

MAŁGORZATA ŁASIK, MAŁGORZATA GUMIENNA, JACEK NOWAK

Institut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OCENA DYNAMIKI I WYDAJNOŚCI PROCESU PRODUKCJI KWASU OCTOWEGO Z GLUKOZY Z UŻYCIEM DROŹDŹY *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*

Streszczenie. Celem prezentowanej pracy była ocena wzrostu oraz metabolizmu trzech szczepów drożdży *Brettanomyces bruxellensis* podczas hodowli prowadzonych w bioreaktorze z zastosowaniem mieszania (250 rpm) i napowietrzania (0,7 vvm), w temperaturze 30°C, bez regulacji pH oraz z regulacją na poziomie 4,0±0,2. Najsilniejsze stężenia kwasu octowego, sięgające 10,9-11,6 g/dm³, odnotowano w wyniku hodowli z regulacją pH. Brak regulacji powodował zmniejszenie wartości pH do 2,5-3,0, co istotnie zahamowało rozwój drożdży, zmniejszając ich żywotność o 75%. Stężenie wytworzonego kwasu octowego było w przypadku tych hodowli również istotnie zmniejszone i mieściło się w zakresie 6,63-7,55 g/dm³.

Słowa kluczowe: *Brettanomyces bruxellensis*, kwas octowy, bioreaktor

Wstęp

Drożdże rodzaju *Brettanomyces* należą do mikroflory winogron i zostały poznane jako jedno ze szczególnych zagrożeń mikrobiologicznych win gronowych. Poprzez produkcję niekorzystnych związków zapachowych, odpowiedzialnych za aromaty m.in.: wędzonki, stajni, potu, plastrów opatrunkowych czy myszy, bezpośrednio przyczyniają się do chorób i wad zakażonych win. Należy jednak zaznaczyć, iż drożdże *Brettanomyces* są zdolne także do syntezy całej gamy estrów przyczyniających się z kolei do powstawania przyjemnych aromatów, takich jak: kwiatowy, owocowy, świeżego chleba, piwa czy szynki. *Brettanomyces* świetnie rozwijają się w środowisku o małej wartości pH w obecności choćby niewielkich ilości cukru oraz dużej ilości polifenoli. Prawdopodobnie dlatego częściej spotyka się je w winach czerwonych niż białych. Są to organizmy naturalnie bytujące na winoroślach, ale ze względu na produkcję obcych, niekorzystnych zapachów są niepożądane w procesie winifikacji, dlatego też nie zalicza się

ich do drożdży szlachetnych i przyjęto nazywać je drożdżami *non-Saccharomycetaceae* (LOUREIRO i MALFEITO-FERREIRA 2003, RENOUF i LONVAUD-FUNEL 2007, SUAREZ i IN. 2007).

Analiza metabolizmu drożdży *Brettanomyces* wskazuje również na ich zdolność biosyntezy zwiększonych ilości kwasu octowego. Małe wymagania żywieniowe tych drożdży, zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla oraz bezpośredniej biokonwersji glukozy do kwasu octowego z pominięciem fermentacji alkoholowej to cechy, dzięki którym *Brettanomyces* mają szansę stać się mikroorganizmami alternatywnymi dla bakterii *Acetobacter* w procesie produkcji kwasu octowego. Zróżnicowana wydajność procesu biosyntezy kwasu octowego jest ściśle uzależniona od specyfiki szczepu drożdży, warunków hodowli oraz rodzaju zastosowanego źródła węgla (AGUILAR USCANGA i IN. 2003, AGUILAR USCANGA i ESCUDERO ABARCA 2007, CASTRO-MARTINEZ i IN. 2005, CIANI i IN. 2003, FREER 2002, FREER i IN. 2003, GUADALUPE AGUILAR USCANGA i IN. 2000).

Celem prezentowanej pracy była ocena wzrostu oraz metabolizmu trzech szczepów drożdży *B. bruxellensis* podczas hodowli prowadzonych w warunkach intensywnego napowietrzania środowiska z regulacją oraz bez regulacji pH.

