

ANITA RYWIŃSKA  
WALDEMAR RYMOWICZ

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław

# Biosynteza kwasu cytrynowego z glicerolu przez *Yarrowia lipolytica* w hodowli stacjonarnej powtórzeniowej

## Wprowadzenie

Procesy biosyntezy kwasu cytrynowego (KC) z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* prowadzono w większości w hodowlach periodycznych. Wadą takich hodowli jest długi czas procesu, co wpływa na obniżenie szybkości produkcji KC i zwiększenie kosztu jednostkowego produktu. W porównaniu do tradycyjnych periodycznych systemów, procesy stacjonarne powtórzeniowe (RBC) są bardziej efektywne. Ten system hodowli z powodzeniem był wykorzystywany w wielu procesach biotechnologicznych, w tym do produkcji etanolu [1] i kwasu mlekowego [2]. Hodowle typu RBC stosowano także do produkcji kwasu cytrynowego przez *Y. lipolytica* w podłożach zawierających glukozę [3, 4] lub etanol [5]. Biosynteza KC przez drożdże jest procesem znanym od kilkudziesięciu lat, jednak produkcja tego kwasu z czystego glicerolu lub gliceryny odpadowej z produkcji biodiesla jest tematem nowym i mało rozpoznany. Większość badań z tego zakresu dotyczy procesów prowadzonych w systemach periodycznych lub periodycznych zasilanych [6–10]. Nasze ostatnie badania wykazały, że mutanty octanowe *Y. lipolytica* są uzdolnione do nadprodukcji dużych ilości KC w hodowlach periodycznych zasilanych (do 134 g dm<sup>-3</sup>) [8]. Zwiększenie ilości KC oraz obniżenie kosztów jego produkcji jest możliwe także poprzez zastosowanie systemów półciągłych typu RBC.

W niniejszej pracy zbadano wpływ ilości wymienianego podłoża hodowlanego na dynamikę produkcji i wydajność kwasu cytrynowego z czystego glicerolu przez *Y. lipolytica* *Wratislavia* AWG7 w hodowli półciągłej typu RBC.

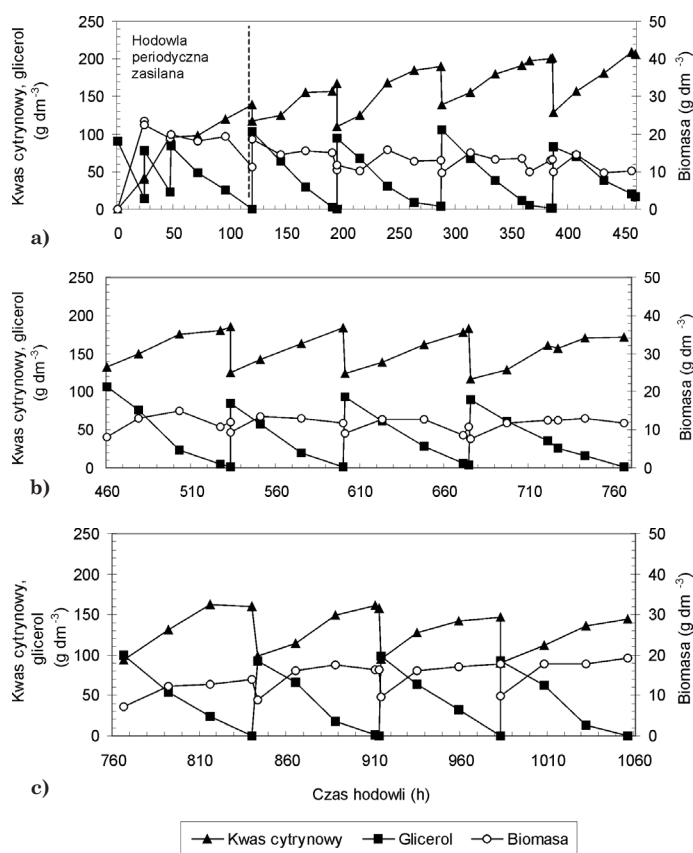
## Materiały i metody

W badaniach wykorzystano szczep drożdży *Y. lipolytica* *Wratislavia* AWG7. Jest to mutant octanowy o gładkiej morfologii kolonii pochodzący z kolekcji *Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego* we Wrocławiu. Jako źródło węgla wykorzystano glicerol techniczny (98%) z POCH, Gliwice. Podłoże stosowane w hodowli okresowej zasilanej miało następujący skład [g dm<sup>-3</sup>]: glicerol – 200 (dodawany w 3 porcjach: 90 g na początku procesu, 90 g po 24h i 80 g po 48h procesu), NH<sub>4</sub>Cl – 3,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1,0, YE – 1,0; w hodowli stacjonarnej powtórzeniowej: glicerol – 325, 260, 217, NH<sub>4</sub>Cl – 4,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1,0, YE – 1,0, woda wodociągowa 1 dm<sup>3</sup>. Po wyczerpaniu glicerolu z podłoża w hodowli okresowej zasilanej, odbierano z bioreaktora 30, 40 lub 50% podłoża i uzupełniano odpowiednią ilością podłoża do objętości 1,3 dm<sup>3</sup>. Wymiany poszczególnych objętości podłoża prowadzono

