

# Próba wykorzystania sztucznie flokulowanych komórek *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy kwasu cytrynowego

Waldemar Rymowicz

Maria Wojtatowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Akademia Rolnicza  
Wrocław

## 1. Wstęp

Flokulacja mikroorganizmów zwana inaczej kłaczkowaniem jest zjawiskiem znanym, wykorzystanym praktycznie w różnych procesach biotechnologicznych. Naturalne zdolności niektórych szczepów drożdży lub bakterii do tworzenia agregatów są dobrze poznane i wykorzystywane między innymi w browarnictwie i przemyśle spirytusowym (2,9,11). Zjawisko to z powodzeniem wykorzystywano także do wstępnej separacji masy komórkowej z płynów pochodzących (3,4,7). Flokulacja może być także interesującą metodą unieruchamiania komórek i zastosowania ich w ciągłych systemach hodowlanych (2,5). Mikroorganizmy, które nie mają naturalnych uzdolnień do flokulacji tworzą aglomeraty komórek w obecności różnych związków chemicznych. W sposób sztuczny można wywołać zjawisko kłaczkowania za pomocą poliwiniloalkoholi (9), polielektrolitów (5,6,12) lub związków koloidalnych (3,4) wprowadzonych do zawiesiny komórek. Wśród wielu związków chemicznych powodujących łączenie się pojedynczych komórek w agregaty jest bentonit i chitozan (7,18).

Celem niniejszej pracy było dobranie optymalnych warunków flokulacji drożdży *Yarrowia lipolytica* w brzeczce fermentacyjnej za pomocą chitozanu i bentonitu oraz ocena uzdolnień kłaczkujących form drożdży do biosyntezy kwasu cytrynowego w porównaniu do wolnych komórek.

## 2. Materiał i metody badań

**Mikroorganizmy.** Wykorzystano następujące szczepy drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101, *Y. lipolytica* A-101.1.31, *Y. lipolytica* A-101.1.22, pochodzące

z własnej kolekcji drożdży, *Y. lipolytica* ATCC 8661 z kolekcji amerykańskiej ATCC.

**Podłoża.** Podłoże inokulacyjne YPG zawierało (g/dm<sup>3</sup>): glukozę — 40,0; ekstrakt drożdżowy — 10,0; bacto-pepton — 20,0 rozpuszczone w wodzie wodociągowej (pH 7,0).

Podłoże produkcyjne miało następujący skład (g/dm<sup>3</sup>): glukoza — 100,0; NH<sub>4</sub>Cl — 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,2; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 0,5; ekstrakt drożdżowy — 1,0; CaCO<sub>3</sub> — 20,0; woda wodociągowa do 1 dm<sup>3</sup>. pH podłoża wynosiło 5,5.

**Hodowle.** Hodowle inokulacyjne prowadzono w 300 cm<sup>3</sup> kolbach stożkowych zawierających 25 cm<sup>3</sup> podłoża na wstrząsarce rotacyjnej przy obrotach 160 rpm, w temp. 30°C przez 48 godzin.

Hodowle produkcyjne, w zależności od eksperymentu, prowadzono w 300 cm<sup>3</sup> kolbach stożkowych zawierających 25 cm<sup>3</sup> podłoża na wstrząsarce rotacyjnej w temp. 30°C przez 7 dni lub w 1-litrowym fermentorze typu Biostat (Braun-Melsungen) zawierającym 800 cm<sup>3</sup> podłoża przy szybkości mieszania 600 obr/min, przepływie powietrza 400 cm<sup>3</sup>/min, w temp. 30°C. pH 5,5 utrzymywano automatycznie za pomocą 5 M NaOH.

