

Produktywność i wydajność drożdżowej fermentacji cytrynowej w różnych systemach hodowlanych

Maria Wojtatowicz

Waldemar Rymowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Akademia Rolnicza

Wrocław

1. Wstęp

Drożdże *Yarrowia lipolytica* mogą być ewentualnym producentem kwasu cytrynowego. W porównaniu do grzybów strzępkowych *Aspergillus niger*, wykorzystywanych w przemysłowej produkcji tego kwasu, drożdże charakteryzują się wyższą dynamiką wzrostu i syntezy kwasu. Ponadto mają uzdolnienia nie tylko do utylizacji węglowodanów, lecz również niekonwencjonalnych substratów, takich jak: węglowodory, oleje roślinne, etanol i kwasy tłuszczowe. Drożdże *Y. lipolytica* są mniej wrażliwe na różne stresy środowiskowe, m.in. na podwyższoną zawartość jonów metali, zwłaszcza Fe^{+2} , Mn^{+2} , czy wysokie stężenie cukru. Organizmy te tworzą jednokomórkowe populacje, bardziej pożądane w procesach ciągłych. Pewną niedogodnością drożdżowej fermentacji cytrynowej jest uboczna produkcja kwasu izocytrynowego sięgająca w pożywkach cukrowych 10-20% ogółu tworzonych kwasów (8,18).

Proces produkcji kwasu cytrynowego przy użyciu drożdży wzbudza szerokie zainteresowanie i jest badany w różnych aspektach. Wiele miejsca w tematycznym piśmiennictwie z ostatnich lat zajmują zagadnienia technologiczne. Przedmiotem badań są zarówno procesy okresowe (2,4,18) jak i ciągłe z udziałem wolnych (2,6,8) i immobilizowanych komórek drożdży (5,9,13,14).

W pracy tej porównano produktywność i wydajność kwasu cytrynowego z glukozy w procesie okresowym, okresowym z zasilaniem oraz półciągłym z zawracaniem komórek *Y. lipolytica*.

2. Materiały i metody badań

Mikroorganizm. Do biosyntezy kwasu cytrynowego stosowano szczep *Yarrowia lipolytica* A-101 pochodzący z własnej kolekcji drożdży. Kulturę prze-

chowywano na podłożu YM pod parafiną, w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, przeszczeplając ją raz w roku.

Podłoże wzrostowe (GM) zawierało glukozę — 40 g; NH_4Cl — 3 g; KH_2PO_4 — 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1 g; ekstrakt drożdżowy — 1 g w 1 dm^3 wody wodociągowej.

W skład podłoża produkcyjnego (PM) wchodziła: glukoza techniczna — 100-200 g; NH_4Cl — 1-3 g; KH_2PO_4 — 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 g; ekstrakt drożdżowy — 1 g; woda wodociągowa 1 dm^3 .

3. Technika hodowli

Inoculum namnażano w kolbach o objętości 500 cm^3 zawierających 100 cm^3 podłoża GM, na wstrząsarce, w temp. 29°C , przez 48 godzin.

Hodowlę produkcyjne wykonywano w 10 dm^3 fermentorze AK-210 (*Vnesh-technika*) zawierającym wyjściowo $5,5 \text{ dm}^3$ podłoża PM i biomasę z 300 cm^3 GM, jako inoculum. W czasie hodowli utrzymywano pH 5,5 za pomocą roztworu 10 mol NaOH, natlenienie 60-80% stanu nasycenia O_2 w fazie wzrostu i 40-50% w fazie produkcji kwasów oraz temp. 29°C .

Hodowlę okresowe (ang. *batch culture* — BC) prowadzono przy stężeniu glukozy 100 i 180 g/dm^3 i odpowiednio 1 i 2 g/dm^3 NH_4Cl , w czasie niezbędnym do całkowitego wykorzystania cukru.

