

Magdalena RAKICKA<sup>1</sup>, Zbigniew LAZAR<sup>1,2,3</sup>, Cécile NEUVÉGLISE<sup>2,3</sup>, Tristan ROSSIGNOL<sup>2,3</sup>,  
Jean-Marc Nicaud<sup>2,3</sup>, Małgorzata ROBAK<sup>1</sup>

e-mail: magdalena.rakicka@up.wroc.pl

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, Polska

<sup>2</sup>INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup>AgroParisTech, UMR Micalis, Jouy-en-Josas, France

## Produkcja kwasu cytrynowego z melasy z wykorzystaniem transformantów *Yarrowia lipolytica*

### Wstęp

Kwas cytrynowy jest głównym kwasem organicznym produkowanym w skali przemysłowej na drodze mikrobiologicznej. Jego światowa produkcja sięga 1,6 mln ton rocznie [Berovic i Legisa, 2007], a głównym producentem są grzyby strzępkowe *Aspergillus niger* [Pazoukii in., 2000]. Alternatywną metodą biosyntezy tego kwasu może być proces z użyciem drożdży *Yarrowia lipolytica*, które odznaczają się wysokimi naturalnymi zdolnościami do produkcji tego metabolitu [Klassoni in., 1989]. Wykorzystanie drożdży w porównaniu z metodą tradycyjną zapewnia zwiększoną szybkość produkcji [Moresii in., 1994], a także umożliwia wykorzystanie szerszej gamy surowców, zwłaszcza tłuszczowych [Crolla i Kennedy, 2001].

Drożdże *Y. lipolytica* są obecnie jednym z lepiej poznanych i scharakteryzowanych gatunków drożdży. Posiadają zdolność do wzrostu na szerokiej gamie substratów, tj. monosacharydach (glukoza, fruktoza), białkach, krótkołańcuchowych kwasach organicznych, glicerolu, kwasach tłuszczowych, tłuszczach czy alkanach [Barth i Gaillardin, 1997; Papanikolaou i in., 2002]. Dzikie szczepy nie mają jednak możliwości metabolizowania sacharozy. W praktyce oznacza to, że węglowodanowe produkty odpadowe tj. melasa, nie mogą być utylizowane przy użyciu tego gatunku drożdży [Wojtatowicz in., 1997]. W związku z tym prowadzone są badania mające na celu skonstruowanie szczepów o poszerzonych zdolnościach biotechnologicznych. W procesach tych badacze wykorzystują mutagenizację UV [Wojtatowicz i in., 1991], hybrydyzację na drodze fuzji protoplastów czy ekspresję genów innych mikroorganizmów, w celu umożliwienia utylizacji sacharozy [Lazari in., 2011].

Celem niniejszej pracy była ocena wzrostu i produkcji kwasu cytrynowego z melasy przez transformanty *Y. lipolytica* posiadające dwie kopie genu inwertazy z *Saccharomyces cerevisiae*, wprowadzone pod dwoma różnymi promotorami.

### Materiały i metody

#### Mikroorganizm

W badaniach wykorzystano modyfikowany genetycznie szczep drożdży *Y. lipolytica* A18, posiadający w swoim genomie kasetę do ekspresji heterologicznej inwertazy (SUC2) z drożdży *S. cerevisiae* oraz wykazujący auktotrofię uracylową [Walczak i Robak, 2009]. Gen SUC2 znajduje się pod kontrolą indukcyjnego promotora XPR2. W szczep A18 wprowadzono dodatkową kopię kasety do ekspresji inwertazy, znajdującą się pod kontrolą silnego promotora konstytutywnego TEF [Lazar i in., 2013]. Trzy z powstałych w ten sposób transformantów: A10, A14, A18M, zawierające po 2 kopie genu SUC2 i nie wykazujące auktotrofii uracylowej, wykorzystano do badań nad produkcją kwasu cytrynowego z melasy.

