

Ludwika TOMASZEWSKA-HETMAN, Justyna WOWCZUK, Krzysztof CYBULSKI, Magdalena RAKICKA, Anita RYWIŃSKA, Waldemar RYMOWICZ

e-mail: Ludwika.Tomaszewska@up.wroc.pl

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław

## Ciągła biosynteza kwasu cytrynowego z glukozy przez mutanta octanowego *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31

### Wstęp

W 1893 roku *Wehmer* opisał produkcję kwasu cytrynowego jako efekt metabolizmu *Penicillium glaucum*. Dwaście lat później, w 1913 roku, w Stanach Zjednoczonych powstał pierwszy patent dotyczący produkcji kwasu cytrynowego z cukrów przy udziale *Aspergillus niger* [*Soccol i in., 2006*]. Obecnie kwas cytrynowy jest najważniejszym kwasem organicznym produkowanym w procesach mikrobiologicznych, a jego produkcja stale wzrasta ze względu na nieustannie rosnące zapotrzebowanie, szczególnie ze strony przemysłu spożywczego. Z ostatnich szacunków wynika, iż światowa produkcja kwasu cytrynowego przekroczyła 1,7 mln ton rocznie, z czego 99% wyprodukowano w procesach fermentacyjnych [*Sauer i in., 2008; Dhillon i in., 2011*].

W procesach komercyjnych tradycyjnie stosowanym producentem kwasu cytrynowego jest *A. niger*, jednak w ostatnich kilku dekadach zainteresowanie badaczy skupiało się także na możliwości wykorzystania do tego procesu drożdży [*Yalcin i in., 2010*]. Przeprowadzone badania wskazały, iż alternatywą dla tradycyjnie wykorzystywanych szczepów *A. niger* mogą być drożdże z gatunku *Y. lipolytica* [*Dhillon i in., 2011; Wojtatowicz i in., 1991*]. W porównaniu do stosowanych grzybów strzępkowych, drożdże te zdolne są do wykorzystania szerszej gamy surowców - zwłaszcza niekonwencjonalnych - zapewniają uzyskanie wyższych parametrów produkcyjnych, wykazują wyższą tolerancję wobec stężenia cukru i niższą wrażliwość na obecność metali ciężkich w podłożu. Niewątpliwą zaletą biosyntezy kwasu cytrynowego z udziałem *Y. lipolytica* jest zminimalizowana produkcja odpadów i ścieków, co sprawia, iż izolacja pożądanego produktu jest dużo łatwiejsza [*Fickers i in., 2005; Kruse i in., 2004*]. Ponadto, drożdże te tworzą jednokomórkowe, dobrze zdyspergowane populacje, co daje dodatkową możliwość zastosowania procesów ciągłych - zarówno otwartych jak i zamkniętych [*Żarowska i in., 2004*].

Celem niniejszej pracy była ocena parametrów produkcyjnych procesu ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31, w zależności od stężenia źródła azotu.

### Materiały i metody

#### Mikroorganizm

Przedmiotem badań był szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31 będący mutantem octanowym (oct<sup>-</sup>). Szczep pochodził z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i przechowywany był na skosie YM, w temperaturze 4°C.

#### Substrat

W przeprowadzonych badaniach jako źródło węgla i energii stosowano czystą glukozę (POCh, Gliwice).

#### Podłoża

**Podłoże inokulacyjne** przygotowano z wykorzystaniem następujących składników [g/L]: glukoza - 20,0; bactopeton - 5,0; ekstrakt drożdżowy - 3,0; ekstrakt słodowy - 3,0; woda destylowana - do 1L.

**Podłoże wzrostowe (PW)** zawierało [g/L]: glukoza - 100,0; NH<sub>4</sub>Cl - 3,0; ekstrakt drożdżowy - 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O - 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,25; woda wodociągowa - do 1L.

**Podłoże produkcyjne (PP)** miało następujący skład [g/L]: glukoza - 200,0; NH<sub>4</sub>Cl - 2,0/4,0/6,0; ekstrakt drożdżowy - 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O - 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,25; woda wodociągowa - do 1L.

