

ANITA RYWIŃSKA
MARIA WOJTATOWICZ
WALDEMAR RYMOWICZ

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław

Ciągła biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* w warunkach limitacji wzrostu siarką

Wstęp

Dotychczasowe badania zmierzające do doskonalenia procesu produkcji kwasu cytrynowego (KC) z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* obejmowały takie kierunki jak: poszukiwanie nowych odnawialnych źródeł węgla, optymalizacja składu podłoża produkcyjnego i warunków hodowlanych oraz wykorzystanie mutantów *Y. lipolytica* o podwyższonej aktywności kwasotwórczej [1–3]. W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem badaczy było zastosowanie procesów ciągłych do biosyntezy tego kwasu [4, 5]. Drożdże jako jednokomórkowe populacje mogą być z powodzeniem wykorzystywane w procesach ciągłych prowadzonych w systemach otwartych (chemostat) lub zamkniętych (reaktory membranowe lub z unieruchomionymi komórkami) [2, 6]. Tego typu hodowle pozwalają na znaczne obniżenie kosztów technologicznych przy jednoczesnym zwiększeniu potencjału metabolicznego komórek. Jednak oprócz wielu zalet procesy ciągłe mają również wady, do których należy zaliczyć problemy z utrzymaniem czystości mikrobiologicznej, szybkości biosyntezy KC oraz stabilności genetycznej i fenotypowej użytego szczepu produkcyjnego.

Celem pracy była ocena efektywności i stabilności ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31* w chemostacie, w warunkach limitacji wzrostu drożdży siarką.

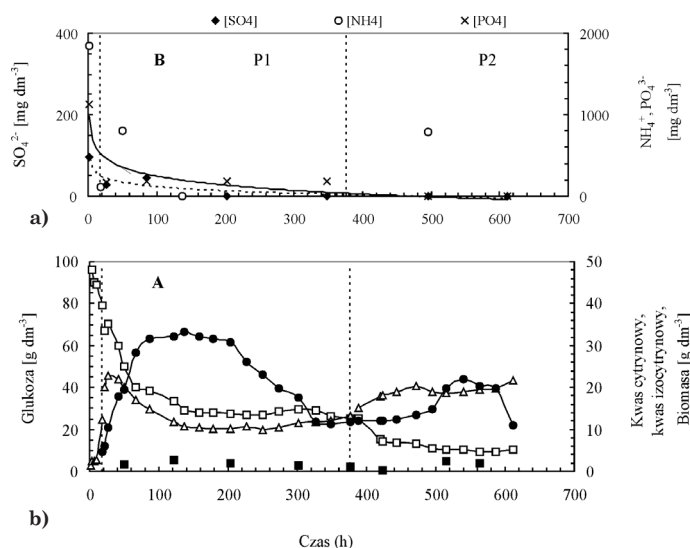
Materiał i metody badań

W badaniach wykorzystano szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31*, który pochodził z kolekcji *Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego* we Wrocławiu. W eksperymentach wykorzystywano podłoża inokulacyjne i pełne (wzrostowe) według *Rywińskiej* i wsp. [7]. W procesie ciągłym stosowano podłoża produkcyjne (P1 i P2) o składzie: glukoza 100–130 g, YE 1 g, NH_4Cl 8,6 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg, 200 μg tiaminy w 1 dm^3 wody destylowanej. W podłożu P1 i P2 stężenie $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wynosiło odpowiednio 0,1 i 0,15 g dm^{-3} . Hodowle inokulacyjne i w podłożu wzrostowym prowadzono zgodnie z metodyką według *Rywińskiej* i wsp. [7]. Hodowle ciągłe prowadzono w 3,5-litrowym bioreaktorze typu *Bioflo III* (New Brunswick, USA), przy objętości roboczej 1 dm^3 w temperaturze 30°C, przy szybkości mieszania 500 rpm, szybkości napowietrzania 0,2 vvm i pH 5,5. Liczbę komórek pączkujących, martwych, objętość komórek, morfologię kolonii oraz stabilność mutacji oceniało analogicznie jak w pracy *Rywińskiej* i wsp. [6]. Stężenie kwasu cytrynowego (KC) i glukozy oznaczano metodą HPLC [3], biomasę metodą wagową. Stężenie C, H, N, S

i P w biomase drożdży oraz stężenie jonów SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i NH_4^+ w podłożu oznaczano według procedury opisanej w pracy *Rywińskiej* i wsp. [7].