4-krotnie. Hodowle stacjonarne powtórzeniowe prowadzono w 3,5-litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III (New Brunswick, USA). Kwas cytrynowy, glicerol, erytrytol i mannitol oznaczano techniką HPLC, kwas izocytrynowy oznaczano metodą enzymatyczną, białko metodą biuretową, biomasę metodą wagową; metody opisano we wcześniejszych publikacjach [7, 8, 11].

## Omówienie wyników

Proces biosyntezy KC z glicerolu przez szczep *Wratislavia* AWG7 prowadzono w hodowli typu RBC, którą rozpoczęto z chwilą wyczerpania glicerolu z podłoża w hodowli okresowej zasilanej w 120 h procesu. Przeprowadzono 12 cykli hodowlanych, różniących się ilością wymienianego podłoża, w zakre-



Rys. 1. Przebieg procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu w hodowli stacjonarnej powtórzeniowej przez *Y. lipolytica* *Wratislavia* AWG7: Ilość wymienianego podłoża: a) 30%; b) 40%; c) 50%. Warunki hodowli: temp. 30°C, pH 5,5, szybkość mieszania 800 rpm, szybkość napowietrzania 0,2 vvm

**Tablica 1**

**Wpływ ilości wymienianego podłoża na produkcję kwasu cytrynowego, biomasy, produktów ubocznych, szybkość produkcji ( $Q_{KC}$ ) i wydajność kwasu cytrynowego ( $Y_{CA}$ ) przez *Y. lipolytica* *Wratislavia* AWG7 w hodowli periodycznej powtórzeniowej**

Wymiana podłoża [%]	Biomasa [g dm <sup>-3</sup> ]	Kwas cytrynowy [g dm <sup>-3</sup> ]	Erytrytol [g dm <sup>-3</sup> ]	Mannitol [g dm <sup>-3</sup> ]	Kwas izocytrynowy [g dm <sup>-3</sup> ]	$Q_{KC}$ [g dm <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Y_{CA}$ [g g <sup>-1</sup> ]
30	11,6	190	9,3	6,5	1,5	0,81	0,68
40	13,1	180	14,2	2,6	1,3	0,76	0,62
50	16,8	150	11,5	2,4	2,1	0,80	0,60

Wartości średnie z czterech powtórzeń każdej wymiany podłoża.

sie od 30 do 50%. Przebieg długoterminowej hodowli RBC (około 770 h) przedstawiono na rys. 1. Średnie stężenie KC i biomasy zależało od ilości wymienianego podłoża. Jak obrazuje tablica 1, obniżenie ilości odbieranego podłoża z 50 do 30% spowodowało wzrost stężenia kwasu w płynie pochodzonym z 150 do 190 g dm<sup>-3</sup> oraz wzrost wydajności kwasu cytrynowego ( $Y_{KC}$ ) z 0,6 do 0,68 g g<sup>-1</sup> i obniżenie stężenia biomasy z 16,8 do 11,6 g dm<sup>-3</sup>. Zawartość białka w biomase drożdży na końcu każdego cyklu hodowlanego była podobna i wynosiła od 32 do 35%. W badanym zakresie wymiany podłoża, objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego ( $Q_{KC}$ ) była podobna i wynosiła od 0,76 (40% wymiany zbiornika) do 0,81 g dm<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (30% wymiany zbiornika). W trakcie biosyntezy KC w podłożu z glicerolem, badany szczep *Wratislavia* AWG7 produkował produkty uboczne takie jak kwas izocytrynowy (1,3–2,1 g dm<sup>-3</sup>), erytrytol (9,3–14,2 g dm<sup>-3</sup>) i mannitol (2,4–6,5 g dm<sup>-3</sup>).