Przygotowane podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

#### Warunki prowadzenia hodowli

**Hodowle inokulacyjne** prowadzono w kolbach *Erlenmayera* o pojemności 300 mL zawierających 50 mL podłoża inokulacyjnego, zaszczepionego materiałem komórkowym pochodzącym ze skosów YM z glukozą. Hodowle prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu *CERTOMAT IS* (*Sartorius Stedim Biotech GmbH*, Niemcy) przy 140 obr/min, przez 72 h w temperaturze 29,5°C.

**Hodowle produkcyjne** prowadzono w 5-L bioreaktorze (*Biostat B Plus*, Niemcy), zawierającym 1,5 L podłoża wzrostowego (PW), zaszczepionego 150 mL zawiesiny komórek, namnożonych w hodowlach inokulacyjnych. Podczas procesu szybkość napowietrzania wynosiła 0,3 vvm, prędkość obrotowa mieszadła 900 obr/min, a temperatura 29°C. W czasie trwania całego procesu *pH* utrzymywano na poziomie 5,5, automatycznie za pomocą dodatku 30% NaOH. Po 24 h hodowli periodycznej w podłożu wzrostowym (PW) rozpoczynano proces ciągły: za pomocą wykalibrowanych pomp do bioreaktora wprowadzano świeże podłoże produkcyjne (PP) oraz z tą samą szybkością (17 mL/h) odbierano płyn hodowlany, utrzymując szybkość rozcieńczania *D* = 0,01/h. Próby do oznaczeń (10mL) pobierano z częstotliwością zaznaczoną na rys. 1.

#### Metody analityczne

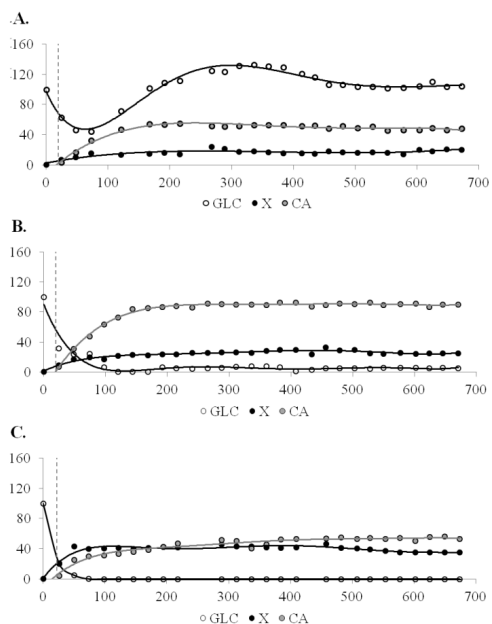
Próby płynu hodowlanego odwirowano (*Centrifuge MPW-56*, Polska). W uzyskanym supernatancie stężenie glukozy i kwasu cytrynowego oznaczano techniką HPLC na kolumnie *HyperRez XP carbohydrate H<sup>+</sup>* (*Dionex, UltiMate 3000 Series*, Japonia) połączonej z detektorem UV ( $\lambda = 210$  nm), w temperaturze 65°C, przy prędkości przepływu fazy ciekłej (25 mM kwasu trifluorooctowego; TFA) przez kolumnę równej 0,6 mL/min. Odwirowaną biomasę poddawano separacji na filtrze membranowym  $\phi$  0,45  $\mu$ m (*Milipore*, USA) i oznaczano wagowo - po wysuszeniu do stałej masy w wagosuszarni (*RAD WAG MAC 110/NH*, Polska), w temperaturze 105°C. Zawartość białka w biomasie drożdży oznaczano metodą *Kjeldahla*.

### Wyniki i dyskusja

Zbadano wpływ stężenia źródła azotu na proces ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez mutanta oct<sup>-</sup> *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31. Przeprowadzono trzy 700-godzinne hodowle w podłożach zawierających 2, 4 oraz 6 g/L NH<sub>4</sub>Cl, których przebieg przedstawiono na rys. 1.