Omówienie wyników i dyskusja

Proces ciągłej biosyntezy KC z glukozy przez szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31*, prowadzono w warunkach deficytu



Rys. 1. Poziom biomasy (●), kwasu izocytrynowego (■), glukozy (Δ), kwasu cytrynowego (●), (a) oraz stężenie jonów siarczanowego SO_4^{2-} , fosforanowego PO_4^{3-} i amonowego NH_4^+ w podłożu – (b) podczas hodowli ciągłej szczepu *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31* w warunkach deficytu siarki. Szybkość rozcieńczania $D = 0,02 \text{ h}^{-1}$

Tablica 1
Skład pierwiastkowy biomasy drożdży *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31* podczas ciągłej biosyntezy KC w warunkach chemostatu limitowanego siarką

Czas [h]	Podłoże	Stężenie (% ss)				
		C	H	N	P	S
42	P1	43,60	7,27	5,66	1,52	0,04
86		44,63	7,47	5,45	2,19	0,03
203*		45,51	7,33	5,36	1,89	0,06
348		45,25	6,92	5,58	2,05	0,05
420		44,70	7,01	5,72	1,80	0,05
515*	P2	44,34	6,70	5,28	1,53	0,05
563*		44,83	7,05	5,35	1,45	0,05
Pełne podłoże wzrostowe (C : N : P : S \approx 10 : 1 : 0,2 : 0,1)		47,14	6,90	7,28	2,08	0,25

* stan ustalony

Tablica 2
Stan fizjologiczny populacji drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 w warunkach chemostatu limitowanego siarką

Czas [h]	Podłoże	Parametr					
		Komórki pączkujące, [%]	Komórki martwe, [%]	Komórki tworzące gładkie kolonie, [%]	Objętość komórek		Częstość rewersji [jtk mL ⁻¹]
					Min – max, [μm ³]	Średnia, [μm ³]	
40	P1	8,5	1,7	0	–	–	–
80		6,5	1,9	0	–	–	–
110		7,1	1,6	0	4,65–55,05	21,03	–
178		6,8	1,5	0	3,32–40,65	18,03	–
226		8,8	1,6	0	3,39–47,14	19,08	–
274		7,5	1,8	0	3,11–47,14	22,01	–
348		8,0	1,9	2,2	4,73–222,97	29,77	< 4,35 · 10 ⁻⁸
444		P2	9,0	1,4	2,2	2,94–81,26	23,41
510	10,0		1,3	3,6	–	–	–
563	12,5		1,2	2,0	9,4–72,52	33,62	–
610	10,0		1,5	1,8	–	–	<2,38 · 10 ⁻⁸

siarki na poziomie 0,1 (podłoże P1) i 0,15 g dm⁻³ MgSO₄ · 7H₂O (podłoże P2). Jak obrazuje rys. 1a, stan ustalony utrzymał się przez niespełna dwie wymiany zbiornika, pomiędzy 110 a 200 h hodowli. W tych warunkach badany szczep produkował 32 g dm⁻³ KC z wydajnością 0,46 g g⁻¹. W płynie pohodowlanym stężenie biomasy i niewykorzystanej glukozy wynosiły odpowiednio, 10,5 i 27 g dm⁻³. W kolejnych godzinach hodowli ciągłej stężenie KC obniżało się do 18 g dm⁻³ w 320 h procesu. Zwiększenie stężenia źródła siarki w podłożu zasilającym chemostat (podłoże P2) w 370 h procesu, spowodowało nieznaczny wzrost ilości KC do 21 g dm⁻³. Jak obrazuje rys. 1b, od 200 h procesu, wzrost drożdży przebiegał przy całkowitym wyczerpaniu jonów SO₄²⁻ z podłoża, co zbiegało się z obniżaniem produkcji KC. W hodowli zasilanej podłożem P2, zaobserwowano także wyczerpanie jonów PO₄³⁻, co było skorelowane z prawie dwukrotnym przyrostem biomasy drożdży w tych warunkach. W składzie pierwiastkowym biomasy pochodzącej z tej hodowli, widoczny był nie tylko niski poziom siarki (0,05%), ale również nieco obniżony poziom azotu (5,3–5,7%) i fosforu (1,4–1,8%), co oznaczało głębszą reorganizację składników biomasy i mogło być przyczyną niestabilności tego procesu (Tabl. 1). Ilość komórek pączkujących zależała od stężenia siarki w podłożu zasilającym chemostat i wynosiła od 7 do 12%, odpowiednio dla podłoża P1 i P2. Zastosowany system hodowlany zapewniał także dobrą żywotność komórek. Ilość komórek martwych nie przekraczała 2% (Tabl. 2). Według innych autorów, w hodowlach trwających powyżej 500 h, żywotność drożdży obniżała się nawet o 25% [8–10]. W posiewach na agarze YIM, nietypowe gładkie kolonie użytego w niniejszej pracy szczepu *Wratislavia 1.31* pojawiały się sporadycznie, a ich ilość nie przekraczała 4% (Tabl. 2). Średnia objętość komórek wynosiła od 18 do 33,62 μm³, przy czym populacja drożdży stawała się bardzo niejednorodna pod względem wielkości w momencie, gdy komórki traciły wysoką aktywność kwasotwórczą, a przeciętna objętość komórek matecznych rosła (Tabl. 2). Podobne zmiany wielkości komórek tego samego szczepu zaobserwowano w procesie półciągłej biosyntezy KC w hodowli typu *repeated-batch* [7]. Ocena stanu fizjologicznego mutantów octanowych *Y. lipolytica*, wykorzystywanych w procesie ciągłej bio-