### Dyskusja

W ostatnich latach przedmiotem nielicznych studiów naukowych były procesy biosyntezy KC z glicerolu czystego i odpadowego przez drożdże *Y. lipolytica*. Stężenie końcowe kwasu w hodowli zależało od użytego szczepu drożdży oraz zastosowanego systemu hodowlanego. W hodowlach wstrząsarkowych stężenie KC kształtowało się w zakresie od 11 do 45 g dm<sup>-3</sup> [10, 11, 13]. W hodowlach okresowych w bioreaktorze drożdże *Y. lipolytica* produkowały z glicerolu od 75,7 do 124,5 g dm<sup>-3</sup> KC [7]. Bardziej efektywnym systemem hodowlanym były hodowle periodyczne zasilane, w których stężenie kwasu wynosiło od 86,8 do 139 g dm<sup>-3</sup> [8]. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że szczep *Wratislavia* AWG7 produkował w hodowli wstrząsanej oraz okresowej i okresowej zasilanej prowadzonych w bioreaktorze, odpowiednio: 10,6, 88,1 i 139 g dm<sup>-3</sup> [11, 7, 8]. Zastosowana w niniejszej pracy hodowla półciągła (RBC) pozwoliła na intensyfikację procesu i wzrost stężenia kwasu do 190 g dm<sup>-3</sup>, kiedy odbierano 30% objętości roboczej zbiornika i dodawano taką samą objętość świeżej pożywki zawierającej glicerynę i pierwiastki biogenne takie jak N i P. Taki sposób hodowli zapewniał utrzymanie dobrej żywotności drożdży, które zawierały od 32 do 35% białka. Drożdże *Y. lipolytica* użyte w procesie ciągłym w chemostacie i w reaktorze membranowym zawierały od 16,5 do 25,9%

białka [13]. Arzumanow i wsp. [5] w hodowli typu RBC na etanolu, w zoptymalizowanych warunkach hodowlanych uzyskali 105,4 g dm<sup>-3</sup> KC z wydajnością 0,88 g g<sup>-1</sup>. W procesie RBC na glukozie z komórkami unieruchomionymi w alginianie wapnia, stężenie KC było znacznie niższe i wynosiło 39 g dm<sup>-3</sup> [14]. Użyty w niniejszej pracy szczep *Wratislavia* AWG7, w warunkach limitacji azotowej, wytwarzał pewne ilości alkoholi cukrowych, pełniących rolę osmoregulatorów. Stężenie erytrytolu i mannitolu wynosiło odpowiednio; 14,2 i 6,5 g dm<sup>-3</sup>. Według McKay i wsp. [15], szczep *Y. lipolytica* IMK 2 produkował do 40 mM (około 7 g dm<sup>-3</sup>) mannitolu w procesie biosyntezy KC na glukozie. Szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia* K1 w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu produkował wyższe ilości erytrytolu, w zakresie od 40,2 do 46,9 g dm<sup>-3</sup> [8].

### LITERATURA

1. A. Sakurai, Y. Nishida, H. Saito, M. Sakakibara: J. Biosci. Bioeng. **90**, nr 5, 526 (2000).
2. M.C. Yu, R.C. Wang, C.Y. Wang, K.J. Duan, D.C. Sheu: J. Chin. Chem. Eng. **38**, nr 3-4, 223 (2007).
3. J.D. Enzlinger, J.A. Asenjo: Biotechnol. Lett. **8**, nr 1:7 (1986).
4. S. Anastasiadis, H.J. Rehm: Electron. J. Biotechnol. **9**, 26 (2006).
5. T.E. Arzumanov, N.V., Shishkanova T.V. Finogenova: Microbiol. Biotechnol. **53**, 525 (2000).
6. S. Papanikolaou, S. Fakas, M. Fick, I. Chevalot, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, I. Marc, G. Aggelis: Biomass Bioeng. **32**, 60 (2008).
7. W. Rymowicz, A. Rywińska, B. Żarowska, P. Juszczyk: Chem. Pap. **60**, nr 5, 391 (2006).
8. A. Rywińska, W. Rymowicz, B. Żarowska, M. Wojtatowicz: Food Technol. Biotechnol. **47**, nr 1, 1 (2009).
9. W.E. Levinson, C.P. Kurtzman, T.M. Kuo: Enzyme Microb. Technol. **41** 292 (2007).
10. S.B. Imandi, V.V.R. Bandaru, S.R. Somalanka, H.R. Garapati: Enzyme Microb. Technol. **40**, 1367 (2007).
11. W. Rymowicz, P. Juszczyk, A. Rywińska, B. Żarowska, I. Musiał: Biotechnologia, **2**, nr 2, 46 (2005).
12. S. Papanikolaou, L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis, I. Marc: J. Appl. Microbiol. **92**, 737 (2002).
13. W. Rymowicz: Zesz. Nauk. AR Wroc. Technol. Żywn., **329**, (1998).
14. W. Rymowicz, H. Kawola, M. Wojtatowicz, Y.Y. Lnko, P.Linko: Appl. Microb. Biotechnol. **39**, 1 (1993).
15. I.A. McKay, I.S. Maddox, J.D. Brooks: Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**, nr 1, 73 (1994).

**Pracę wykonano w ramach grantu MNiSW nr 2P06T 044 30.**