**Flokulacja.** Test flokulacyjny wykonywano zgodnie z metodyką podaną przez Hughesa i wsp. (7). Zawiesinę komórek drożdży w ilości 100 cm<sup>3</sup> pobierano z fermentora w fazie stacjonarnej, przenoszono do kolby stożkowej o poj. 300 cm<sup>3</sup> i dodawano odpowiednie ilości 1% roztworu chitozanu lub 1% zawiesiny bentonitu. W testach z bentonitem dodawano do zawiesiny komórek dodatkowo 100 mg/dm<sup>3</sup> jonów Ca<sup>+2</sup> lub Mg<sup>+2</sup> w formie, odpowiednio CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O lub MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O. Próby wstrząsano najpierw przy 160 rpm przez 15 minut, a następnie przy 50 rpm przez 10 minut, w temperaturze pokojowej. Całość przenoszono do 100 cm<sup>3</sup> cylindra miarowego i po 15 minutach odczytywano zmętnienie cieczy nad osadem przy λ = 600 nm. Efektywność procesu flokulacji wyznaczano jako tzw. procent redukcji zmętnienia (% RT), który obliczano wg formuły:

$$\% RT = \left( 1 - \frac{E_2}{E_1} \right) \times 100$$

E<sub>1</sub>- początkowe zmętnienie zawiesiny komórek bez dodatku flokulanta,

E<sub>2</sub>- zmętnienie zawiesiny komórek po dodaniu flokulanta i 15-minutowym czasie sedymentacji.

Flokulację komórek w wodzie destylowanej prowadzono podobnie jak w brzeczce fermentacyjnej. Odwirowane ze 100 cm<sup>3</sup> hodowli komórki prze-mywano i zawieszano w wodzie destylowanej do początkowej objętości.

**Metody analityczne.** Kwas cytrynowy oznaczano spektrofotometrycznie metodą pentabromoacetonową (16). Biomasę oznaczano wagowo, przy czym próby pobierane z hodowli (10 cm<sup>3</sup>) filtrowano na sączkach firmy Synpor, następnie prze-mywano wodą i suszono w temp. 105°C do stałej masy.

### 3. Wyniki i ich dyskusja

#### 3.1. Flokulacja drożdży z udziałem bentonitu

Drożdże *Y. lipolytica* tworzyły w obecności bentonitu makroskopowe, szybko sedymentujące agregaty komórkowe. Efektywność procesu flokulacji zależała od dawki flokulanta, środowiska, w którym ten proces prowadzono, obecności jonów  $\text{Ca}^{+2}$  lub  $\text{Mg}^{+2}$ , a także od szczepu drożdży (rys. 1a,b,c,d).