syntezy KC w reaktorze membranowym, potwierdza tezę, że komórki o najmniejszej objętości decydują o dobrej efektywności i stabilności procesu biosyntezy tego kwasu [6]. Według *Bubbico* i wsp. [8] zmiana wielkości i kształtu komórek *Y. lipolytica*, z początkowo owalnych do znacznie wydłużonych miała niekorzystny wpływ na przebieg ciągłej biosyntezy KC. W innych badaniach *Klasson* i wsp. [2] pokazują, że dzięki szczep drożdży *S. lipolytica* NRRL Y 7576, odznaczał się dobrą stabilnością w ponad 1000 h procesie ciągłym w chemostacie, co wskazuje, że na zmiany degeneracyjne bardziej narażone są mutanty i szczepy genetycznie zmodyfikowane. Szczep *Wratislavia 1.31*,

dobrze zachowywał wyjściową mutację oct⁻ w długoterminowym procesie ciągłym. Nie obserwowano przyrostu oct⁺ rewertantów; częstość rewersji pozostawała na stałym i ekstremalnie niskim poziomie, 10⁻⁸ osobników (Tabl. 2). Wynik ten wskazuje, że rewersja mutacji oct⁻ była rzadsza niż częstość mutacji spontanicznych (10⁻⁵–10⁻⁷) w populacjach drobnoustrojów [11]. Technologicznym potwierdzeniem stabilności mutacji oct⁻ w badanym szczepie była stała i niska uboczna produkcja kwasu izocytrynowego (około 2 g dm⁻³), warunkowana przez tę mutację.

Reasumując, należy stwierdzić, że w procesie ciągłej biosyntezy KC z glukozy przez szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31*, prowadzonym w warunkach chemostatu i limitacji wzrostu drożdży siarką, stężenie KC na poziomie 32 g dm⁻³ utrzymywało się tylko do 200 h hodowli, po czym następowało szybkie obniżanie aktywności kwasotwórczej drożdży. Podczas długoterminowego procesu, wykazano dobry stan fizjologiczny populacji (wysoki udział komórek pączkujących i niski komórek martwych). Załamanie biosyntezy KC wiązało się z całkowitym wyczerpaniem egzogenego jonu SO₄²⁻. W takich warunkach drożdże słabiej wykorzystywały dostępne źródło azotu i fosforu, co mogło być bezpośrednią przyczyną niestabilności tego procesu.

LITERATURA

1. A. Crolla, K. J. Kennedy: *J. Biotechnol.* **110**, 73 (2004).
2. T.K. Klasson, E.C. Clausen, J.L. Gaddy: *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**, 491 (1989).
3. W. Rymowicz, A. Rywińska, B. Żarowska, P. Juszczyk: *Chem. Pap.* **60**, 5, 391 (2006).
4. S. Anastasiadis, H. J. Rehm: *Electron. J. Biotechnol.* **9** (1), 26 (2006).
5. T.E. Arzumanov, N.V., Shishkanova, T.V. Finogenova: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, (5) 525 (2000).
6. A. Rywińska, W. Rymowicz, B. Żarowska, I. Musiał: *Acta Scient. Polon. Biotechnologia* **3**, (1-2), 85 (2004).
7. A. Rywińska, M. Wojtatowicz, B. Żarowska, W. Rymowicz: *EJPAU* **11**,(1) (2008)
8. R. Bubbico, S. Presti, M. Bravi, M. Moresi, M. Spinosi: *Agro Food-Ind. Hi-Tech*, **3**, 35 (1996).
9. E. Parente, A. Ricciardi, M. Mancino, M. Moresi: *Ann. Microbiol. Enzimol.* **45**, 97 (1995).
10. K.D. Rane, K. Sims: *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 646 (1993).
11. W. BednarSKI: *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.* **3**, 13 (1990).