

Krzysztof CYBULSKI, Waldemar RYMOWICZ, Ludwika TOMASZEWSKA-HETMAN, Anita RYWIŃSKA

e-mail: krzysztof.cybulski@up.wroc.p

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

Dobór warunków hodowlanych do biosyntezy kwasu α -ketoglutarowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Wstęp

Kwas α -ketoglutarowy (KGA) ma szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Używany jest m.in. w produkcji dodatków do żywności, suplementów diety, farmaceutyków, biodegradowalnych polimerów i preparatów stosowanych w rolnictwie. Ponadto kwas ten wykorzystuje się jako substrat w biochemicznej diagnostyce wielu chorób (zapalenia wątroby, zawału mięśnia sercowego, dystrofii mięśniowej i in.) [Finogenova i in. 2005; Campbell i in. 2006; Ver-seck i in. 2007; 2009; Barrett i Yousaf 2008; Otto i in. 2011; Kamzolova i Morgunov 2013].

Obecnie KGA produkowany jest na drodze syntezy chemicznej z wykorzystaniem bursztynianu dietylu lub estrów szczawianu jako substratu. Sam proces produkcji KGA jest wieloetapowy i opiera się na wykorzystaniu toksycznych i wybuchowych reagentów, takich jak toluen, chloroform, absolutny etanol, eter dietylowy, czy metaliczny sód. Niewątpliwie na niekorzyść tego procesu wpływa również niska wydajność (75%) spowodowana tworzeniem licznych ko-produktów, których usunięcie z mieszaniny reakcyjnej znacząco podnosi koszty syntezy [Cooper i in. 1983; Stottmeister i in. 2005; Otto i in. 2011]. Alternatywą dla chemicznej produkcji KGA jest jego synteza mikrobiologiczna, szczególnie opłacalna w aspekcie wykorzystania odpadowych źródeł węgla i energii. Do biosyntezy KGA zdolnych jest wiele gatunków bakterii i drożdży, w tym: *Arthrobacter paraffineus*, *Bacillus megatherium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Candida paludigena*, *Pichia inositolivora*, *Torulopsis glabrata* oraz *Yarrowia lipolytica* [Otto i in. 2011]. Warto nadmienić, iż w większości przytoczonych przykładów źródłem węgla i energii były czyste i dość kosztowne związki (etanol, glukoza, olej rzepakowy).

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy był dobór źródła azotu, stężenia tiaminy i pH podłoża produkcyjnego do wydajnej biosyntezy kwasu α -ketoglutarowego z glicerolu przez szczep drożdży *Y. lipolytica* A-8.

Materiały i metody

Mikroorganizm

W badaniach wykorzystano szczep *Y. lipolytica* A-8 pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności. Materiał biologiczny przechowywano na skosach agarowych YM w temperaturze 4 °C.

Substrat

W hodowlach wstrząsanych jako źródło węgla wykorzystywano glicerol bezwodny 99% mas. (Chempur). W hodowlach bioreaktorowych źródło węgla stanowił glicerol odpadowy z produkcji biodiesla (Lotos, Polska) o zawartości glicerolu 76% mas. i NaCl 4% mas. oraz glicerol odpadowy (Wratislavia Bio) o zawartości glicerolu 83% mas. i NaCl 7,3% mas..

Podłoża i warunki hodowli

Jako podłoża inokulacyjne stosowano podłoża YNB (*Yeast Nitrogen Base*) w stężeniu 0,067 g/L suplementowane glicerolem bezwodnym w stężeniu 50 g/L. Podłoża do hodowli wstrząsanych miało następujący skład [g/L]: 50 – glicerol bezwodny, 1,06 – azot (zamiennie 5 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,26 – mocznik, 7,05 – bakteopepton, 7,9 – trypton), 1 – KH_2PO_4 , 0,7 – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 – NaCl, 0,25 μg –

tiamina. Odczyn podłoża hodowlanego buforowano przez dodatek 5 g/L CaCO_3 . Skład produkcyjnego podłoża bioreaktorowego obejmował [g/L]: 120,5 lub 131,5 – glicerol odpadowy, 10 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lub 4,52 – mocznik, 2 – KH_2PO_4 , 1,4 – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 – NaCl, 0,4 – 4 μg – tiamina.