Materiały i metody

Mikroorganizmy i podłoża hodowlane

Do badań wykorzystano trzy szczepy drożdży *B. bruxellensis*: CE 116, CE 120 oraz CE 254 (Cornell Enology Strain Collection, NYSAES, NY, USA). Drożdże przechowywano i namnażano na podłożu YM (Difco) o składzie (g/dm³): glukoza (10), pepton małosolny (5), ekstrakt drożdżowy (3), ekstrakt słodowy (3). Proces biosyntezy kwasu octowego prowadzono z wykorzystaniem podłoża o składzie (g/dm³): glukoza (50), KH₂PO₄ (5), (NH₄)₂HPO₄ (2), ekstrakt drożdżowy (1), MgSO₄·7H₂O (0,4), pH 4,0 (AGUILAR USCANGA i IN. 2003).

Warunki hodowli

Hodowle prowadzono w bioreaktorze typu STR (ang. *stirred tank reactor*) z zastosowaniem intensywnego mieszania (250 obr/min) i napowietrzania podłoża (0,7 vvm), w temperaturze 30°C, z regulacją pH na poziomie 4,0±0,02 oraz bez regulacji. Inokulum stanowiła 48-godzinna hodowla szczepu *Brettanomyces bruxellensis* w ilości 5% (v/v).

Metody analityczne

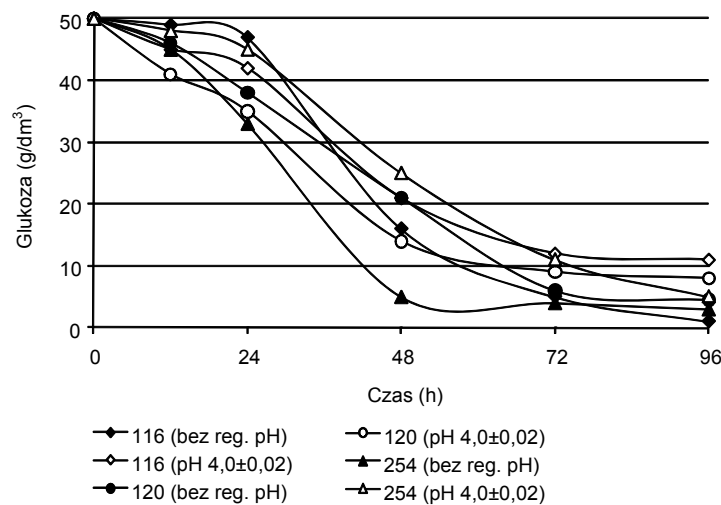
Liczbę oraz żywotność komórek drożdży oceniano mikroskopowo za pomocą komory Thoma oraz z zastosowaniem barwienia błękitem metylenowym. pH mierzono, korzystając z elektrody kombinowanej (INGLÖD). Dzięki systemowi sterującemu bioreaktora w hodowlach z regulacją pH parametr ten był utrzymywany na stałym poziomie 4,00 z dokładnością ±0,02 drogą automatycznego dozowania 1 M NaOH.

Zmiany stężenia glukozy oraz kwasu octowego oceniano, stosując wysokosprawną chromatografię cieczową. Płyny pochodzące filtrowano przez mikrofiltr 0,45 μm i tak przygotowane próby nastrzykiwano w objętości 20 μl na kolumnę Aminex HPX-87H (BIO-RAD) połączoną z detektorem RI. Fazę ruchomą stanowił roztwór 5 mM H_2SO_4 . Czas analizy wynosił 30 min, a temperatura – 30°C.