Hodowlę okresową zasilaną (ang. *fed-batch culture* — FBC) rozpoczynano w podłożu o objętości $5,5 \text{ dm}^3$, zawierającym 135 g/dm^3 glukozy i 3 g/dm^3 NH_4Cl . Po obniżeniu się stężenia cukru do około 50 g/dm^3 uruchamiano pompę membranową (Braun-Melsungen), która w sposób ciągły, z szybkością $15 \text{ cm}^3/\text{h}$, dozowała do hodowli 70% roztwór glukozy w łącznej objętości $0,8 \text{ dm}^3$. Czas zasilania hodowli glukozą zaznaczony jest na rys. 1. Objętość końcowa hodowli wynosiła $6,6 \text{ dm}^3$ (w całym procesie wprowadzono dodatkowo $0,3 \text{ dm}^3$ ługu sodowego w celu neutralizacji powstających kwasów).

Hodowlę półciągłą z zawracaniem biomasy (ang. *semicontinuous culture with cell recycling* — SCC), prowadzono w ten sposób, że drożdże najpierw wyrastały i produkowały kwasy w pożywce PM, zawierającej 150 g/dm^3 glukozy i 3 g/dm^3 NH_4Cl .

Po zakończeniu hodowli stacjonarnej (cykl I) odbierano połowę zawartości fermentora, oddzielano biomasę przez wirowanie i zawracano ją ponownie do bioreaktora wraz z analogiczną do odebranej objętością świeżego podłoża, ale bez azotu. W ten sposób rozpoczynano II i kolejne cykle hodowlane.

4. Metody analiz

Kwas cytrynowy (CA) oznaczano za pomocą metody pentabromoacetonowej (17), kwas izocytrynowy (ICA) enzymatycznie z udziałem NADP-zależnej dehydrogenazy izocytrynianowej (15), glukozę przy zastosowaniu metody Nelsona (11), biomasę — wagowo.

5. Wyniki i dyskusja

Szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101 produkował w hodowlach okresowych na glukozie kwas cytrynowy (CA) i towarzyszący mu kwas izocytrynowy (ICA) z różną szybkością i wydajnością, zależnie od wyjściowego stężenia cukru (tab. 1 i 2).

TABELA 1
WSKAŹNIKI TECHNOLOGICZNE CHARAKTERYZUJĄCE HODOWLE OKRESOWE (BC)
Y. LIPOLYTICA A-101 PRZY RÓŻNYM STĘŻENIU GLUKOZY

Hodowla	Glukoza (g/dm ³)	NH ₄ Cl (g/dm ³)	Czas (h)	X (g/dm ³)	CA (g/dm ³)	ICA (g/dm ³)	Y _c (g/g)
(A)	180	2,0	76	13,8	98,8	16,0	0,65
(B)	100	1,0	84	7,1	63,7	10,2	0,74

Y_c — wydajność całkowita procesu na wprowadzoną glukozę.

Fermentacja (A) przy stężeniu 180 g/dm³ glukozy trwała zaledwie 76 godzin i była o 8 godzin krótsza w porównaniu do procesu (B) prowadzonego przy 100 g/dm³ cukru. Nagromadzało się w niej łącznie 114,8 g (CA+ICA)/dm³. Kwas izocytrynowy stanowił w obu hodowlach 14% sumy kwasów (tab. 1). Produktywność procesu (A), wynosząca 1,51 g/dm³h, była w przybliżeniu dwa razy wyższa od stwierdzanej w fermentacji z *A. niger* (10). Wysokie wyjściowe stężenie cukru korzystnie wpływało na zwiększenie szybkości właściwej wzrostu drożdży (μ) i szybkości właściwej syntezy kwasów (q_p), natomiast wydajności biomasy $Y_{x/s}$ i produktu $Y_{p/s}$ były zdecydowanie niższe niż w pożywce niskocukrowej (tab. 2). Wydajność kwasów ogółem, w przeliczeniu na zużytą glukozę ($Y_{p/s}$), wynosiła 0,81 g/g, podczas gdy w pożywce zawierającej 10% cukru 0,91 g/g.