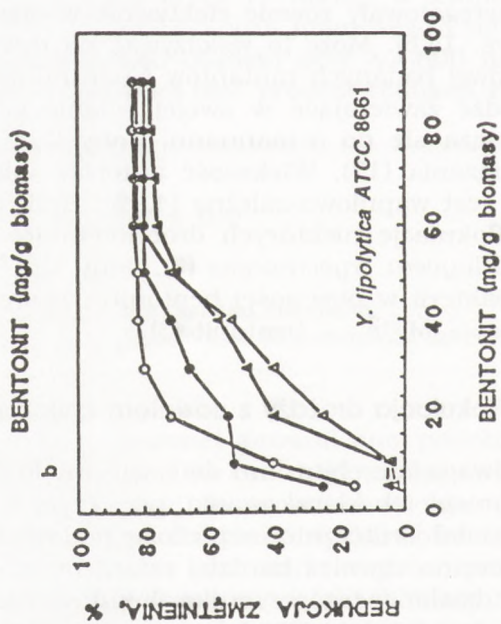
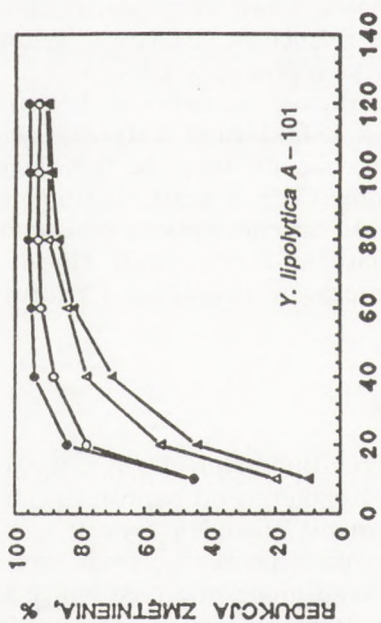
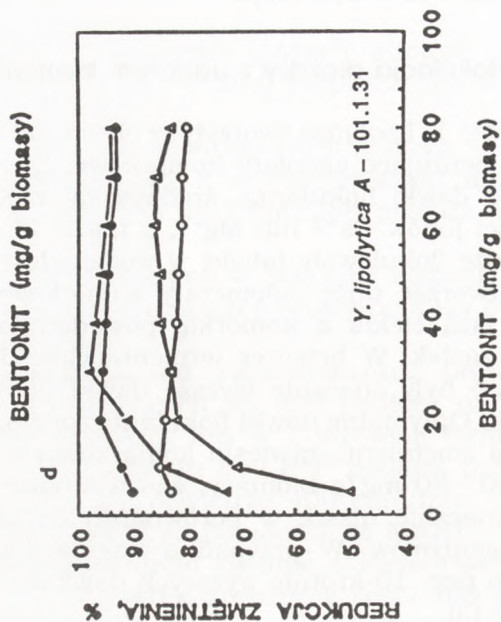
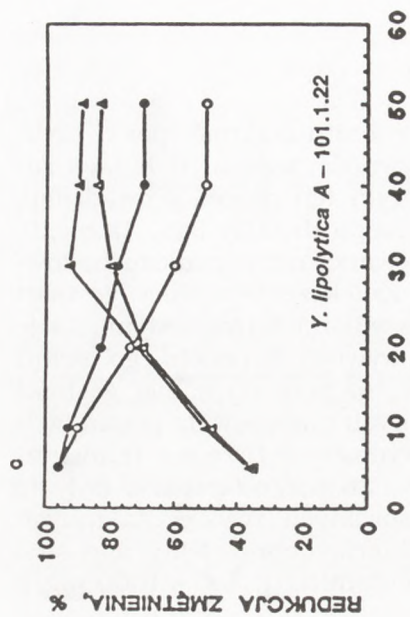
Drożdże flokulowały łatwiej w wodzie destylowanej niż w podłożu hodowlanym, tworząc duże aglomeraty komórkowe. Zwiększenie różnicy gęstości między fazą cieczą a komórką, powodowało szybką i łatwą sedymentację takich cząstek. W brzeczce fermentacyjnej do wywołania podobnego efektu niezbędne były znacznie wyższe dawki bentonitu, przy tej samej gęstości komórek. Optymalne dawki flokulanta, przy których następowała ponad 80% redukcja zmętnienia zawiesin komórkowych, wynosiły w brzeczce fermentacyjnej 30 – 80 mg/g biomasy, zaś w wodzie 8 – 36 mg/g biomasy. Były to dawki znacznie niższe w porównaniu do stosowanych zwykle dla innych mikroorganizmów. W przypadku flokulacji bakterii, dobre efekty agregacji osiągnano przy 10-krotnie wyższych dawkach bentonitu, tj. 500 – 1000 mg/g biomasy (3).

Mutanty octanowe szczepu A-101 (rys. 1c,d) flokulowały przy znacznie niższych dawkach bentonitu niż szczep rodzicielski oraz inny szczep dziki ATCC 8661. Ponadto, na proces ich flokulacji korzystnie wpływała obecność jonów  $\text{Mg}^{+2}$ . Jony  $\text{Ca}^{+2}$  miały mniejsze znaczenie i to zarówno w przypadku komórek zawieszonych w wodzie jak i w brzeczce fermentacyjnej. Szczepy dzikie agregatowały równie efektywnie w obecności jonów  $\text{Mg}^{+2}$  jak i jonów  $\text{Ca}^{+2}$  (rys. 1a,b). Może to wskazywać na pewne różnice w strukturze ściany komórkowej badanych mutantów i naturalnych szczepów drożdży.

Drożdże zawierające w swojej ścianie komórkowej specyficzne lektyny, łatwo wiążą się do  $\alpha$ -mannanu. Jony  $\text{Ca}^{+2}$  są kofaktorami aktywującymi takie wiązania (17). Większość autorów skłania się do tezy, że flokulacja drożdży jest wapniowo-zależna (4,15). Brak jonów  $\text{Ca}^{+2}$  w podłożu uniemożliwiał flokulację niektórych drobnoustrojów jak *Saccharomyces cerevisiae* (1) czy *Kluyvera cryocrescens* (7). Jony  $\text{Mg}^{+2}$  bardziej stymulowały kłaczkowanie bakterii w obecności bentonitu, pośrednicząc w tworzeniu struktury bakterii —  $\text{Mg}^{+2}$  — bentonit (3).