Wyniki

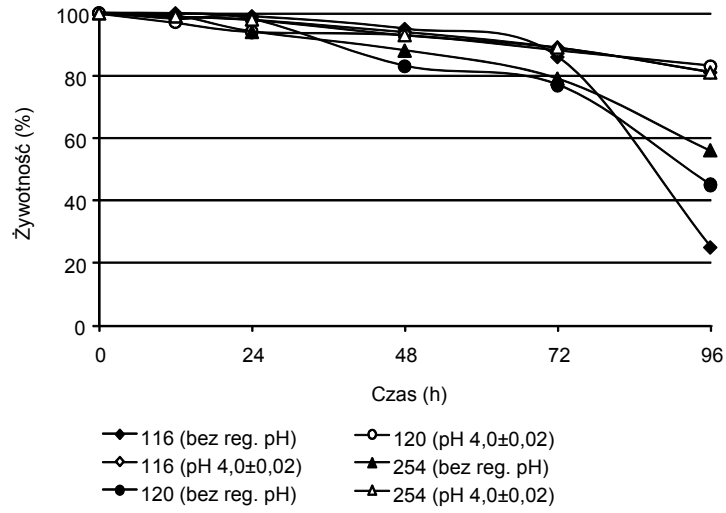
Analiza dynamiki wykorzystania glukozy podczas hodowli w warunkach intensywnego mieszania i napowietrzania podłoża wykazała największą aktywność metaboliczną drożdży *B. bruxellensis* pomiędzy 24. a 72. godziną procesu. Po trzech dniach hodowli ilość glukozy zmniejszyła się mniej więcej o 80% i wynosiła – w zależności od zastosowanego szczepu oraz wariantu hodowli – około 5-12 g/dm^3 (rys. 1). W tym okresie obserwowano również największą żywotność mikroorganizmów. W 72. godzinie procesu żywe komórki stanowiły 77-89% populacji (rys. 2). Następnie aktywność i żywotność drożdży istotnie zmniejszyły się. Było to najprawdopodobniej związane ze zwiększeniem kwasowości środowiska na skutek zwiększania stężenia syntetyzowanego kwasu octowego. W hodowlach, w których nie zastosowano regulacji pH, wartość tego parametru zmniejszyła się istotnie już po 48 h hodowli, wynosząc – w zależności od badanego szczepu – od 2,45 do 2,94 (rys. 3) i na tym poziomie pH utrzymywało się do końca procesu bez statystycznie istotnych zmian.

Podczas hodowli trzech szczepów *B. bruxellensis* przeprowadzono analizę dynamiki biosyntezy kwasu octowego z glukozy. Największą dynamikę procesu biokonwersji



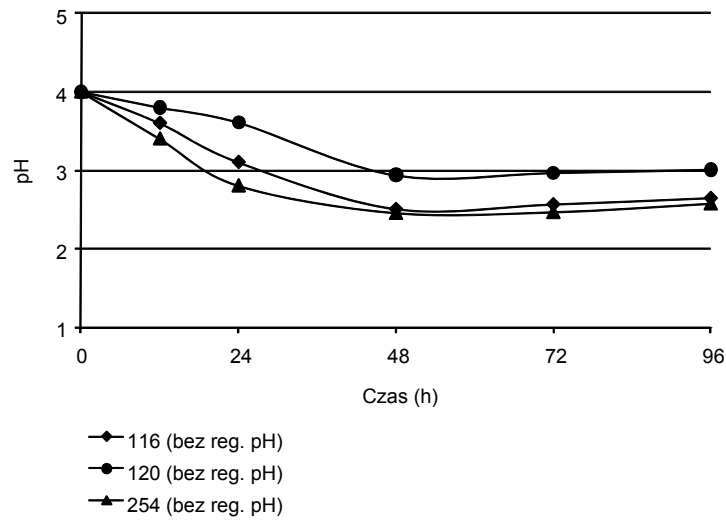
Rys. 1. Zmiany stężenia glukozy podczas tlenowych hodowli drożdży *Brettanomyces bruxellensis*

Fig. 1. Changes of glucose concentration during aerobic fermentations of *Brettanomyces bruxellensis*