TABELA 2
PARAMETRY KINETYKI WZROSTU, SYNTEZY KWASÓW CYTRYNOWYCH I ZUŻYCIA GLUKOZY
ORAZ WSKAŹNIKI WYDAJNOŚCI W HODOWLACH OKRESOWYCH (BC)

Hodowla	μ_{max} h ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/g	q_s g/gh	q_p g/gh	q_{CA} g/gh	q_{ICA} g/gh	$Y_{p/s}$ g/g	Q_c g/dm ³ h
(A)	0,244	0,31	0,172	0,139	0,119	0,020	0,81	1,51
(B)	0,210	0,38	0,135	0,122	0,105	0,017	0,91	0,88

μ_{max} — szybkość właściwa wzrostu w fazie logarytmicznej; $Y_{x/s}$ — wydajność wzrostu w fazie logarytmicznej; q_s , q_p , q_{CA} , q_{ICA} — szybkości właściwe: zużycia glukozy, syntezy kwasów ogółem, kwasu cytrynowego i izocytrynowego w stałej fazie produkcji; $Y_{p/s}$ — wydajność kwasów ogółem w fazie stałej produkcji; Q_c — całkowita produktywność procesu.

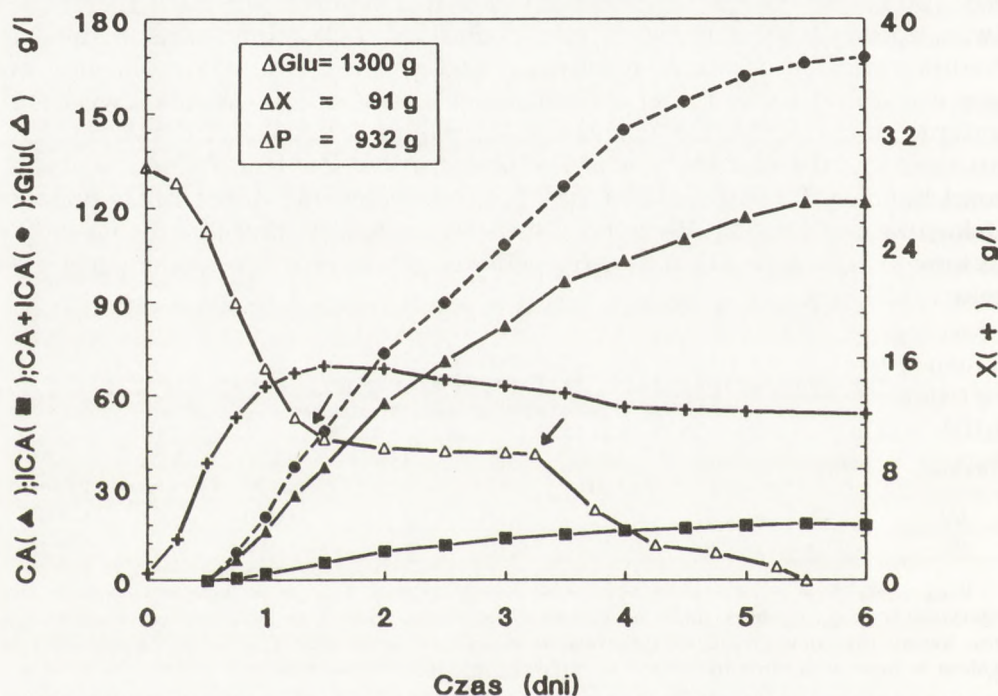
Niższa wydajność biosyntezy w warunkach wysokiego stężenia substratu mogła być rezultatem nagromadzania się alkoholi cukrowych; glicerolu i ery-

trytolu. Związki te są produkowane przez drożdże w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego i pełnią rolę osmoregulatorów (16).