#### 3.2. Flokulacja drożdży z udziałem chitozanu

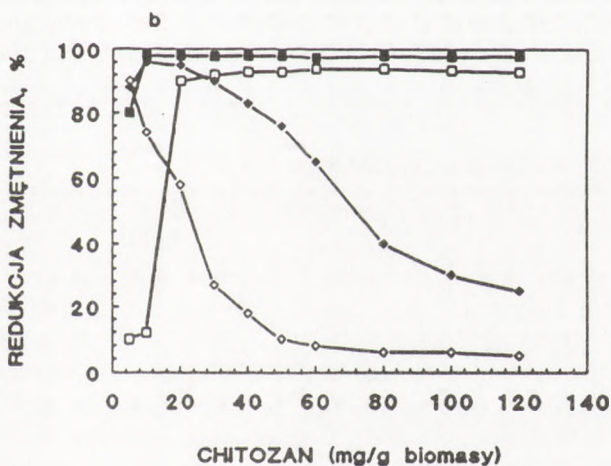
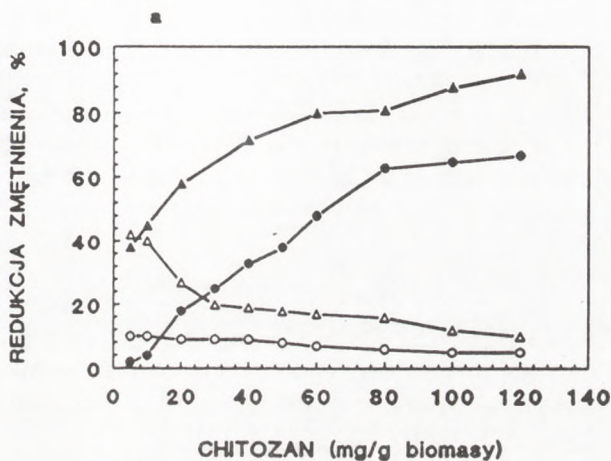
Wprowadzenie chitozanu do zawiesiny komórek badanych drożdży wywoływało proces ich kłaczkowania, przy czym w odróżnieniu od bentonitu, chitozan działał skuteczniej w podłożu hodowlanym niż w wodzie (rys. 2 a, b). Obserwowano również bardziej zróżnicowaną reakcję poszczególnych szczepów na działanie tego czynnika flokulującego. Wy tłumaczenie tego zjawiska można wiązać jedynie z większym wzrostem hydrofobowości ściany komór-



Rys. 1a,b,c,d. Wpływ dawki bentonitu na flokulację szczepów *Y. lipolytica* w wodzie destylowanej (O, ●) i w podłożu produkcyjnym (Δ, ▲), pH 5,5, w obecności jonów Ca<sup>+2</sup> i Mg<sup>+2</sup>. Symbole puste — Ca<sup>+2</sup>, pełne — Mg<sup>+2</sup>.

kowej drożdży w podłożu hodowlanym zawierającym chitozan. Zwiększona hydrofobowość ściany komórkowej sprzyja kontaktowi komórka-komórka (17). Weir i wsp. (18) w podłożach hodowlanych zaobserwowali obniżenie efektywności działania chitozanu w porównaniu do jego właściwości w wodzie. Pewna ilość chitozanu tworzyła nierozpuszczalne związki z polianionowymi komponentami podłoża, takimi jak ekstrakt drożdżowy lub białka.

Ogólnie można stwierdzić, że wraz ze wzrostem dawki chitozanu w podłożu wzrastała efektywność flokulacji szczepów dzikich A-101 i ATCC 8661 (rys. 2a). Dobry efekt flokulacji szczepu A-101, wyrażający się ponad 90%



Rys. 2a,b. Wpływ dawki chitozanu na flokulację szczepów *Y. lipolytica* w wodzie destylowanej i w podłożu produkcyjnym przy pH 5, (Δ, ▲), A-101; (○, ●) ATCC 8661; (□, ■) A-101.1.22; (◇, ◆) A-101.1.31. Symbole puste — woda destylowana; pełne — podłoże produkcyjne.

redukcją zmętnienia zawiesiny komórek w podłożu, uzyskano dopiero przy wysokiej dawce 100 mg chitozanu/g biomasy. W tych warunkach w przypadku szczepu ATCC 8661 osiągnano zaledwie 74% RT. Drożdże zawieszane w wodzie i traktowane chitozanem charakteryzowały się małą zdolnością do flokulacji i nie ulegały lizie. Nawet najwyższe dawki tego flokulanta powodowały tylko niewielki spadek zmętnienia zawiesin.

Mutanty A-101.1.31 i A-101.1.22, różniące się od szczepu rodzicielskiego A-101 brakiem zdolności do wzrostu na octanie jako jedynym źródle węgla, zachowywały się inaczej niż szczep wyjściowy w obecności chitozanu (rys. 2b). Drożdże te dobrze flokulowały już przy niskich dawkach chitozanu, w zakresie stężenia 3-30 mg/g biomasy, i to zarówno w środowisku wodnym jak i w podłożu do biosyntezy kwasu cytrynowego. Optymalna dawka tego flokulanta w podłożu produkcyjnym, przy której stopień redukcji zmętnienia wynosił powyżej 90%, była podobna dla obu szczepów i wynosiła 10 - 20 mg/g biomasy. Zwiększenie dawki chitozanu w podłożu powyżej 20 mg/g biomasy powodowało obniżenie zdolności do kłaczkowania komórek szczepu A-101.1.31. Szczep A-101.1.22 dobrze kłaczkował w wodzie i w podłożu przy wyższych dawkach flokulanta.

Tak zróżnicowane zachowanie się drożdży tego samego gatunku w obecności polikationitu, jakim jest chitozan, związane być może z wielkością potencjału zeta na powierzchni ściany komórkowej szczepu macierzystego i otrzymanych z niego mutantów. Z licznych badań wynika, że dużą rolę przy flokulacji odgrywają właśnie oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy ścianą komórkową a polielektrolitami (1,4,17).

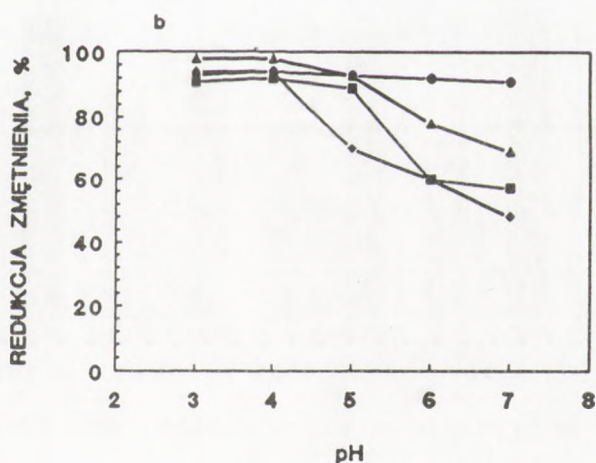
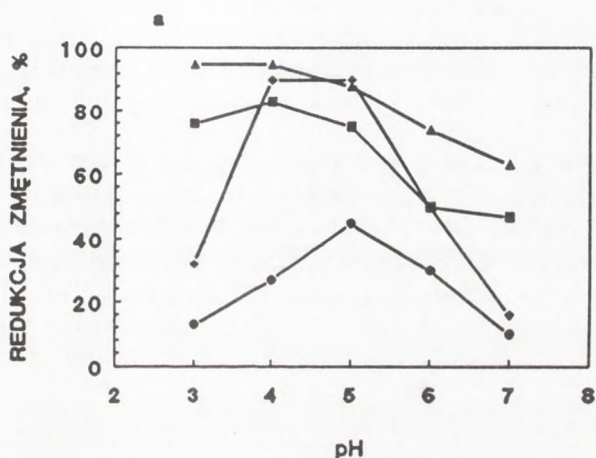
Bakterie *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* flokulowały już przy dawkach chitozanu 2-4 mg/g biomasy. Następowala wówczas ponad 90% redukcja zmętnienia, podczas gdy dla bakterii *Zymomonas mobilis* osiągnięto zaledwie 3,9% redukcji (7). Hughens i wsp. (6) stosując handlowy preparat HYDROCOL zawierający w swoim składzie chitozan, uzyskali dla tych bakterii bardzo dobry efekt kłaczkowania.

### 3.3. Wpływ pH na flokulacje drożdży

Badane szczepy *Y. lipolytica* produkują kwas cytrynowy z glukozy, z największą intensywnością i wydajnością przy pH około 5,5. Z tego też względu w opisanych testach flokulacyjnych, których celem było ustalenie optymalnych dawek flokulantów dla poszczególnych kultur drożdży, stosowano stałe pH środowiska 5,5. Tymczasem z literatury wiadomo, że odczyn środowiska, w którym flokulacja komórek zachodzi najlepiej, może się istotnie różnić w zależności od typu mikroorganizmu poddawanego temu procesowi. Przykładowo, stwierdzono, że bakterie *Zymomonas mobilis* dobrze kłaczkowały w obecności chitozanu w szerokim zakresie pH 3 - 7, podczas gdy *Bacillus subtilis* najlepiej flokulował przy pH 4,0, a *Escherichia coli* w pH 5 - 7 (6,7).

W artykule tym wykazano również istotny wpływ pH na efektywność flokulacji komórek drożdży *Y. lipolytica* (rys. 3a, b). Flokulację prowadzono w podłożu do produkcji kwasu cytrynowego w obecności optymalnej dawki chito-

zanu i bentonitu, przy pH w zakresie od 3 do 7. Drożdże flokulowały najlepiej w niskim pH 3 – 5. Według Hughes i wsp. (6) kombinacja elektrostatycznego oddziaływania z wiązaniami wodorowymi pomiędzy flokulantem a składnikami ściany komórkowej jest bardziej efektywna w pH słabo kwaśnym (6). Ze wzrostem wartości pH powyżej 5,0 zdolność kłaczkowania komórek obniżała się silniej w obecności chitozanu niż bentonitu. Wyjątek stanowił szczep ATCC 8661, który pod działaniem bentonitu dobrze flokulował w całym zakresie badanego pH, natomiast w obecności chitozanu kłaczkowanie drożdży było nieefektywne. W optymalnym pH 5,0 uzyskano tylko 45% redukcję zmętnienia. Z danych przedstawionych na rys. 3a, b można zauważyć, że optymalny zakres pH flokulacji mutantu oct<sup>-</sup> A-101.1.31 był węższy niż flokulacji szczepu



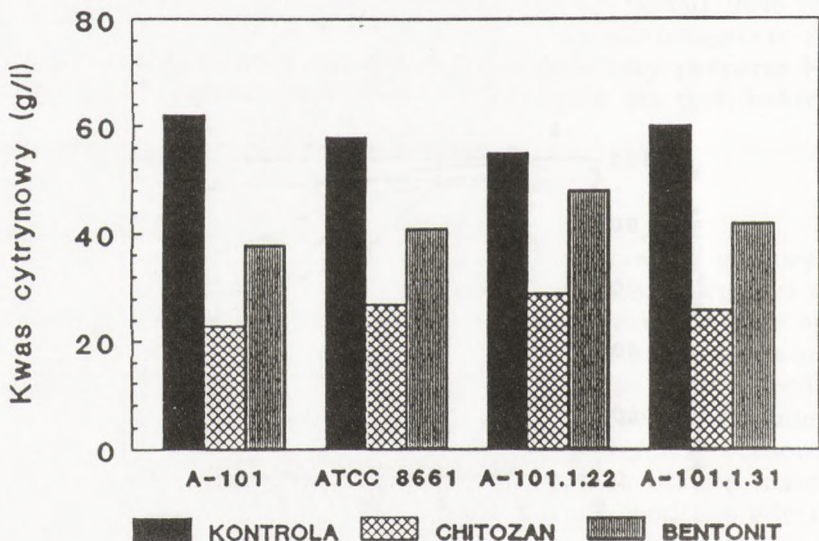
Rys. 3a,b. Wpływ pH podłoża produkcyjnego na flokulację szczepów *Y. lipolytica* w obecności chitozanu (a) i bentonitu (b). Oznaczenie szczepów tak jak na rys. 2a,b.

rodzicielskiego A-101, a także drugiego mutantu A-101.1.22 i wynosił pH 4 – 5 w przypadku chitozanu i pH 3 – 4 w przypadku bentonitu.