Rys. 2. Zmiany żywotności drożdży *Brettanomyces bruxellensis* podczas procesu biosyntezy kwasu octowego

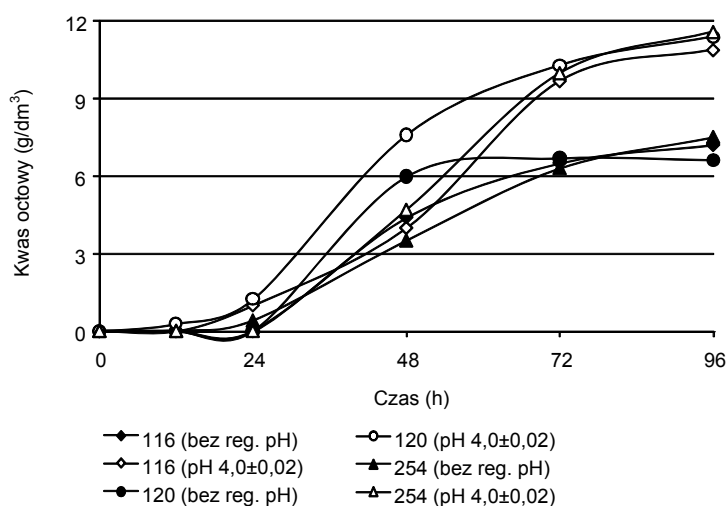
Fig. 2. Changes of *Brettanomyces bruxellensis* yeast viability during acetic acid biosynthesis process



Rys. 3. Zmiany pH środowiska hodowlanego podczas procesu biosyntezy kwasu octowego przez drożdże *Brettanomyces bruxellensis*

Fig. 3. Changes of pH during acetic acid biosynthesis process by *Brettanomyces bruxellensis* yeast

glukozy do kwasu octowego obserwowano pomiędzy 24. a 72. godziną hodowli bez względu na rodzaj testowanego szczepu oraz wariant regulacji pH (rys. 4). Tempo wykorzystania glukozy z podłoża było skorelowane z dynamiką wytwarzania kwasu octowego przez zastosowane drożdże. Największe stężenia kwasu octowego odnotowano podczas hodowli z regulacją pH. W wyniku 96-godzinnych hodowli, podczas których pH było utrzymywane na poziomie $4,0 \pm 0,02$, uzyskano stężenie kwasu octowego w zakresie od 10,9 do 11,6 g/dm³ (rys. 4). Stwierdzono, że regulacja pH podczas hodowli istotnie ($p \leq 0,05$) wpływała na wydajność procesu biokonwersji glukozy do kwasu octowego. Brak regulacji przyczynił się do zmniejszenia wartości pH środowiska hodowlanego, co istotnie zahamowało rozwój drożdży, osłabiając ich żywotność nawet o 75% (rys. 2, 3). Stężenie wytworzonego kwasu octowego było w przypadku tych hodowli również istotnie zmniejszone i po 96 h hodowli mieściło się w zakresie 6,63-7,55 g/dm³.



Rys. 4. Zmiany stężenia kwasu octowego podczas tlenowych hodowli drożdży *Brettanomyces bruxellensis*
 Fig. 4. Changes of acetic acid concentration during aerobic fermentations of *Brettanomyces bruxellensis*

Największą wydajność procesu biosyntezy kwasu octowego odnotowywano począwszy od 72 godziny hodowli prowadzonych sposobem z regulacją pH z zastosowaniem wszystkich trzech testowanych szczepów. Produktywność hodowli wynosiła dla tych wariantów doświadczenia od 0,26 do 0,29 g kwasu octowego z 1 g wykorzystanej glukozy (tab. 1). Prowadzenie hodowli bez regulacji pH spowodowało zmniejszenie średnio o połowę wydajności procesu, a ilość kwasu octowego syntetyzowanego z 1 g glukozy wynosiła od 0,14 do 0,18 g.

