



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

Magdalena Rakicka, Zbigniew Lazar, Cécile Neuvéglise, Tristan T. Rossignol, Jean-Marc J.-M. Nicaud, Malgorzata Robak

► To cite this version:

Magdalena Rakicka, Zbigniew Lazar, Cécile Neuvéglise, Tristan T. Rossignol, Jean-Marc J.-M. Nicaud, et al.. Produkcja kwasu cytrynowego z melasy z wykorzystaniem transformantów *Yarrowia lipolytica*. Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 2015, 3, pp.111-113. hal-02631155

HAL Id: hal-02631155

<https://hal.inrae.fr/hal-02631155>

Submitted on 27 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Magdalena RAKICKA¹, Zbigniew LAZAR^{1,2,3}, Cécile NEUVÉGLISE^{2,3}, Tristan ROSSIGNOL^{2,3}, Jean-Marc Nicaud^{2,3}, Małgorzata ROBAK¹

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

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, Polska

²INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France

³AgroParisTech, 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 buraczaną (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_4Cl – 1,5; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; ekstrakt drożdżowy – 0,3; tiamina – 3×10^{-6} ; 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_4Cl – 1,5; ekstrakt drożdżowy – 0,3; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; tiamina 3×10^{-6} ; 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 μmola cukru redukującego na minutę w warunkach reakcji [Lazar i in., 2011].

Wyniki

Produkcja kwasu cytrynowego z sacharozy w hodowlach wstrząsanych

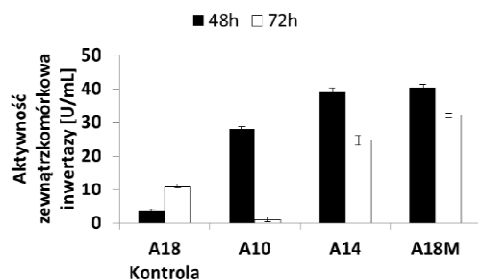
W pracy oceniano zdolność genetycznie modyfikowanych szczepów drożdży *Y. lipolytica* A10, A14, A18M, z dwoma kopiami genu inwertazy (SUC2) do wzrostu i produkcji kwasu cytrynowego z melasy. Kontrolą dla wszystkich procesów były hodowle w podłożu z sacharozą z udziałem szczepu A18, zawierającego jedną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

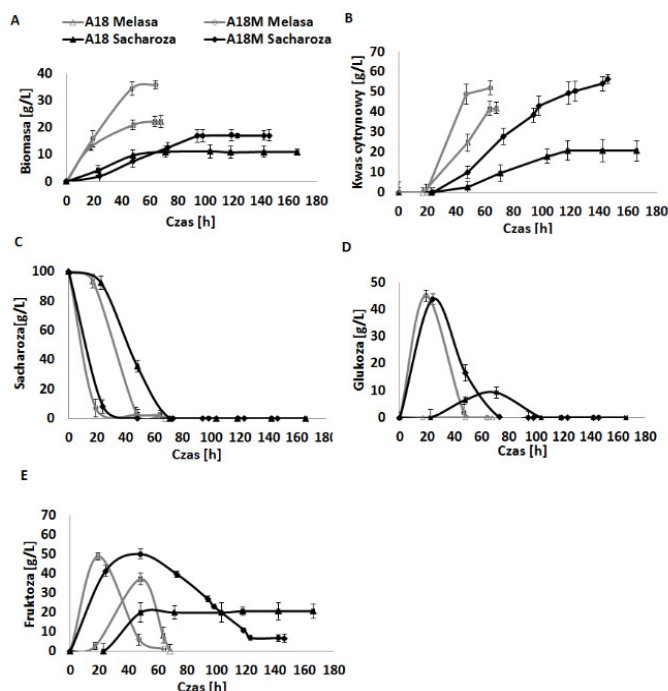
Szczep	Biomasa, [g/L]	Kwas cytrynowy, [g/L]
A18 kontrola	8,6±0,4	26,1±1,1
A10	8,1±1,0	25,9±1,0
A14	8,2±0,5	25,2±0,8
A18M	8,6±0,5	26,5±0,5

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 sacharozy i melasy 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 166 godzin osiągnął wydajność biomasy 11 g/L i wyprodukował 20 g/L kwasu cytrynowego ze 100 g/L sacharozy (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 sacharozy 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 sacharozy (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 sacharozy i melasy 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 sacharozy 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).

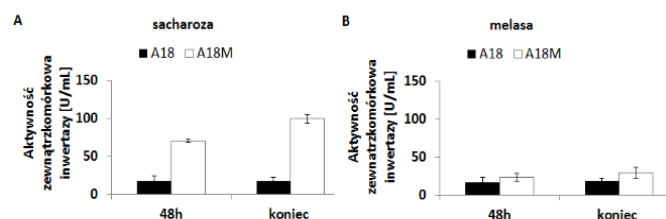
Szczep A18M w hodowli bioreaktorowej w podłożu z sacharozą wyprodukował 17 g/L biomasy i 56 g/L kwasu cytrynowego, z wydajnością i objętościową szybkością produkcji równą odpowiednio 0,56 g/g i 0,4 g/L/h (Rys. 2A, B; Tab. 2). Proces prowadzony przez 146 godzin, sacharoza zhydrolizowana została już po 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 sacharozy. 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 sacharozy, 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 0,8 g/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⁺*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⁺*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 utylizacji 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. Odminną 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÷107 000 U/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. 0273-2289/89/2021-0491\$03.30
- 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., Zehnsdorf 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 *Yarrowia lipolytica* 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”)