Procesy biosyntezy rozpoczynano jak hodowle okresowe, następnie w 24 h uruchamiano pompę dozującą świeże podłoże produkcyjne (PP) do bioreaktora oraz pompę odbierającą płyn hodowlany z bioreaktora. Po około 200 h trwania procesów obserwowano ustabilizowanie się poziomu biomasy oraz kwasu cytrynowego w podłożach hodowlanych. Stężenie substratu kształtowało się na poziomie około 110 g/L w hodowli z 2 g/L NH<sub>4</sub>Cl oraz około 5 g/L z 4 g/L NH<sub>4</sub>Cl, natomiast w procesie z najwyższą dawką azotu glukoza była całkowicie wykorzystywana przez drożdże (Rys. 1).

W hodowlach, w których stosowano dawki 2 i 4 g/L NH<sub>4</sub>Cl stężenie biomasy osiągnęło wielkość odpowiednio około 18 oraz 26 g/L i utrzymywało się na tym poziomie do końca trwania procesów. Zwiększenie ilości azotu w podłożu hodowlanym do 6 g/L NH<sub>4</sub>Cl skutkowało uzyskaniem znacznie wyższego stężenia biomasy, które osiągnęło maksymalny poziom około 42 g/L i utrzymywało się do 500 h hodowli, po czym obserwowano jego obniżanie się do około 35 g/L. Niemniej, w tym procesie poziom białka w biomasie drożdży utrzymywał się w stanie ustalonym na stałym poziomie 26% (Tab. 1).



Rys. 1 Przebieg procesu ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez mutant octanowego *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31 w pożywkach o zróżnicowanym stężeniu źródła azotu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ): A. 2 g/L, B. 4 g/L, C. 6 g/L

Zbliżoną zawartością białka (25%) charakteryzowała się biomasa uzyskana z procesu z najniższą dawką azotu, natomiast w przypadku zastosowania podłoża z 4 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zawartość białka w biomacie drożdży utrzymywała się na nieco wyższym poziomie (29%).

Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, iż poziom azotu w podłożu hodowlanym wpływał na produkcję kwasu cytrynowego. Najwięcej cytrynianu drożdże produkowały przy 4 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , gdzie stężenie produktu w stanie ustalonym utrzymywało się na poziomie około 90 g/L (Rys. 1). W pozostałych wariantach stężenie cytrynianu było znacząco niższe i w obu przypadkach, w stanie ustalonym utrzymywało się na zbliżonym poziomie około 50 g/L.

Największą wadą użycia drożdży do produkcji kwasu cytrynowego jest równoczesna produkcja izocytrynianu, ponieważ ma on mniejszą zdolność buforującą i chelatującą w porównaniu do kwasu cytrynowego, a gdy zanieczyszczenie nim przekracza 5% utrudniony jest proces krystalizacji cytrynianu [Förster *in. in.*, 2007]. Warto zwrócić uwagę, iż w prezentowanej pracy przedmiotem badań był mutant octanowy (oct<sup>-</sup>) drożdży *Y. lipolytica*. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, mutanty te zdolne są do produkcji kwasu cytrynowego z czystością powyżej 95%, a ich dodatkową zaletą jest stabilność w długoterminowych procesach ciągłych [Wojtatowicz *in. in.*, 1991; Rywińska *in. in.*, 2004].

Pod względem ekonomicznym efektywność procesu biosyntezy ocenia się głównie na podstawie dwóch parametrów: produktywności oraz szybkości właściwej produkcji. Parametry te w procesie z 4 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , osiągnęły znacząco wyższe wartości niż w pozostałych wariantach i wyniosły odpowiednio 1,18 g/Lh oraz 0,045 g/gh (Tab. 1), co jest wynikiem zadowalającym i jednym z wyższych, w porównaniu do wcześniej opisanych w literaturze badań, w których także wykorzystywano glukozę jako substrat do procesu ciągłej produkcji kwasu cytrynowego [Anastassiadis *in. in.*, 2005; Rymowicz *in. in.*, 2005]. W prezentowanej pracy wydajność produkcji kwasu cytrynowego obniżała się wraz ze wzrostem stężenia azotu w podłożu i kształtowała się w przedziale 0,26÷0,51 g/g (Tab. 1).