Tabela 1. Wydajność procesu biokonwersji glukozy do kwasu octowego podczas tlenowych fermentacji drożdży *Brettanomyces bruxellensis* (g kwasu octowego z 1 g glukozy)Table 1. Yield of bioconversion of glucose to acetic acid during aerobic fermentation of *Brettanomyces bruxellensis* yeast (g of acetic acid from 1 g of glucose)

Czas (h)	<i>B. bruxellensis</i> CE116		<i>B. bruxellensis</i> CE120		<i>B. bruxellensis</i> CE254	
	bez regulacji pH	z regulacją pH	bez regulacji pH	z regulacją pH	bez regulacji pH	z regulacją pH
24	0	0,03±0,01	0	0,08±0,01	0	0
48	0,13±0,01	0,14±0,01	0,21±0,01	0,21±0,03	0,08±0,01	0,19±0,01
72	0,16±0,01	0,26±0,03	0,14±0,01	0,26±0,02	0,14±0,01	0,29±0,02
96	0,18±0,01	0,27±0,02	0,14±0,01	0,28±0,03	0,16±0,01	0,28±0,02

Dyskusja

Tradycyjna produkcja kwasu octowego opiera się na technologii wymagającej zastosowania dwóch kluczowych etapów: produkcji spirytusu w drodze beztlenowej fermentacji alkoholowej z wykorzystaniem drożdży gorzelnicznych, a następnie syntezy kwasu octowego w wyniku utlenienia etanolu z użyciem bakterii z rodzaju *Acetobacter*. Proces wymaga relatywnie wysokich nakładów energetycznych ze względu na konieczność intensywnego napowietrzania podłoża, a mikroorganizmy charakteryzują się dużymi wymaganiami odżywczymi. Alternatywą dla tradycyjnej technologii produkcji octu może być metoda bezpośredniej biokonwersji glukozy do kwasu octowego. Zdolności przeprowadzania takich reakcji zauważono u termofilnych bakterii *Clostridium thermoaceticum* wyizolowanych z końskich odchodów już w połowie XX wieku (POSTON i IN. 1966). Sugerowano, że mikroorganizmy te na drodze szlaku metabolicznego Embdena-Meyerhofa fermentują 1 mol glukozy do 3 mol kwasu octowego. Zatem teoretycznie z 1 g glukozy można otrzymać 1 g kwasu octowego. Wydaje się więc, że wydajność procesu jest dużo korzystniejsza w porównaniu z tradycyjną reakcją konwersji najpierw glukozy do etanolu, a następnie etanolu do kwasu octowego. W wyniku fermentacji glukozy do etanolu strata jednego atomu węgla wydzielanego w formie CO₂ powoduje, że ostatecznie maksymalna teoretyczna wydajność całego procesu wynosi 2 mol kwasu octowego z 1 mol glukozy, czyli 0,67 g kwasu octowego z 1 g glukozy (DANNER i BRAUN 1999). Relatywnie mała wydajność procesu, wrażliwość na zwiększone stężenie kwasu octowego oraz duże wymagania odżywcze bakterii *Cl. thermoaceticum* zdecydowały jednak, że proces okazał się nieopłacalny na większą skalę. Podobne właściwości bezpośredniej biokonwersji glukozy do kwasu octowego obserwowano podczas tlenowej fermentacji drożdży rodzaju *Brettanomyces* (AGUILAR USCANGA i IN. 2003, AGUILAR USCANGA i ESCUDERO ABARCA 2007, CASTRO-MARTINEZ i IN. 2005, CIANI i IN. 2003, FREER 2002, FREER i IN. 2003). Poza tym możliwości wykorzystania różnorodnych źródeł węgla, takich jak glukoza, fruktoza, melasa, sok z buraków cukrowych i trzciny cukrowej czy etanol, przy jednocześnie małych wymaganiach odżywczych tych drożdży znacznie obniżają koszty produkcji kwasu