### 3.4. Biosynteza kwasu cytrynowego przez flokulowane bentonitem i chitozanem komórki *Y. lipolytica*

W 7-dobowych hodowlach wstrząsanych sprawdzono wpływ chitozanu i bentonitu na biosyntezę kwasu cytrynowego przez badane szczepy drożdży. Po uzyskaniu stacjonarnej fazy wzrostu do podłoży produkcyjnych wprowadzono flokulanty w dawkach zapewniających optymalny efekt flokulacji badanych szczepów drożdży. Wyniki przedstawiono na rys. 4. Obecność badanych flokulantów w brzeczce fermentacyjnej hamowała proces biosyntezy kwasu cytrynowego przez wszystkie szczepy *Y. lipolytica*. W hodowli wstrząsanej kłaczki drożdży były niestabilne i ulegały zniszczeniu. Po 24 godzinach hodowli w podłożu hodowlanym były tylko wolne komórki.

W porównaniu do hodowli z chitozanem bentonit w mniejszym stopniu wpływał na obniżenie produkcji kwasu cytrynowego. Ilość kwasu w hodowlach zawierających bentonit była na poziomie 37,2 – 47,6 g/l. W hodowlach zawierających chitozan ilość kwasu cytrynowego kształtowała się na poziomie 22,0 – 28,6 g/l, podczas gdy w hodowlach bez flokulantów drożdże *Y. lipolytica* produkowały 55 – 62 g/l kwasu. Niekorzystne oddziaływanie chitozanu obserwowano także przy pułapkowaniu *Y. lipolytica* w modyfikowanych chitozanem żelach alginianowych (13). Drożdże pułapkowane tylko w alginianie wapnia, wykazywały wyższą dynamikę produkcji kwasu cytrynowego (14).



Rys. 4. Wpływ obecności chitozanu i bentonitu na produkcję kwasu cytrynowego przez szczepy *Y. lipolytica* w 7-dobowej hodowli wstrząsanej.



W literaturze można znaleźć przykłady dobrej aktywności flokulowanych sztucznie mikroorganizmów. Ghommidh i Bu'Lock (5) uzyskali 8-krotnie wyższą produktywność etanolu w hodowli ze szczepem *Z. mobilis* ZN-3, którego flokulację wywołano kompleksem syntetycznych polielektrolitów zawierających chitozan. Także aktywność kwasotwórcza sztucznie flokulowanego szczepu *Aspergillus terreus* była porównywalna z aktywnością wolnych komórek (10).

W reaktorze z mieszadłem mechanicznym badano kinetykę procesu biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Y. lipolytica* A-101.1.31 w obecności chitozanu. Po osiągnięciu fazy stacjonarnej, wywołano klączkowanie drożdży dodatkiem flokulanta w ilości 20 mg/g biomasy. Podstawowe parametry kinetyczne procesu oraz wydajności były zdecydowanie niższe w porównaniu do hodowli bez chitozanu (tab. 1). Szybkość produkcji kwasu cytrynowego w obecności chitozanu była blisko 3-krotnie niższa i wynosiła  $Q_{KC}=0,34$  g/lh. W tym samym czasie w hodowli bez flokulanta drożdże *Y. lipolytica* A-101.1.31 nagromadziły 64,6 g/l kwasu cytrynowego z szybkością  $Q_{KC}=0,96$  g/lh i wydajnością całkowitą  $Y_C=0,73$  g/g.