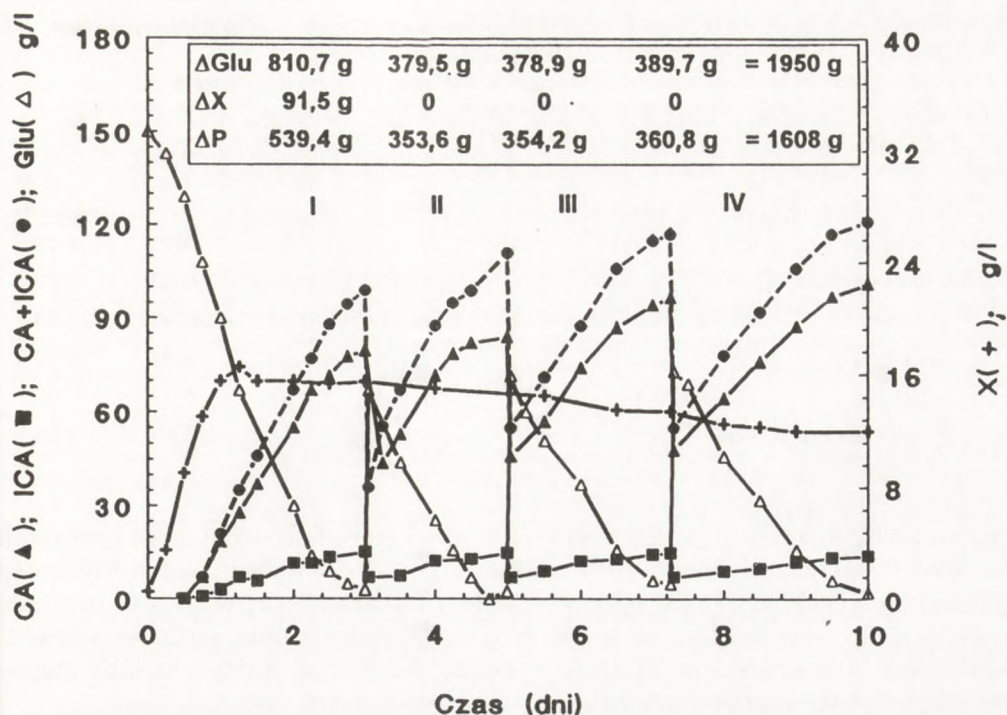
W okresowych hodowlach *Y. lipolytica* A-101 szybkość właściwa tworzenia kwasu cytrynowego (qCA) utrzymywała się na poziomie 0,119 g/gh (A) i 0,105 g/gh (B). Parametr ten był znacznie wyższy aniżeli wartość stwierdzona dla innych szczepów *Y. lipolytica*, gdzie wahał się w granicach 0,045-0,07 g/gh (2,4,9).

Wzrost stężenia cukru powodował zwiększenie dynamiki wzrostu drożdży oraz dynamiki produkcji kwasu, czemu towarzyszyło obniżenie się zarówno wydajności biomasy, jak i kwasu. Podobne korelacje pomiędzy parametrami kinetyki i metabolicznej efektywności wzrostu i tworzenia kwasów cytrynowych w kulturach drożdży stwierdzili również Behrens i współ. (1). W przeciwieństwie do nich Kim i Roberts (6) oraz Rane i Sims (12) obserwowali, że ze wzrostem stężenia glukozy w brzeczce fermentacyjnej, zwiększała się zarówno szybkość produkcji kwasu cytrynowego jak i jego wydajność. Wzrost stężenia glukozy z 50-150 g/dm³, powodował zwiększenie wydajności produktu $Y_{p/s}$ do 0,36-0,79 g/g (12).

Przebieg biosyntezy CA w hodowli okresowej zasilanej (FBC) pokazano na rys. 1. Proces ten umożliwił utrzymanie stężenia cukru w czasie fermentacji na niskim poziomie, sprzyjającym jego wydajnej konwersji do kwasu, przy



Rys. 1. Biosynteza kwasu cytrynowego w okresowej hodowli zasilanej (FBC); w czasie od 28-81 godz. (strzałki) wprowadzono 0,8 dm³ 70% roztworu glukozy. Liniami ciągłymi zaznaczono stężenia: glukozy (Glu), biomasy (X), kwasu cytrynowego (CA), kwasu izocytrynowego (ICA) w aktualnej objętości hodowli, linią przerywaną zaznaczono stężenie kwasów ogółem odniesione do objętości wyjściowej 5,5 dm³.