## Wnioski

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono wpływ stężenia azotu na efektywność ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy. Najlepsze wyniki uzyskano w procesie z zastosowaniem podłoża z 4 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , w którym, w stanie ustalonym, drożdże produkowały 90 g/L kwasu cytrynowego z produktywnością 1,18 g/Lh i szybkością właściwą produkcji 0,045 g/gh.

Tab. 1 Charakterystyka ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez mutant octanowego *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31 w warunkach zróżnicowanego stężenia azotu

Dawka azotu [g $\text{NH}_4\text{Cl}$ /L]	X [g/L]	CA [g/L]	$Y_{\text{CA}}$ [g/g]	$Q_{\text{CA}}$ [g/Lh]	$q_{\text{CA}}$ [g/gh]	Białko [%]
2	17,7	50,3	0,51	0,58	0,033	25
4	26,4	90,0	0,46	1,18	0,045	29
6	39,9	51,2	0,26	0,53	0,013	26

## OZNACZENIA

CA – kwas cytrynowy [g/L],  
 GLC – glukoza [g/L],  
 $Q_{\text{CA}}$  – produktywność kwasu cytrynowego [g/Lh],  
 $q_{\text{CA}}$  – szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego [g/gh],  
 T – czas [h],  
 X – biomasa [g/L],  
 $Y_{\text{CA}}$  – wydajność produkcji kwasu cytrynowego [g wytworzonego CA/g zużytej GLC].

## LITERATURA

- Anastassiadis S., Wandrey C., Rehm H. J., 2005. Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 697-705. DOI: 10.1007/s11274-004-3850-4
- Dhillon G. S., Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D., 2011. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food Bioproc. Technol.*, **4**, 505-529. DOI: 10.1007/s11947-010-0399-0
- Fickers P., Benetti P.-H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M. S., Nicaud J.-M., 2005. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.*, **5**, 527-543. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.09.004
- Förster A., Jacobs K., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G., 2007. Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Genetics Molecular Biotechnol.*, **77**, 861-869. DOI: 10.1007/s00253-007-1205-4
- Kruse K., Förster A., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G., 2004. *Method for the biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast Yarrowia lipolytica*. World Patent Application WO2004/009828
- Rymowicz W., Żarowska B., Robak M., Rywińska A., Musiał I., 2005. Biosynteza kwasu cytrynowego z syropu glukozowego przez mutant octanowego *Yarrowia lipolytica* w warunkach zróżnicowanego pH. *Inż. Ap. Chem.*, **44**, 90-91
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Musiał I., 2004. Charakterystyka stanu fizjologicznego mutantów *Yarrowia lipolytica* podczas ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z syropu glukozowego w reaktorze membranowym. *Acta Sci. Polon., Biotechnol.*, **3**, 85-95
- Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.*, **26**, 100-108. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.11.006
- Soccol C. R., Vandenberghe L. P. S., Rodrigues C., Pandey A., 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 141-149
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Kautola H., 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydrol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **31**, 165-174. DOI: 10.1007/BF02921787
- Yalcin S. K., Bozdemir M. T., Ozbas Z. Y., 2010. *Citric acid production by yeasts: fermentation conditions, process optimization and strain improvement* [in:] Mendes-Vilas A. (Ed.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, FORMATEX, Hiszpania, 9, 1374-1382
- Żarowska B., Rymowicz W., Rywińska A., Musiał I., 2004. Charakterystyka procesu ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego przez mutanty octanowe *Yarrowia lipolytica* z syropu fruktozowego. *Acta Sci. Polon. Biotechnol.*, **3**, 97-108