwersję soli obecnej w płynie poprocesowym do formy kwasowej (Rou Cao, Yong Xu, Efficient Preparation of Xylonic Acid from Xylonate Fermentation Broth by Bipolar Membrane Electrodialysis, Appl Biochem Biotechnol., https://doi.org/10.1007/s12010-018-2827-y; Mateusz Szczygiełda, Jerzy Antczak, Krystyna Prochaska, Separation and concentration of succinic acid from post-fermentation *broth* by *bipolar* membrane *electrodialysis* (EDBM), Sep. Purif. Technol., 181 (2017) 53–59; D. Arslan, Y. Zhang, K. J. J. Steinbusch, L. Diels, H. De Wever, In-situ carboxylate recovery and simultaneous pH control with tailor-configured *bipolar* membrane *electrodialysis* during continuous mixed culture fermentation, Sep. Purif. Technol., 175 (2017) 27–35; Krystyna Prochaska, Marta J. Woźniak-Budych, Recovery of fumaric acid from fermentation *broth* using bipolar *electrodialysis*, Journal of Membrane Science, 469 (2014) 428–435; Haiping Luo, Xing Cheng, Guangli Liu, Yajing Zhou, Wenkai Teng, Citric acid production using a biological *electrodialysis* with *bipolar* membrane, J. Memb. Sci., 523 (2017) 122–128; P. Pinacci, M. Radaelli, Recovery of citric acid from fermentation *broths* by *electrodialysis* with *bipolar* membranes, Desalination, 148, 2002, 177–179). Takie rozwiązanie niweluje konieczność zakwaszania płynu pofermentacyjnego po procesie biokonwersji, a więc eliminuje etap procesu biotechnologicznego otrzymywania kwasów, w którym powstają znaczne ilości trudnych do zagospodarowania odpadów.

Jak dotąd nie odnotowano żadnych doniesień wskazujących na zastosowanie procesu elektrodializy z membraną bipolarną do wydzielania kwasu alfa-ketoglutarowego z rzeczywistych płynów pofermentacyjnych.

Istotą wynalazku jest sposób wydzielania kwasu alfa-ketoglutarowego z rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy techniką elektrodializy z membraną bipolarną. W sposobie według wynalazku rzeczywisty płyn pofermentacyjny zawierający: kwas alfa-ketoglutarowy o stężeniu od 5,8 do 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy o stężeniu od 3,9 do 11,6 g/dm^3, kwas octowy o stężeniu od 0,9 do 2,7 g/dm^3, kwas propionowy o stężeniu od 0,2 do 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol o stężeniu od 1,7 do 5,1 g/dm^3, etanol o stężeniu od 4,3 do 12,9 g/dm^3 oraz wartości pH w przedziale: 2–3, korzystnie 2,5 rozdziela się techniką elektrodializy z membraną bipolarną z jednoczesną konwersją soli kwasu AKG do formy kwasowej, z zastosowaniem stosu membranowego wyposażonego w membranę anionowymienną (AM) oraz bipolarną (BP) o łącznej powierzchni aktywnej zastosowanych membran równej 64 cm^2 w określonych warunkach procesowych: obecność wodnego roztworu soli sodowej kwasu AKG o stężeniu 3 g/dm^3 oraz pH 4 w komorze koncentratu, natężenie przepływu roztworów roboczych równe 5,4 dm^3/h, zakres wartości gęstości prądu od 65 do 115 A/m^2, korzystnie 65 A/m^2, oraz temperaturze 25 ± 2°C. Korzystnym jest aby rzeczywisty płyn pofermentacyjny przed poddaniem separacji i równoczesnej konwersji do formy kwasowej oczyścić w celu usunięcia biomasy i związków wielkocząsteczkowych.

Dzięki zastosowaniu sposobu separacji i zatężania według wynalazku, uzyskano następujące efekty techniczno-użytkowe:

- transport anionów kwasu AKG z rzeczywistego płynu pofermentacyjnego do roztworów zatężania przez polimerowe membrany anionowymienne,
- selektywne oddzielenie anionów kwasu alfa-ketoglutarowego od pozostałych związków niewykazujących charakteru jonowego obecnych w rzeczywistym płynie pofermentacyjnym,

- możliwość wydzielenia kwasu AKG o zadowalającej czystości z rzeczywistych płynów pofermentacyjnych oraz konwersję soli kwasu AKG do formy kwasowej dzięki zastosowaniu membrany bipolarnej bez konieczności stosowania procesu zakwaszania oraz generowania strumieni odpadowych.

Wynalazek w przykładowym wykonaniu został zaprezentowany na rysunku gdzie fig. 1 przedstawia budowę i konfigurację zastosowanego stosu membranowego, fig. 2 przedstawia wykres zmiany stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego w komorze koncentratu w czasie trwania EDBM rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy o składzie: kwas AKG 5,8 g/dm^3, kwas mlekowy 3,9 g/dm^3, kwas octowy 0,9 g/dm^3, kwas propionowy 0,2 g/dm^3, 1,2-propanodiol 1,7 g/dm^3 oraz etanol 4,3 g/dm^3 (pH 2,5, gęstość prądu 65 A/m^2), fig. 3 przedstawia wykres zmiany stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego w komorze koncentratu w czasie trwania EDBM rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy o składzie: kwas AKG 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy 11,6 g/dm^3, kwas octowy 2,7 g/dm^3, kwas propionowy 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol 5,1 g/dm^3 oraz etanol 12,9 g/dm^3 (pH 2,5, gęstość prądu 65 A/m^2), fig. 4 przedstawia wykres zmiany stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego w komorze koncentratu w czasie trwania EDBM rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy o składzie: kwas AKG 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy 11,6 g/dm^3, kwas octowy 2,7 g/dm^3, kwas propionowy 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol 5,1 g/dm^3 oraz etanol 12,9 g/dm^3 (pH 2,5, gęstość prądu 115 A/m^2).

Istotę wynalazku ilustrują następujące przykłady:

Przykład 1

Elektrodializa z membraną bipolarną rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy zawierającego: kwas AKG 5,8 g/dm^3, kwas mlekowy 3,9 g/dm^3, kwas octowy 0,9 g/dm^3, kwas propionowy 0,2 g/dm^3, 1,2-propanodiol 1,7 g/dm^3 oraz etanol 4,3 g/dm^3 o pH 3, i gęstości prądu 65 A/m^2 (badanie wpływu wyjściowego stężenia roztworu diluatu).

Elektrodializie z membraną bipolarną poddano rzeczywisty płyn pofermentacyjny otrzymany w wyniku biokonwersji glukozy zawierający: kwas AKG 5,8 g/dm^3, kwas mlekowy 3,9 g/dm^3, kwas octowy 0,9 g/dm^3, kwas propionowy 0,2 g/dm^3, 1,2-propanodiol 1,7 g/dm^3 oraz etanol 4,3 g/dm^3 oraz pH ok. 2,5. Roztwór separowany wprowadzono do komory diluatu, podczas gdy roztwór wprowadzany do komory koncentratu zawierał sól sodową kwasu alfa-ketoglutarowego o stężeniu 3 g/dm^3 i pH 4. Proces EDBM prowadzony był w elektrodializerze wyposażonym w stos membranowy składający się z membrany anionowymiennej oraz membrany bipolarnej o łącznej powierzchni aktywnej równej 64 cm^2, przy stałej wartości gęstości prądu równej 65 A/m^2. Proces prowadzono przez 180 min, przy stałym natężeniu przepływu roztworów roboczych równym 5,4 dm^3/h, w temperaturze 23°C. Uzyskane zmiany stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego w czasie prowadzenia procesu EDBM w komorze koncentratu przedstawiono na fig. 2.

Przykład 2

Elektrodializa z membraną bipolarną rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy zawierającego: kwas AKG 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy 11,6 g/dm^3, kwas octowy 2,7 g/dm^3, kwas propionowy 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol 5,1 g/dm^3 oraz etanol 12,9 g/dm^3 o pH 2,5, i gęstości prądu 65 A/m^2 (badanie wpływu wyjściowego stężenia roztworu diluatu).

Elektrodializie z membraną bipolarną poddano rzeczywisty płyn pofermentacyjny otrzymany w wyniku biokonwersji glukozy zawierający: kwas AKG 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy 11,6 g/dm^3, kwas octowy 2,7 g/dm^3, kwas propionowy 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol 5,1 g/dm^3 oraz etanol 12,9 g/dm^3 oraz pH 2,5. Roztwór separowany wprowadzono do komory diluatu, podczas gdy roztwór wprowadzany do komory koncentratu zawierał sól sodową kwasu alfa-ketoglutarowego o stężeniu 3 g/dm^3 i pH 4. Proces EDBM prowadzony był w elektrodializerze wyposażonym w stos membranowy składający się z membrany anionowymiennej oraz membrany bipolarnej o łącznej powierzchni aktywnej równej 64 cm^2, przy stałej wartości gęstości prądu równej 65 A/m^2. Proces prowadzono przez 180 min, przy stałym natężeniu przepływu roztworów roboczych równym 5,4 dm^3/h, w temperaturze 25°C. Uzyskane zmiany stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego w czasie prowadzenia procesu EDBM w komorze koncentratu przedstawiono na fig. 3.

Przykład 3

Elektrodializa z membraną bipolarną rzeczywistego płynu pofermentacyjnego otrzymanego w wyniku biokonwersji glukozy zawierającego: kwas AKG 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy 11,6 g/dm^3, kwas octowy 2,7 g/dm^3, kwas propionowy 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol 5,1 g/dm^3 oraz etanol 12,9 g/dm^3 o pH 2,5, i gęstości prądu 115 A/m^2 (badanie wpływu zastosowanej gęstości prądu).

Elektrodializie z membraną bipolarną poddano rzeczywisty płyn pofermentacyjny otrzymany w wyniku biokonwersji glukozy zawierający: kwas AKG 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy 11,6 g/dm^3, kwas octowy 2,7 g/dm^3, kwas propionowy 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol 5,1 g/dm^3 oraz etanol 12,9 g/dm^3 oraz pH 2,5. Roztwór separowany wprowadzono do komory diluatu, podczas gdy roztwór wprowadzany do komory koncentratu zawierał sól sodową kwasu alfa-ketoglutarowego o stężeniu 3 g/dm^3 i pH 4. Proces EDBM prowadzony był w elektrodializerze wyposażonym w stos membranowy składający się z membrany anionowymiennej oraz membrany bipolarnej o łącznej powierzchni aktywnej równej 64 cm^2, przy stałej wartości gęstości prądu równej 115 A/m^2. Proces prowadzono przez 180 min, przy stałym natężeniu przepływu roztworów roboczych równym 5,4 dm^3/h, w temperaturze 27°C. Uzyskane zmiany stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego w czasie prowadzenia procesu EDBM w komorze koncentratu przedstawiono na fig. 4.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania kwasu alfa-ketoglutarowego z rzeczywistych płynów pofermentacyjnych, **znamienny tym**, że rzeczywisty płyn pofermentacyjny zawierający: kwas alfa-ketoglutarowy o stężeniu od 5,8 do 17,5 g/dm^3, kwas mlekowy o stężeniu od 3,9 do 11,6 g/dm^3, kwas octowy o stężeniu od 0,9 do 2,7 g/dm^3, kwas propionowy o stężeniu od 0,2 do 0,6 g/dm^3, 1,2-propanodiol o stężeniu od 1,7 do 5,1 g/dm^3, etanol o stężeniu od 4,3 do 12,9 g/dm^3 oraz wartości pH w przedziale: 2–3, korzystnie 2,5, poddaje się separacji i równoczesnej konwersji do formy kwasowej techniką elektrodializy z membraną bipolarną ze stosem elektrodialitycznym wyposażonym w układ membran: membrana anionowymienna (AM)-membrana bipolarna (BP) o łącznej powierzchni aktywnej membran równej 64 cm^2, przy natężeniu przepływu roztworów roboczych równym 5,4 dm^3/h, zakresie wartości gęstości prądu od 65 do 115 A/m^2, korzystnie 65 A/m^2, w temperaturze 25 ±2°C i w obecności wodnego roztworu soli sodowej kwasu AKG o stężeniu 3 g/dm^3 oraz pH 4 w komorze koncentratu.
2. Sposób według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że rzeczywisty płyn pofermentacyjny przed poddaniem separacji i równoczesnej konwersji do formy kwasowej oczyszcza się aby usunąć biomasę i związki wielkocząsteczkowe.

Rysunki

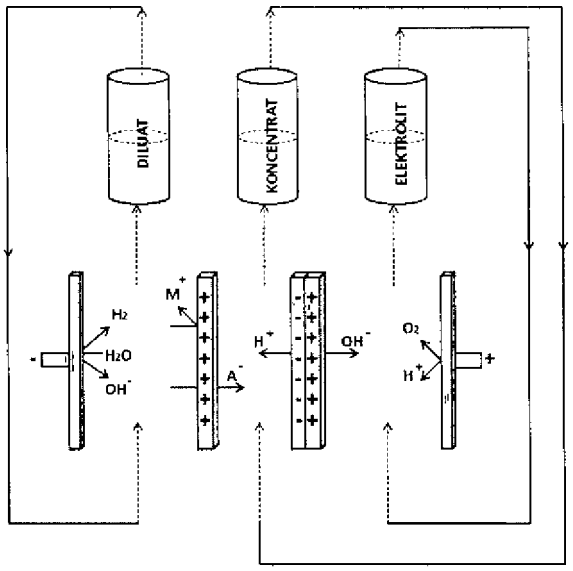


Fig. 1

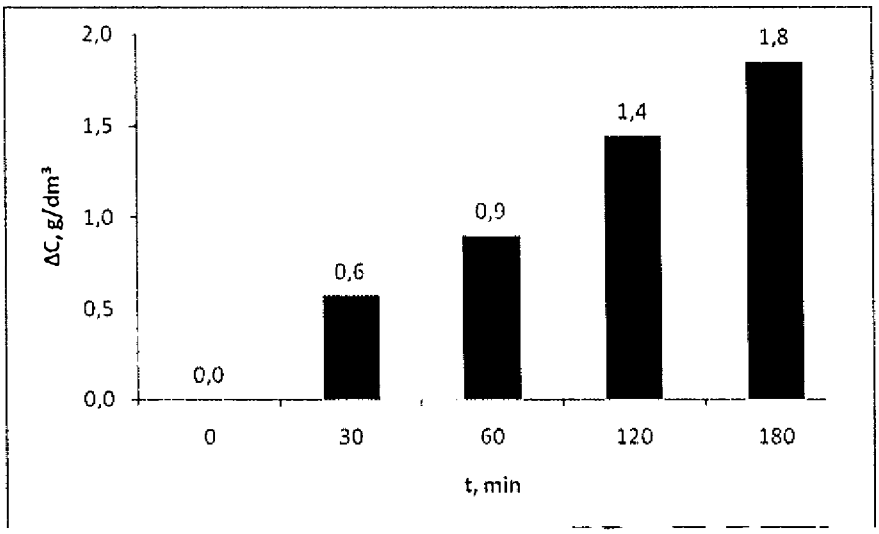


Fig. 2

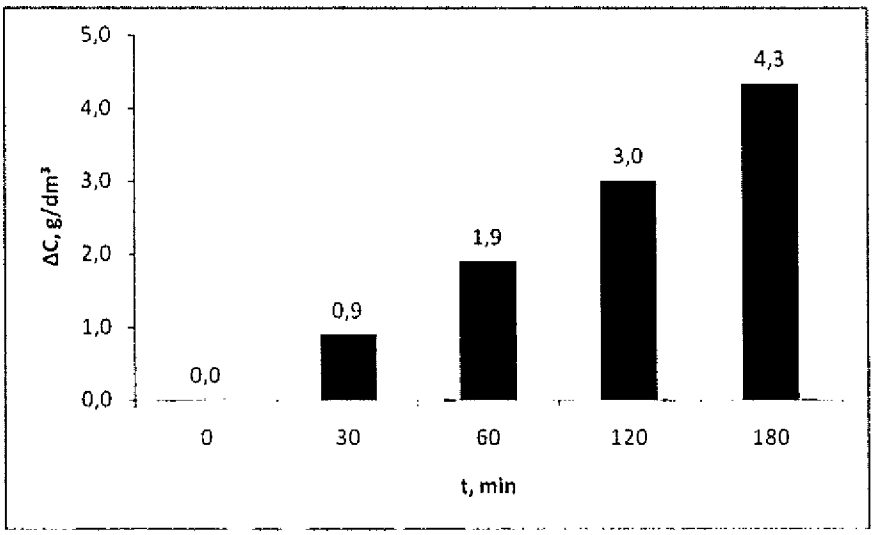

5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
ΔC, g/dm³
0,0
0,9
1,9
3,0
4,3
0
30
60
120
180
t, min

Fig. 3

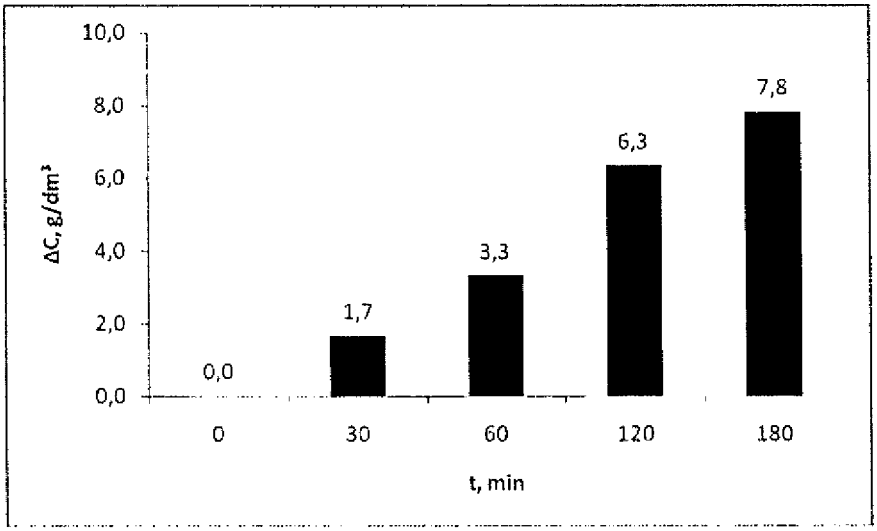

10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
ΔC, g/dm³
0,0
1,7
3,3
6,3
7,8
0
30
60
120
180
t, min

Fig. 4