Rys. 2. Biosynteza kwasu cytrynowego w półciągłej hodowli (SCC) z zawracaniem biomasy.

równoczesnym wysokim zużyciu ogólnym tego źródła węgla. W ciągu 6-dobowej hodowli drożdże wykorzystały 1300 g glukozy na syntezę 90,8 g biomasy i 932 g kwasów ogółem. Maksymalne stężenie kwasów w końcowej objętości 6,6 dm³ środowiska wynosiło 125 g/dm³ CA i 17,5 g/dm³ ICA i było zbliżone do osiąganego w brzczykach melasowych lub sacharozowych z udziałem *A. niger* (10), choć było istotnie niższe w porównaniu do 200-225 g/dm³ w pożywkach z węglowodorami (3). Drożdże przestawały produkować ICA od piątej doby, gdy poziom kwasów ogółem zbliżył się do 120 g/dm³, zaś szybkość syntezy CA wyraźnie się obniżyła. Prowadziło to do poprawy stosunku CA:ICA z 86:14 do 88:12.

Hodowlę półciągłą z zawracaniem biomasy (SCC) prowadzono przy końcowym stężeniu sumy kwasów nie przekraczającym 100-120 g/dm³, aby ograniczyć efekt hamowania szybkości syntezy przez pozakomórkowy cytrynian. W trwającym 10 dni 4-etapowym procesie uzyskano łącznie 1608 g CA+ICA, przy stosunku 86:14, kosztem 1959 g glukozy (rys. 2). Cukier był wykorzystywany na produkcję biomasy tylko w pierwszym cyklu; w kolejnych trzech biosynteza kwasów cytrynowych zachodziła z udziałem nie rosnących komórek drożdży, stąd całkowita wydajność fermentacji była znacznie wyższa, 0,82 g CA+ICA/g glukozy wprowadzonej, w porównaniu do 0,72 g/g w hodowli

okresowej, zasilanej (tab. 3) i 0,65 g/g w zwykłej hodowli stacjonarnej (tab. 1).

TABELA 3
Szybkości właściwe syntezy kwasów cytrynowych i zużycia glukozy
ORAZ WYDAJNOŚĆ SUMY KWASÓW W HODOWLI TYPU FBC
I HODOWLI PÓLCIĄGLEJ Z ZAWRACANIEM BIOMASY (SCC)

Hodowla	q _s g/gh	q _p g/gh	q _{CA} g/gh	q _{ICA} g/gh	Y _{p/s} g/g	Y _c g/g	Q _c g/dm ³ h
FBC	0,102	0,091	0,078	0,013	0,89	0,72	1,17
SCC I cykl	0,119	0,112	0,095	0,017	0,94	0,66	1,36
II cykl	0,105	0,098	0,083	0,015	0,93	0,93	1,34
III cykl	0,098	0,091	0,077	0,014	0,93	0,93	1,19
IV cykl	0,085	0,077	0,065	0,012	0,91	0,92	0,99
cały proces (10 dni)						0,82	1,22

Proces SCC umożliwił również istotne wydłużenie efektywnej fazy produkcji kwasów w stosunku do hodowli zasilanej glukozą i wyższą produktywność całkowitą, wynoszącą 1,22 g/dm³h. Należy także zaznaczyć, że w procesie nie obserwowano zakażeń, co mogło wynikać z braku źródła azotu w pożywce. Wydaje się, że dopiero postępująca autoliza komórek drożdży mogłaby zagrozić jałowości procesu.

Szybkość właściwa biosyntezy kwasów ogółem utrzymywała się na wysokim poziomie 0,112; 0,098 i 0,091 g/gh w trzech pierwszych cyklach hodowlanych, ulegając znacznemu obniżeniu do 0,077 g/gh dopiero w czwartym cyklu (tab. 3). Mogło to być spowodowane obniżeniem liczby żywych komórek. Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że stężenia kwasu cytrynowego, poniżej 50 g/dm³, a także aktywność kwasotwórcza nie rosnących, wolnych i immobilizowanych komórek *Y. lipolytica* pozostawały praktycznie na nie zmienionym poziomie w przeciągu długiego czasu, tj. 20-30 dni. Kim i współ. (7) wykazali, że dodatek niewielkiej ilości azotu do podłoża w takich procesach, przyczyniał się do utrzymania żywotności drożdży i wysokiej ich aktywności kwasotwórczej (6).