octowego w porównaniu z dwuetapową technologią z wykorzystaniem bakterii *Acetobacter*. *Brettanomyces* wykazują aktywność metaboliczną zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Jest to tzw. efekt Custersa (odwrotny do efektu Pasteura). Polega na zahamowaniu fermentacji w wyniku wystąpienia warunków beztlenowych. Drożdże *Brettanomyces* fermentują glukozę do alkoholu etylowego i kwasu octowego w warunkach tlenowych. W wyniku zmian warunków na beztlenowe fermentacja zostaje zahamowana. Reakcje można jednak przywrócić poprzez ponowne dostarczenie tlenu (CONTERNO i IN. 2006, RODRIGUES i IN. 2006).

Problemem pozostaje jednak nadal mniejsza w porównaniu z możliwościami *Acetobacter* wydajność produkcji kwasu octowego uzyskana w wyniku działania *Brettanomyces*. Dotychczasowe doniesienia wskazują na bardzo zróżnicowaną wydajność procesu, w zakresie od 8 aż do 65 g kwasu octowego z 1 dm³, w zależności od specyfiki szczepu, warunków hodowli oraz rodzaju zastosowanego źródła węgla (AGUILAR USCANGA i IN. 2003, AGUILAR USCANGA i ESCUDERO ABARCA 2007, CASTRO-MARTINEZ i IN. 2005, FREER 2002, FREER i IN. 2003). Otrzymane w warunkach prezentowanych doświadczeń ilości kwasu octowego, wynoszące od 6,6 do 11,6 g/dm³, są porównywalne z rezultatami badań innych grup badawczych. Podczas hodowli prowadzonych w podobnych warunkach uzyskiwane stężenia kwasu octowego sięgały od 9 g/dm³ (AGUILAR USCANGA i IN. 2003) do 24 g/dm³ (FREER 2002). Trzeba jednak podkreślić, że wydajność procesu biosyntezy kwasu octowego jest ściśle związana ze specyfiką szczepu. FREER (2002) podaje, że 26 szczepów z 60 badanych w ogóle nie było zdolnych do produkcji kwasu octowego na określonym poziomie detekcji.

Stwierdzono także, że istotny wpływ na efektywność biosyntezy kwasu octowego przez drożdże *Brettanomyces* ma zawartość glukozy w podłożu. AGUILAR USCANGA i ESCUDERO ABARCA (2007) wykazali, że optymalne stężenie tego źródła węgla dla maksymalizacji produkcji kwasu octowego (13 g/dm³) wynosiło 50-60 g/dm³, a w pracy opublikowanej przez FREER i IN. (2003) – 100 g/dm³. W takich warunkach otrzymano 31,6 g/dm³ kwasu octowego, ale w podłożu pozostała niewykorzystana glukoza. Ten sam zespół naukowców wykazał ponadto, że wśród 60 testowanych drożdży rodzaju *Brettanomyces* 28 było zdolnych do wytwarzania kwasu octowego w ilościach przekraczających 5 g/dm³ i tylko pięć było takich, które biosyntetyzowały go w ilościach większych od 29 g/dm³. Można więc stwierdzić, że wydajności uzyskane w ramach prezentowanych badań znajdują potwierdzenie w wynikach badań innych zespołów. Rozbieżności wynikają ze specyfiki wykorzystywanych szczepów oraz warunków hodowli i wymagają dalszych badań nad optymalizacją procesu w celu zwiększenia jego dynamiki i wydajności.

Podsumowanie

Stwierdzono zdolność testowanych szczepów drożdży *B. bruxellensis* do biosyntezy kwasu octowego w drodze fermentacji tlenowej bezpośrednio z glukozy. Stwierdzono, że regulacja pH podczas hodowli istotnie ($p \leq 0,05$) wpływała na wydajność procesu biokonwersji glukozy do kwasu octowego. Największą wydajność procesu odnotowywano po 72 h hodowli z regulacją pH (0,26-0,29 g kwasu octowego z 1 g glukozy). Prowadzenie hodowli bez regulacji pH spowodowało niekorzystne zmniejszenie warto-

ści tego parametru i w konsekwencji 75-procentową redukcję żywotności drożdży, co z kolei skutkowało zmniejszeniem średnio o połowę wydajności procesu (0,14-0,18 g kwasu octowego z 1 g glukozy).