Hodowle inokulum prowadzono w kolbach stożkowych w objętości 100 mL na wstrząsarce rotacyjnej przez 72 godziny przy 140 rpm i 30 °C.

Hodowle wstrząsane szczepiono 3 mL hodowli inokulacyjnej i prowadzono w kolbach stożkowych w objętości 30 mL w 30 °C przy 140 rpm przez 5 dób.

Hodowle bioreaktorowe prowadzono w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym *Biostat B+* (*Sartorius*, Niemcy) o objętości całkowitej 5 L. Objętość medium hodowlanego, po dodaniu 200 mL hodowli inokulacyjnej, wynosiła 2 L. Hodowle prowadzono w stałych warunkach: temperatura 30 °C, szybkość obrotów mieszadła 800 rpm, napowietrzanie 0,6 vvm. Wartość odczynu była utrzymywana automatycznie na zadanym poziomie poprzez dodatek 40% zasady sodowej.

Metody analityczne

Stężenie biomasy drożdży oznaczano metodą wagową. Próbkę o objętości 10 mL odwirowywano i dwukrotnie przemywano wodą destylowaną a następnie przesączano przez filtr z octanu celulozy o średnicy porów 0,45 μm . Uzyskaną biomasę dosuszano do stałej masy w wagosuszarce typu *Radwag* w temperaturze 105 °C. Supernatant hodowlany był odwirowywany (10 minut, 4 °C, 10000 rpm) i służył do oznaczania stężenia substratu, KGA oraz produktów ubocznych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizę prowadzono z użyciem urządzenia *Dionex – Ultimate 3000* (*Thermo Scientific*, USA) i kolumny *HyperRez XP Carbohydrate H+* (*Thermo Scientific*, USA) podłączonych do detektorów UV i RI (*Shodex*, Japan). Fazę nośną stanowił 20 mM kwas trifluoroctowy przy przepływie 0,6 mL/min w temperaturze 65 °C.

Wyniki i dyskusja

W zaprezentowanych w niniejszej pracy badaniach nad wpływem pH podłoża produkcyjnego, źródła azotu oraz stężenia tiaminy na biosyntezę KGA zastosowano glicerol odpadowy o potwierdzonej wcześniej przydatności do produkcji keto kwasów [Cybulski i in., 2012].

Dobór pH podłoża produkcyjnego

W pierwszym etapie badań zbadano wpływ pH podłoża produkcyjnego na biosyntezę KGA w zakresie od 3,0 do 5,5 co pół jednostki przy stężeniu tiaminy w podłożu równym 0,4 $\mu\text{g/L}$. Wyniki sześciu hodowli bioreaktorowych różniących się odczynem podłoża zostały zebrane w tab. 1.

pH podłoża hodowlanego utrzymywane w trakcie hodowli drożdży wpływało nie tylko na ich wzrost, ale także na metabolizm komórkowy. Czas procesu biosyntezy KGA był podobny dla wszystkich wariantów i wynosił 70,5÷73 godziny. Stężenie biomasy drożdży *Y. lipolytica* A-8 mieściło się w zakresie 18÷26,4 g/L. Bezpośrednia korelacja między pH a gęstością komórek występowała w zakresie pH 3,5÷5,5, kiedy ilość komórek drożdży rosła wraz ze wzrostem odczynu podłoża. Odczyn podłoża hodowlanego miał duży wpływ także na proces biosyntezy KGA. W zakresie pH 3,5÷5,5 ilość wyprodukowanego przez drożdże KGA malała wraz ze zmniejszaniem

się kwasowości pożywki. Najwyższe stężenie KGA, 27,9 g/L, otrzymano przy pH 3,5. Przełożyło się to również na najwyższą wydajność równą 0,27 g/g i objętościową szybkość produkcji wynoszącą 0,4 g/L/h.

Tab.1. Wpływ pH na biosyntezę kwasu α -ketoglutarrowego przez drożdże *Y. lipolytica* A-8

pH	Czas [h]	X	KGA [g/L]	PA [g/L]	Y_{KGA}	Q_{KGA}	q_{KGA}
3,0	71	19,0	24,7	10,5	0,26	0,35	0,02
3,5	70,5	18,0	27,9	18,6	0,27	0,40	0,02
4,0	72	18,5	24,9	19,7	0,24	0,35	0,02
4,5	73	20,4	26,9	19,1	0,27	0,37	0,02
5,0	72,5	25,0	17,5	18,3	0,17	0,24	0,01
5,5	71	26,4	12,8	10,3	0,12	0,18	0,01

KGA – kwas α -ketoglutarrowy,
 PA – kwas pirogironowy,
 X – stężenie biomasy, [g/L]
 Y_{KGA} – wydajność produkcji kwasu α -ketoglutarrowego, [g wytworzonego kwasu/g zużytego substratu]
 Q_{KGA} – obj. szybkość produkcji kwasu α -ketoglutarrowego, [g/(Lh)]
 q_{KGA} – szybkość właściwa produkcji kwasu α -ketoglutarrowego, [g/(gh)]

Jak podają dane literaturowe, pH utrzymywane podczas procesu biosyntezy KGA, niezależnie od używanego źródła węgla, było czynnikiem istotnie wpływającym na wydajność produkcji. *Chernyavskaya i in.* [2000] w badaniach nad produkcją KGA z etanolu przez *Y. lipolytica* N1 udowodniła, że kwasowe pH 4,5 w połączeniu z limitującym stężeniem tiaminy w podłożu (3 $\mu\text{g/L}$) jest kluczowe dla nadprodukcji tego kwasu. W podanych warunkach szczep N1 zsyntetyzował 40,1 g/L KGA. Z kolei *Kamzolova i in.* [2012] porównali wpływ odczynu podłoża hodowlanego na wzrost drożdży *Y. lipolytica* VKM Y-2412 oraz na produkcję KGA. Wyniki tego eksperymentu, podobnie jak wyniki uzyskane w niniejszej pracy, potwierdziły, że optimum pH wzrostu komórek drożdży nie pokrywa się z optimum pH biosyntezy KGA. Intensywna produkcja KGA w przypadku szczepu VKM Y-2412 zachodziła w pH 3,5÷4,5, natomiast drożdże rosły najwydajniej w zakresie pH 4,0÷6,5. Również *Stottmeister i in.* [1982] wskazali relatywnie niskie pH 3,5÷4,5 jako najodpowiedniejsze dla syntezy KGA z n-alkanów przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica*.

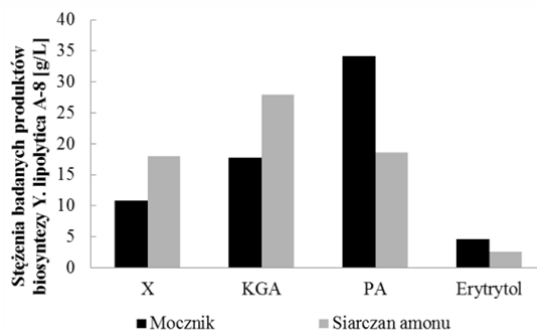
Dobór źródła azotu

Badania nad doбором źródła azotu do biosyntezy KGA zostały podzielone na dwa etapy. W pierwszym etapie cztery różne źródła tego pierwiastka (siarczan amonu, mocznik, baktipepton oraz trypton) zostały przetestowane w hodowlach wstrząsanych. Stężenie tiaminy w podłożu wynosiło 0,4 $\mu\text{g/L}$. Wszystkie źródła azotu były przyswajalne dla komórek drożdży. Obfity wzrost drożdży zanotowano dla hydrolyzatów białkowych, czyli tryptonu i baktipeptonu, przy użyciu których stężenie komórek wynosiło odpowiednio 11,63 i 11,00 g/L. Wysokie stężenie biomasy nie przełożyło się jednak na stężenie wyprodukowanego KGA (0,70 i 5,03 g/L) co w tym przypadku może świadczyć o obecności w tych związkach tiaminy. Stosunkowo wysokie i porównywalne stężenie KGA – 10,80 i 9,17 g/L – uzyskano podczas zastosowania mocznika i siarczanu amonu przy umiarkowanym wzroście biomasy wynoszącym odpowiednio 6,30 oraz 4,77 g/L.

Z uwagi na podobne wyniki uzyskane z zastosowaniem tych dwóch źródeł azotu, postanowiono przetestować je w hodowlach bioreaktorowych. W tym celu przeprowadzono hodowlę z użyciem 4,52 g/L mocznika w pH 3,5 i przy stężeniu tiaminy 0,4 $\mu\text{g/L}$. Wyniki hodowli z mocznikiem porównano z wynikami hodowli z siarczanem amonu (pH 3,5; tab. 1) i podsumowano na rys. 1.

W hodowlach bioreaktorowych różnice wyników uzyskanych w podłożu z mocznikiem i siarczanem amonu były znaczące. Zastosowanie siarczanu amonu skutkowało produkcją 27,4 g/L KGA, przy równoczesnej koprodukcji 18,6 g/L PA i 6 g/L erytrytolu. Poziom

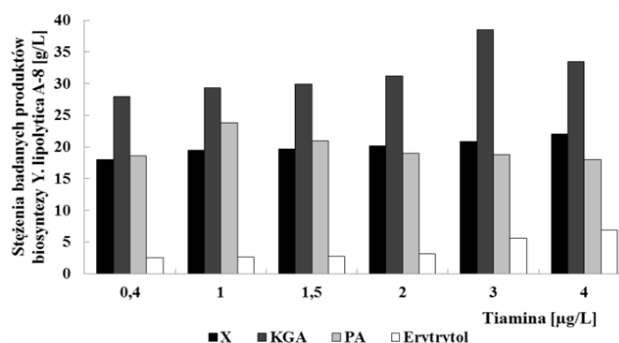
biomasy w tej hodowli wynosił 18 g/L. W przypadku gdy źródłem azotu w podłożu był mocznik produkcja KGA została wyraźnie zahamowana na korzyść PA. Szczep *Y. lipolytica* A-8 wyprodukował jedynie 17,8 g/L KGA, natomiast stężenie PA wynosiło 34,2 g/L. Ponadto aplikacja mocznika była przyczyną obniżenia stężenia biomasy o 7,2 g/L w stosunku do hodowli z siarczanem amonu. Porównanie mocznika i siarczanu amonu jako źródeł azotu w biosyntezie KGA z użyciem drożdży *Y. lipolytica* WSH-Z06 było przedmiotem badań *Zhou i in.* [2010]. Nie stwierdzili oni w tym przypadku znaczących różnic wynikających z zastosowania tych związków. Wpływ źródła azotu na biosyntezę KGA może być więc cechą charakterystyczną dla danego szczepu drożdży.



Rys. 1. Wpływ źródła azotu na biosyntezę KGA w hodowlach bioreaktorowych przez drożdże *Y. lipolytica* A-8

Dobór stężenia tiaminy

Stężenie tiaminy jest kluczowym czynnikiem warunkującym wydajność nadprodukcji KGA w komórkach drożdży [*Chernyavskaya i in.* 2000; *Zhou i in.* 2010; *Kamzolova i in.* 2012]. Witamina ta (jako pirofosforan) odgrywa kluczową rolę w cyklu *Krebsa* będąc kofaktorem dehydrogenazy pirogironianowej oraz dehydrogenazy α -ketoglutaranowej. Przy stosowaniu limitującego wzrost drożdży stężenia tiaminy, można doprowadzić do nagromadzenia KGA w komórkach, a następnie jego sekrecji do podłoża hodowlanego. W celu określenia wpływu stężenia tiaminy na produkcję KGA przez szczep *Y. lipolytica* A-8 przeprowadzono sześć hodowli bioreaktorowych różniących się stężeniem tiaminy w zakresie 0,4÷4 $\mu\text{g/L}$, w pH 3,5 z użyciem siarczanu amonu jako źródła azotu. Wyniki uzyskane podczas hodowli zostały przedstawione na rys. 2.



Rys. 2. Wpływ stężenia tiaminy na biosyntezę kwasu α -ketoglutarrowego przez drożdże *Y. lipolytica* A-8

Wzrost stężenia tiaminy był związany ze wzrostem stężenia biomasy, które wynosiło 18,0±22 g/L. *Zhou i in.* [2010] uzyskali znacznie niższy poziom biomasy (10 g/L) dla szczepu *Y. lipolytica* WSH-Z06, jednakże hodowla była prowadzona na czystym substracie (glicerol bezwodny), a stężenie tiaminy wynosiło 0,2 $\mu\text{g/L}$.

Zbliżone stężenie biomasy do zaprezentowanego w niniejszych badaniach otrzymali *Kamzolova i Morgunov* [2013]. Podczas produkcji KGA z oleju rzepakowego szczep *Y. lipolytica* VKM Y-2412 produkował 20 g/L biomasy przy suplementacji 0,2 $\mu\text{g/L}$ tiaminy.

Tak zróżnicowane wyniki mogą być spowodowane użyciem różnych substratów, które oprócz źródła węgla zawierają inne substancje odżywcze. Jak można zauważyć na rys. 2, wraz ze wzrostem ilości tiaminy w podłożu (w zakresie od 1 do 3 $\mu\text{g/L}$) stężenie wyprodukowanego KGA wzrastało, natomiast stężenie PA ulegało obniżeniu. Jako najodpowiedniejsze dla biosyntezy KGA uznano stężenie tiaminy równe 3 $\mu\text{g/L}$. W tych warunkach drożdże produkowały 38,5 g/L KGA z wydajnością 0,39 g/g i objętościową szybkością produkcji 0,53 g/L/h (Tab. 2). Stężenia produktów ubocznych PA i erytrytolu wynosiły odpowiednio, 18,8 i 5,6 g/L.

Tabela 2. Porównanie parametrów produkcyjnych procesu biosyntezy KGA przez szczep *Y. lipolytica* A-8

Stężenie tiaminy [$\mu\text{g/L}$]	Parametr			
	Y_{KGA}	Q_{KGA}	q_{KGA}	KGA : PA
0,4	0,27	0,40	0,02	1,50
1	0,29	0,43	0,03	1,25
1,5	0,28	0,43	0,03	1,33
2	0,30	0,46	0,03	1,64
3	0,39	0,53	0,04	2,05
4	0,33	0,44	0,03	1,54

KGA – kwas α -ketoglutarynowy,
 PA – kwas pirogronowy,
 Y_{KGA} – wydajność produkcji kwasu α -ketoglutarynowego, [g wytworzonego kwasu/g zużytego substratu]
 Q_{KGA} – obj. szybkość produkcji kwasu α -ketoglutarynowego, [g/(Lh)]
 q_{KGA} – szybkość właściwa produkcji kwasu α -ketoglutarynowego, [g/(gh)]

Porównanie procesu produkcji KGA z użyciem różnych rodzajów gliceryny

W warunkach wybranych w poprzednich etapach badań (pH 3,5, stężenie tiaminy 3 $\mu\text{g/L}$) przeprowadzono okresowe hodowle bioreaktorowe z użyciem trzech różnych rodzajów gliceryny (odpadowych o zawartości glicerolu 73 i 83% oraz bezwodnej zawierającej 99% glicerolu). Stężenie glicerolu w tych hodowlach wynosiło 100 g/L. Ilości keto kwasów wyprodukowanych przez drożdże *Y. lipolytica* A-8 zostały porównane na rys. 3.

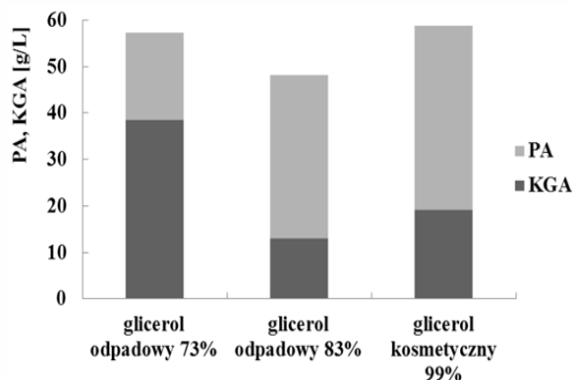
Zmiana zastosowanego rodzaju gliceryny znacząco wpłynęła zarówno na ilości jak i proporcje wyprodukowanych keto kwasów. Przy zastosowaniu 73% gliceryny odpadowej otrzymano 57,3 g/L keto kwasów z ponad dwukrotną przewagą KGA. Aplikacja 83% glicerolu odpadowego w charakterze źródła węgla miała odbicie w obniżeniu ogólnej ilości wyprodukowanych keto kwasów (48,1 g/L), co mogło być spowodowane wysoką zawartością soli w tym surowcu. Odwróceniu uległa również proporcja KGA:PA na korzyść PA, który został zsyntetyzowany przez drożdże w ilości 35,1 g/L. Podobny stosunek stężenia KGA:PA był efektem zastosowania glicerolu bezwodnego jako źródła węgla. Wynikiem tej hodowli było otrzymanie 19,2 g/L KGA oraz 39,5 g/L PA.

Wnioski

Wartość odczynu podłoża produkcyjnego, źródło azotu oraz zastosowane stężenie tiaminy miały znaczący wpływ na wzrost drożdży *Y. lipolytica* A-8 i proces biosyntezy kwasu α -ketoglutarynowego z glicerolu.

Glicerol odpadowy z produkcji biodiesla może być wykorzystany jako źródło węgla i energii w procesie produkcji KGA, jakkolwiek roślinne pochodzenie surowca oraz różne metody produkcji biodiesla warunkują zróżnicowany skład frakcji glicerynowej, a co za tym idzie, konieczność optymalizacji procesu do konkretnej partii glicerolu odpadowego.

W celu poprawienia wydajności procesu i obniżenia stężenia produktu ubocznego (kwasu pirogronowego) konieczne są dalsze badania nad warunkami biosyntezy i składem podłoża hodowlanego.



Rys. 3. Wpływ rodzaju źródła węgla na proporcje keto kwasów wyprodukowanych przez drożdże *Y. lipolytica* A-8

LITERATURA

- Barett D.G., Yousaf M., 2008. Poly(triol α -ketoglutarate) as biodegradable, chemoselective, and mechanically tunable elastomers. *Macromolecules*, **41**, 6347-6352. DOI: 10.1021/ma8009728
- Campbell B., Roberts M., Kerksick C., Wilborn C., Marcello B., Taylor L., Nassar E., Leutholtz B., Bowden R., Rasmussen C., Greenwood M., Kreider R., 2006. Pharmacokinetics, safety, and effects on exercise performance of L-arginine α -ketoglutarate in trained adult men. *Nutrition*, **22**, 872-881. DOI: 10.1016/j.nut.2006.06.003
- Chernyavskaya O.G., Shishkanova N.V., Il'chenko A.P., Finogenova T.V., 2000. Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 152-158. DOI: 10.1007/s002530050002
- Cooper A.J.L., Ginos J.Z., Meister A., 1983. Synthesis and properties of the α -keto acids. *Chem. Rev.*, **83**, 321-358. DOI: 10.1021/cr00055a004
- Cybulski K., Tomaszewska L., Rywińska A., 2012. Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, **11** (3), 5-14
- Finogenova T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Chernyavskaya O.G., 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **41**, 418-425. DOI: 10.1007/s10438-005-0076-7
- Kamzolova S.V., Chiglintseva M.N., Lunina J.N., Morgunov I.G., 2012. α -Ketoglutaric acid production by *Yarrowia lipolytica* and its regulation. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **96**, 783-791. DOI: 10.1007/s00253-012-4222-x
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., 2013. α -ketoglutaric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 5517-5525. DOI: 10.1007/s00253-013-4772-6
- Otto C., Yovkova V., Barth G., 2011. Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 689-695. DOI: 10.1007/s00253-011-3597-4
- Stottmeister U., Behrens U., Weissbrodt E., Barth G., Franke-Rinker D., Schulze E., 1982. Utilization of paraffins and other noncarbohydrate carbon sources for microbial citric acid synthesis. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **22**, 399-424. DOI: 10.1002/jobm.3630220608
- Stottmeister U., Aurich A., Wilde H., Andersch J., Schmidt S., Sicker D., 2005. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as a novel building blocks for subsequent chemical syntheses. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 651-664. DOI: 10.1007/s10275-005-0254-x
- Verseck S., Karau A., Weber M., 2007. Fermentative Herstellung von α -Ketoglutar-säure. Evonik Degussa GmbH. Patent DE 10 2007 051 451.6
- Verseck S., Karau A., Weber M., 2009. Fermentative production of α -ketoglutaric acid. Evonik Degussa GmbH. Patent WO2009053489
- Zhou J., Zhou H., Du G., Liu L., Chen J., 2010. Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for α -ketoglutaric acid overproduction. *Let. Appl. Microbiol.*, **51**, 254-271. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02889