#### Substrat

W badaniach zastosowano melasę buraczną (*Südzucker Polska* S.A., Strzelin) o zawartości sacharozy 45%.

#### Warunki prowadzenia hodowli

**Inokulum** prowadzono w 300 mL kolbach stożkowych zawierających 30 mL podłoża (skład [g/L]: glukoza – 50; ekstrakt drożdżowy – 3; ekstrakt słodowy – 3; *Bactopecton* – 5; woda destylowana 1 L), na wstrząsarce rotacyjnej przez 24 godziny przy obrotach 150 rpm, w temperaturze 30°C.

**Hodowle wstrząsane** prowadzono w 300 mL kolbach stożkowych zawierających 30 mL podłoża produkcyjnego o składzie (g/L): sacharoza – 50; NH<sub>4</sub>Cl – 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 1; ekstrakt drożdżowy – 0,3; tiamina – 3x10<sup>-6</sup>, uracyl – 20 mg (dla szczepu A18), woda wodociągowa 1L, na wstrząsarce rotacyjnej przez 72 godziny przy obrotach 150 rpm w temp. 30°C. Inokulum stanowiło 10% objętości podłoża. Do analizy pobierano 5 ml hodowli po 48 i 72 godzinach, które odwirowywano (10 min., 5000 rpm). Hodowle prowadzono w trzech powtórzeniach.

**Hodowle bioreaktorowe** prowadzono w bioreaktorze *Biostat B-Plus* (Sartorius, Niemcy) w podłożu produkcyjnym zawierającym (g/L): sacharozę lub melasę – 100 i 297, NH<sub>4</sub>Cl – 1,5; ekstrakt drożdżowy – 0,3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 1; tiamina 3x10<sup>-6</sup>; uracyl – 20 mg (dla szczepu A18). Proces prowadzono w objętości całkowitej 2 litrów, przy szybkości przepływu powietrza 0,2 vvm, szybkości obrotowej mieszadła 800 rpm, w temperaturze 30°C. W czasie procesu pH 6,8 utrzymywano automatycznie za pomocą 40% roztworu NaOH. Inokulum stanowiło 10% objętości podłoża. Hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach.

#### Metody analityczne

Biomasę oznaczano metodą wagową. Stężenie sacharozy, glukozy, fruktozy i kwasu cytrynowego oznaczano metodą HPLC (*UltiMate 3000*, *Dionex-Thermo Fisher Scientific*, UK) na kolumnie *Aminex HPX87H* (*Biorad*) połączonej z detektorami UV ( $\lambda = 210$  nm) i RI, w temperaturze 35°C, przy szybkości przepływu fazy ciekłej (0,01 N kwasu siarkowego) przez kolumnę równej 0,6 mL/min. Aktywność zewnątrzkomórkową inwertazy oznaczono w płynach pochodzących uprzednio dializowanych przez 24 godziny w 2 mL porcjach wobec buforu octanowego o pH 5. Aktywność inwertazy oznaczano wobec 0,1 M sacharozy jako substratu. Powstające cukry redukujące (glukozę i fruktozę) oznaczano w reakcji z DNS.

**Jednostka aktywności enzymatycznej** (U) – została zdefiniowana jako ilość enzymu, która powoduje uwolnienie 1  $\mu$ moła cukru redukującego na minutę w warunkach reakcji [Lazar i in., 2011].

### Wyniki

#### Produkcja kwasu cytrynowego z sacharozy w hodowlach wstrząsanych

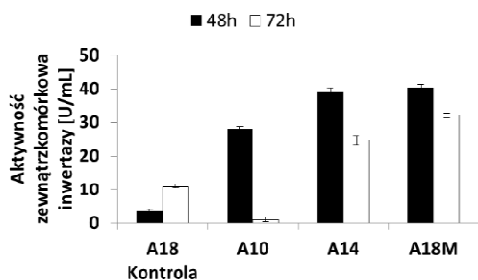
W pracy oceniano zdolność genetycznie modyfikowanych szczepów drożdży *Y. lipolytica* A10, A14, A18M, z dwoma kopiami genu inwertazy (SUC2) do wzrostu i produkcji kwasu cytrynowego z melasy. Kontrolą dla wszystkich procesów były hodowle w podłożu z sacharozą z udziałem szczepu A18, zawierającego jedną kopię genu inwertazy.

W celu wyboru najefektywniejszego producenta kwasu cytrynowego przeprowadzono hodowle wstrząsane trzech wybranych transformantów w podłożu z sacharozą. Po 72 h hodowli szczepu kontrolnego, A18, stężenie biomasy i kwasu cytrynowego wynosiło odpowiednio 9 g/L i 27,2 g/L. Testowane szczepy nie wykazywały znaczących różnic w produkcji biomasy i kwasu cytrynowego w stosunku do szczepu kontrolnego A18 (Tab. 1). Badane transformanty cechowała jednak wyższa aktywność zewnątrzkomórkowa inwertazy w porównaniu ze szczepem kontrolnym, przy czym najwyższą wartość tej aktywności (40 U/mL) stwierdzono dla szczepu A18M.

Tab. 1. Produkcja biomasy i kwasu cytrynowego przez transformanty *Yarrowia lipolytica* w hodowli wstrząsanej w podłożu z sacharozą.

Szczep	Biomasa, [g/L]	Kwas cytrynowy, [g/L]
A18 kontrola	8,6±0,4	26,1±1,1
A10	8,1±1,0	25,9±1,0
A14	8,2±0,5	25,2±0,8
A18M	8,6±0,5	26,5±0,5

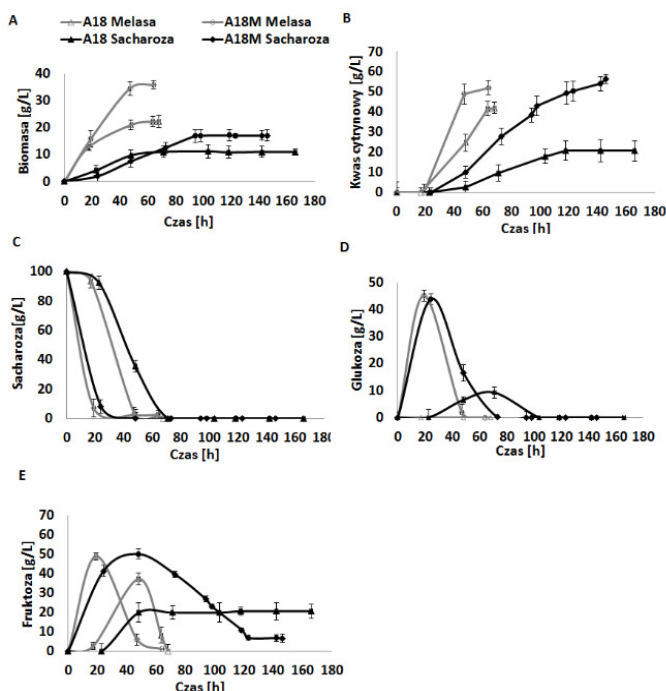
Warto zauważyć, że po 72 godzinach hodowli była ona czterokrotnie wyższa niż aktywność inwertazy dla szczepu kontrolnego (Rys.1).



Rys. 1 Aktywność zewnątrzkomórkowa inwertazy transformantów *Y. lipolytica* podczas hodowli wstrząsanej w podłożu z sacharozą.

### Produkcja kwasu cytrynowego z sacharozą i melasą w okresowych hodowlach bioreaktorowych

W okresowych hodowlach bioreaktorowych porównano proces biosyntezy kwasu cytrynowego z melasy przez szczep A18M, cechujący się najwyższą aktywnością inwertazy, ze szczepem wyjściowym A18. Kontrolą dla tych procesów były hodowle okresowe prowadzone w podłożu z sacharozą. Szczep A18, z jedną kopią inwertazy, w procesie trwającym 166godzin osiągnął wydajność biomasy 11 g/L i wyprodukował 20 g/L kwasu cytrynowego ze 100 g/L sacharozą (Rys. 2A, B). Wydajność i objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego wynosiły odpowiednio 0,21 g/g i 0,1 g/L/h (Tab. 2). Proces hydrolizy sacharozą był powolny, dopiero w 70 godzinie hodowli odnotowano całkowity brak tego substratu (Rys. 2C).



Rys. 2 Produkcja biomasy (A) i kwasu cytrynowego (B), oraz zużycie sacharozą (C), glukozy (D) i fruktozy(E) podczas bioreaktorowych hodowli okresowych prowadzonych w podłożu z sacharozą i melasą transformantów *Y. lipolytica*.

Tab. 2. Parametry produkcji kwasu cytrynowego z sacharozą i melasą transformantów *Y. lipolytica* w bioreaktorowych hodowlach okresowych.

Szczep	Źródło węgla	Czas, [h]	$Y_{CA}$ , [g/g]	$Q_{CA}$ , [g/L/h]
A18	Sacharoza	166	0,21	0,1
A18M	Sacharoza	146	0,56	0,4
A18	Melasa	68	0,42	0,6
A18M	Melasa	64	0,48	0,8

Natomiast zużycie glukozy i fruktozy uwolnionych z sacharozą odbywało się sukcesywnie (Rys. 2D, E). Drożdże w pierwszej kolejności metabolizowały glukozę i dopiero po jej wyczerpaniu ze środowiska hodowlanego metabolizowały fruktozę, jako źródła węgla i energii. Cukier ten jednak został wykorzystany tylko częściowo i pozostał w brzeczce hodowlanej (20 g/L).

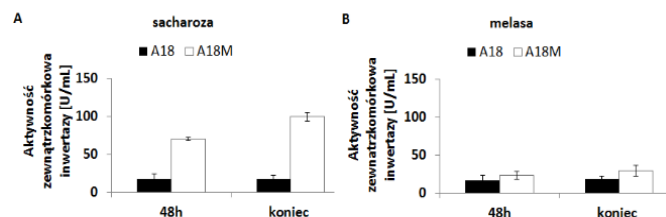
Szczep A18M w hodowli bioreaktorowej w podłożu z sacharozą wyprodukował 17 g/L biomasy i 56 g/L kwasu cytrynowego, z wydajnością i objętościową szybkością produkcji równą odpowiednio 0,56 g/g i 0,4 g/L/h (Rys. 2A, B; Tab. 2). Proces prowadzony przez 146 godzin, sacharoza zhydrolizowana została już po 48 godzinach. Ilość resztkowej fruktozy w brzeczce hodowlanej wyniosła 6 g/L (Rys. 2C, D, E).

W kolejnym etapie badań wykorzystano melasę buraczaną do produkcji kwasu cytrynowego. Procesy bioreaktorowe z wykorzystaniem tego surowca odpadowego cechowały się ponad dwukrotnie krótszym czasem hodowli, wyższą wydajnością biomasy i zwiększoną produkcją kwasu cytrynowego. Szczep kontrolny w czasie 68 godzin tworzył 22 g/L biomasy i 42 g/L kwasu cytrynowego, z wydajnością produkcji tego metabolitu równą 0,42 g/g. Objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego wynosiła 0,6 g/L/h (Rys. 2; Tab. 2). Szczep ten hydrolizował sacharozę do 48 godziny, a oba produkty jej rozpadu, glukoza i fruktoza, zostały wykorzystane w całości (Rys. 2C, D, E). W przypadku szczepu A18M proces uległ skróceniu do 64 godzin, biomasa wynosiła 36 g/L. Ilość wyprodukowanego kwasu cytrynowego kształtowała się na poziomie 52 g/L. Wydajność i objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego wynosiły odpowiednio 0,48 g/g i 0,8 g/L/h (Tab. 2). Cukry proste – glukoza i fruktoza były metabolizowane przez drożdże jednocześnie w trakcie trwania procesu (Rys. 2D, E).

Aktywność zewnątrzkomórkowa inwertazy szczepu A18M podczas hodowli z sacharozą była najwyższa. Na końcu procesu osiągnęła wartość 104 U/mL. Natomiast szczep kontrolny, A18, wykazywał pięciokrotnie niższą aktywność zewnątrzkomórkową inwertazy w hodowli z czystym substratem (Rys. 3A). W procesie, w którym wykorzystano melasę, jako źródło węgla szczep z dwoma kopiami inwertazy, cechował się wyższą aktywnością inwertazy zewnątrzkomórkowej niż szczep kontrolny, nie przekroczyła ona jednak wartości 30 U/mL (Rys. 3B).

### Dyskusja wyników

Zastosowanie melasy jako źródła węgla w przeprowadzonych badaniach spowodowało znaczne skrócenie czasu procesu w porównaniu z użyciem czystej sacharozą. Proces z melasą w podłożu dla transformanta A18M, z dwoma kopiami inwertazy, skrócił się o połowę. Drożdże A18M produkowały podobną ilość kwasu cytrynowego z obu substratów – melasy i sacharozą, z porównywalną wydajnością.



Rys. 3 Porównanie aktywności zewnątrzkomórkowej inwertazy w podłożu z sacharozą (A) i melasą (B) w bioreaktorowych hodowlach okresowych transformantów *Y. lipolytica*.

Jednakże w podłożu z melasą objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego wzrosła aż dwukrotnie, do wartości 0,8g/L/h. Jest to jedna z najwyższych wartości produktywności opisana dla procesów z wykorzystaniem drożdży *Y. lipolytica* [Lazar i in., 2011]. Zatem użycie szczepu z dwiema kopiami inwertazy sprawdza się idealnie w produkcji kwasu cytrynowego z melasy i znacznie skraca czas procesu.

Transformant A18M w hodowli z sacharozą produkował kwas cytrynowy z wydajnością i objętościową szybkością produkcji równą odpowiednio 0,56 g/g i 0,4 g/L/h. Rezultaty te są podobne do otrzymanych w badaniach Lazara i in., [2011], gdzie testowano 7 transformantów SUC+ drożdży *Y. lipolytica* pod kątem jednoczesnej produkcji kwasu cytrynowego i inwertazy z sacharozy w okresowej hodowli bioreaktorowej. Najwyższe stężenie kwasu cytrynowego odnotowano dla szczepu SUC<sup>+</sup>*Y. lipolytica* A-101 –B56-5. Wynosiło ono 46,2 g/L z wydajnością 0,55 g/g i objętościową szybkością produkcji równą 0,63 g/L/h. Wyższe stężenie kwasu cytrynowego (140 g/L) odnotowali Förster i in., [2007] dla szczepu SUC<sup>+</sup>*Y. lipolytica* H222-S4 T5 w hodowli półokresowej z zasilaniem sacharozą.

Z kolei użycie glicerolu jako substratu pozwoliło uzyskać wyższe stężenie tego metabolitu. W badaniach Rywińskiej i in., [2010] szczep *Y. lipolytica* A-101 w hodowli okresowej produkował 66-80 g/L kwasu z wydajnością (0.40–0.53 g/g). Produkcja kwasu cytrynowego z glukozy w hodowlach okresowych dla innych szczepów *Y. lipolytica* kształtowała się na niższym poziomie (41 g/L) [Moelleri i in., 2007].

W niniejszej pracy zaobserwowano istotną różnicę w użyciu glukozy i fruktozy, w zależności od rodzaju źródła węgla w podłożu. W podłożu z melasą, glukoza i fruktoza ulegały praktycznie w całości przekształceniu w biomasę i metabolity. Odmienną sytuację odnotowano dla podłoża z sacharozą. Drożdże preferowały do wzrostu i produkcji cytrynianu glukozę, a następnie fruktozę. Podobne obserwacje odnotowali Wojtatowicz i in., [1997].

Aktywność zewnątrzkomórkowa inwertazy była znacznie niższa w hodowli, w której substratem była właśnie melasa. Spowodowane jest to najprawdopodobniej obecnością w podłożu komponentów wpływających hamująco na aktywność enzymatyczną inwertazy. Drożdże piekarskie produkują inwertazę w podłożu z sacharozą w ilości 1900 U na litr podłoża [Ul-Haq i Ali., 2008]. Aktywność enzymatyczna odnotowana w prezentowanej pracy (30 000÷107000U/L) jest wyższa od aktywności inwertazy szczepów dzikich zbliżona do szczepów modyfikowanych genetycznie (58 000 U/L) [Ul-Haq i Ali, 2008].

## Wnioski

Dynamika wzrostu transformata *Y. lipolytica* A18M, z dwiema kopiami genu inwertazy oraz efektywność produkcji kwasu cytrynowego w podłożu z melasą były satysfakcjonujące.

Objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego w podłożu z melasą była dwukrotnie wyższa niż w hodowli z czystym substratem.

Uzyskany szczep A18M stanowi dobry punkt wyjściowy do dalszych badań nad optymalizacją procesu, mających na celu zwiększenie efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego i inwertazy z tanich i odpadowych surowców pochodzących z innych gałęzi przemysłu.

## OZNACZENIA

YCA – wydajność produkcji kwasu cytrynowego, [g/g]

QCA – objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego, [g/L/h]

## LITERATURA

- Barth G., Gaillardin C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **19**, 219-237. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x
- Berovic M., Legisa M., 2007. Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*, **13**, 303-343. DOI:10.1016/S1387-2656(07)13011-8
- Crolla A., Kennedy K.J., 2001. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *J. Biotechnol.*, **89**, 27-40. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00278-4
- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G., 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1409-1417. DOI: 10.1017/S00253-007-0960-6
- Klasson T.K., Clausen E.C., Gaddy J.L., 1989. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **20/21**, 491-509. 0273-2289/89/2021-0491803.30
- Lazar Z., Walczak E., Robak M., 2011. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresour Technol.*, **102**, 6982-6989. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.032
- Lazar Z., Rossignol T., Verbeke J., Crutz-Le Coq A.M., Nicaud J-M., Robak M., 2013. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**:1273-1283. DOI: 10.1007/s10295-013-1323-1
- Moeller L., Strehlitz B., Aurich A., Zehndorf A., Bley T., 2007. Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci.*, **7**, nr 5, 504-511. DOI: 10.1002/elsc.200620207
- Moresi M., 1994. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60**, 387-395. DOI: 10.1002/jctb.280600409
- Pazouki, M., Felse, P.A., Sinha, J., Panda, T., 2000. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. *Bioprocess Eng.*, **22** nr 4, 353-361. DOI: 10.1007/PL00009115
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I.: 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Microbiol.*, **92**, 737-744. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska, B., Skrzypiński A., 2010. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1217-1224. DOI: 10.1007/s11274-009-0291-0
- Ul-Haq I., Ali S., Asham A., Qadeer M.A., 2008. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with enhanced production of b-D-fructofuranosidase. *Bioresour. Technol.*, **99**, 7-12. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.11.047
- Walczak E, Robak M, 2009. Growth on sucrose of *Yarrowialipolytica* yeasts clones with invertase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta. Sci. Pol. Biotechnol.*, **8**, nr 4:25-36
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Kautola H., 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* A-101 for citric acid production from glucose hydrol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **31**, 165-174. DOI: 10.1007/BF02921787
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., Żarowska B., Nicaud J-M., 1997. Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants in sucrose media. *Pol. J. Food.Nutr.Sci.*, **6/47**, (4):49-54.

**Badania prowadzono w ramach współpracy polsko-francuskiej (Partnerski Program Badań Naukowych im. Huberta Curiena PHC „POLONIUM”)**