Literatura

- AGUILAR USCANGA M.G., DELIA M.-L., STREHAIANO P., 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 157-162.
- AGUILAR USCANGA M.G., ESCUDERO ABARCA B.I., 2007. Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *B. bruxellensis* in batch culture. J. Food Process Eng. 30: 13-23.
- CASTRO-MARTINEZ C., ESCUDERO-ABARCA B.I., GOMEZ RODRIGUEZ J., HAYWARD-JONES P.M., AGUILAR-USCANGA M.G., 2005. Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. J. Food Process Eng. 28: 133-143.
- CIANI M., MACCARELLI F., FATICHENTI F., 2003. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 419-422.
- CONTERNO L., LUCY JOSEPH C.M., ARVIK T.J., HENICK-KLING T., BISSON L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. Am. J. Enol. Vitic. 57, 2: 139-147.
- DANNER H., BRAUN R., 1999. Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. Chem. Soc. Rev. 28: 395-404.
- FREER S.N., 2002. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 271-275.
- FREER S.N., DIEN B., MATSUDA S., 2003. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 101-105.
- GUADALUPE AGUILAR USCANGA M., DELIA M.-L., STREHAIANO P., 2000. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. Can. J. Microbiol. 46: 1046-1050.
- LOUREIRO V., MALFEITO-FERREIRA M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86: 23-50.
- POSTON J.M., KURATOMI K., STADTMAN E.R., 1966. The conversion of carbon dioxide to acetate. J. Biol. Chem. 241, 18: 4209-4216.
- RENOUF V., LONVAUD-FUNEL A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. Microbiol. Res. 162, 2: 154-167.
- RODRIGUES F., LUDOVICO P., LEAO C., 2006. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. W: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Red. P. Gabor, C. Rosa. Springer, Berlin: 101-122.
- SUAREZ R., SUAREZ-LEPE J.A., MORATA A., CALDERON F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. Food Chem. 102: 10-21.

DYNAMICS AND YIELD OF BIOSYNTHESIS OF ACETIC ACID BY *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* YEAST FROM GLUCOSE

Summary. The yeast of the genus *Brettanomyces* is characterised by low nutritional requirements, ability for different carbon sources utilization, as well as direct bioconversion of glucose into acetic acid excluding the ethanol fermentation. Those properties depend on the specific character of the tested strain and culture conditions and make the *Brettanomyces* yeasts a potentially alternative to *Acetobacter* microorganism in the acetic acid production process. The aim of the performed experiments was to evaluate the growth and metabolism of three *B. bruxellensis* strains during aerobic treatment in bioreactor (mixing 250 rpm and aerating 0.7 vvm) at 30°C, with and without pH regulation (4.0±0.2). The highest acetic acid concentration ranged from 10.9 to 11.6 g/dm³ and was achieved during the process performed with pH regulation. No acidity regulation caused the decrease of pH up to 2.5-3.0, inhibited significantly the activity of *Brettanomyces* and reduced the yeast viability in 75%. The concentration of the synthesized acetic acid in this case was also significantly reduced and ranged from 6.63 to 7.55 g/dm³.

Key words: *Brettanomyces bruxellensis*, acetic acid, bioreactor

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Małgorzata Lasik, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland, e-mail: lasik@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

4.11.2009

Do cytowania – For citation:

Lasik M., Gumienna M., Nowak J., 2009. Ocena dynamiki i wydajności procesu produkcji kwasu octowego z glukozy z użyciem drożdży *Brettanomyces bruxellensis*. Nauka Przyr. Technol. 3, 4, #142.