TABELA 1

PARAMETRY KINETYCZNE I WSKAŹNIKI WYDAJNOŚCI W 4-DOBOWEJ HODOWLI STACJONARNEJ  
*Y. LIPOLYTICA* A-101.1.31 W BIOREAKTORZE

		Chitozan (mg/l)	
		300,0	0,0
kwas cytrynowy KC	(g/l)	32,3	64,6
produktywność kwasu cytrynowego $Q_{KC}$	(g/lh)	0,34	0,96
wydajność produktu $Y_{p/s}$	(g/g)	0,63	0,85
wydajność całkowita $Y_C$	(g/g)	0,54	0,73

Podobnie jak w hodowli wstrząsanej, w reaktorze z mieszadłem mechanicznym następował rozpad klączków, co świadczy o niestabilności takich agregatów w warunkach intensywnego mieszania. Umiarkowane mieszanie w bioreaktorze jest korzystne w procesie agregacji. Ułatwia zderzanie pojedynczych komórek, co w rezultacie zwiększa efektywność procesu flokulacji (4,17).

Zastosowanie reaktora fluidyzacyjnego lub typu *air-lift* oraz użycie innych związków flokulujących może przyczynić się do utrzymania form klączkujących oraz poprawy efektywności procesu biosyntezy kwasu cytrynowego przez flokulowane sztucznie drożdże *Y. lipolytica*, co będzie przedmiotem dalszych badań.

## Literatura

1. Amory D. E., Rouxhet P. G., Dufour J. P., (1988), *J. Institute of Brewing*, 94, 79-84.
2. Baratti J., Varma R., Bu'Lock J. D., (1986), *Biotechnol. Lett.*, 3, 175-180.
3. Casey M., Maeda Y., Fazeli A., (1977), *J. Ferment. Technol.*, 2, 174-180.
4. Esser K., Kues U., (1983), *Process Biochem.*, 6, 21-23.
5. Ghommidh C., Bu'Lock J. D., (1988), *Biotechnol. Tech.*, 4, 249-252.
6. Hughes J., Ramsden D. K., Symes K. C., Williams P. J., (1990), *Biotechnol. Tech.*, 4, 233-236.
7. Hughes J., Ramsden D. K., Symes K. C., (1990), *Biotechnol. Tech.*, 1, 55-60.
8. Kazuo K., Motomitsu H., (1990), *J. Ferment. Bioeng.*, 4, 224.
9. Kida K., Morimura S., Kume K., Suruga K., Sonoda Y., (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 5, 340-344.
10. Kokufuta E., Suzuki S., Nakamura I., (1988), *J. Ferment. Technol.*, 4, 433-439.
11. Lee K. Y., Baerwald G., (1991), *Biotechnol. Lett.*, 8, 595-598.
12. Lima N., Teixeira J. A., Mota M., (1992), *Bioprocess Eng.*, 7, 343-348.
13. Rymowicz W., Wojtatowicz M., Robak M., Jurgielewicz W., (1993), *Acta Microbiol. Polon.*, 42, 163-170.
14. Rymowicz W., Kautola H., Wojtatowicz W., Linko Y-Y., Linko P., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 1-4.
15. Sousa M. L., Teixeira J. A., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 751-754.
16. Stern J., (1957), *Methods Enzymol.*, 3, 425-431.
17. Straver M. H., Kijne J. W., Smit G., (1993), *Trends Biotechnol.*, 11, 228-232.
18. Weir S., Ramsden D. K., Hughes J., Le Thomas F., (1993), *Biotechnol. Tech.*, 7, 199-204.

### An attempt to use artificially flocculated *Yarrowia lipolytica* cells for citric acid production

#### Summary

Strains of *Y. lipolytica* were flocculated in the presence of two additives either bentonite or chitosan. The effects of the flocculant doses and the pH on the yeast flocculation were studied. Stability of cell flocs and their capability to citric acid production was examined in shaker flask and stirred bioreactor cultures. The optimal flocculant doses corresponding to the maximal reduction of turbidity of cell suspensions (%RT) in the production medium were in the range of 10 - 110 mg chitosan/g biomass and 30-80 mg bentonite/g biomass. Flocculated *Y. lipolytica* produced less citric acid and the volumetric citric acid productivity was lower as compared to free cell cultures.

#### key words:

*Yarrowia lipolytica*, flocculation, bentonite, chitosan, citric acid production.

#### Adres do korespondencji:

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