Na podstawie uzyskanych wyników okazuje się, że hodowla półciągła z zawracaniem komórek, dzięki niskiemu zużyciu cukru na produkcję biomasy i wysokiej aktywności kwasotwórczej nie rosnących drożdży, była efektywniejsza, tak pod względem całkowitej wydajności kwasu jak i produktywności, aniżeli zwykła hodowla okresowa i hodowla okresowa zasilana.

Literatura

- Behrens U., Weissbrodt E., Lehmann W., (1978), Zeit. All. Mikrob., 18 (8), 549-558.
- Enzminger J. D., Asejno J. A. (1986), Biotechnol. Lett., 8(1), 7-12.
- Finogienova T. V., Lozinov A. B., Karklin R. J., Pelcmane J. Z., Illarionova W. J., Sziszkanova N. W., (1984), in: *Biosintez oksikisloti ketokislot mikroorganisma-*

- mi, Ed. Jakobson J. O., Zinatne, Ryga, 18-26.
4. Kautola H., Rymowicz W., Linko Y.-Y., Linko P., (1992), *Sci. Aliments*, 12(3), 383-392.
 5. Kautola H., Rymowicz W., Linko Y.-Y., Linko P., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 447-449.
 6. Kim E. K., Roberts R. S., (1991), *Biotechnol. Bioengin.*, 37, 985-988.
 7. Kim E. K., Ambriano J. R., Roberts R. S., (1987), *Biotechnol. Bioengin.*, 30, 805-808.
 8. Klasson T. K., Clausen E. C., Gaddy J. L., (1989), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 20/21, 491-509.
 9. Maddox J. S., Kingston P., (1983), *Biotechnol. Lett.*, 5, 795-798.
 10. Milson P. E., Meers J. L., (1985), *Citric acid*. in: *Comprehensive Biotechnology*, Ed. Moo-Young M., Pergamon Press, Oxford, 3, 665-680.
 11. Nelson N., (1994), *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
 12. Rane K. D., Sims K. A., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 646-651.
 13. Rymowicz W., Kautola H., Wojtatowicz M., Linko Y.-Y., Linko P., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 1-4.
 14. Rymowicz W., Wojtatowicz M., Robak M., Jurgielewicz W., (1993), *Acta Microbiol. Polon.*, 42, 163-170.
 15. Sibert G., (1974), *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. Bergmeyer H. U., Acad. Press, New York-London, 3, 1570-1574.
 16. Spenser J. F. K., Spenser D. M., (1978), *Primary products of metabolism*. in: *Economic microbiology*, Academic Press, vol. 2, 393.
 17. Stern J., (1957), *Methods Enzymol.*, 3, 425-431.
 18. Wojtatowicz M., Rymowicz W., Kautola H., (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31, 165-175.

Productivity and yield of citrate fermentation by yeast in various cultivation systems

Summary

Citric acid was produced by yeast strain *Yarrowia lipolytica* A-101 in three various cultivation systems: batch, fed-batch and semicontinuous culture with cells recycling.

Volumetric citric acid productivity (Q_c) and acid yield coefficients ($Y_{p/s}$, Y_c) were compared. The best results were obtained for semicontinuous process; the average volumetric productivity was 1.22 g/dm³h and total acid yield was 0.82 g/g. The productivity was remaining stable in the range of 1.36-1.19 g/dm³h, for three batches of the semicontinuous process and decreased to 0.99 g/dm³h in the fourth one.

Key words:

yeast, *Yarrowia lipolytica*, citric acid, cultivation systems.

Adres dla korespondencji:

Maria Wojtatowicz, Waldemar Rymowicz, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław.