

УДК 573.6.086.83.001.26

Оптимизация отъемно-доливного режима ферментации рекомбинантного дрожжевого продуцента янтарной кислоты *Yarrowia lipolytica* при низких значениях рН

© 2016 г. П.Ю.БОНДАРЕНКО*, А.С.ФЕДОРОВ, С.П.СИНЕОКИЙ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

*e-mail: bondarenkopavel86@gmail.com

Поступила в редакцию 17.11.2016

Исследована способность к биосинтезу янтарной кислоты рекомбинантным штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ У3753 в лабораторном ферментере при низких значениях рН. Проведено сравнение периодического и отъемно-доливного режимов культивирования данного штамма. Подобраны оптимальные условия для осуществления отъемно-доливного режима, которые обеспечивают накопление 55,3 г/л янтарной кислоты и максимальную продуктивность по этому соединению – 2,6 г/(л·ч) – при снижении рН культуральной жидкости до 3,65 в конце процесса биосинтеза.

Ключевые слова: биосинтез янтарной кислоты, низкое значение рН, отъемно-доливной режим, периодический режим, *Yarrowia lipolytica*.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-68-75

Янтарная кислота (ЯК), имеющая вид бесцветных кристаллов и растворимая в воде, этаноле и ацетоне, была впервые обнаружена в 1550 г. в янтаре. Соединение характеризуется широким спектром промышленного применения, в частности при получении промежуточных продуктов для производства лаков и ароматизаторов, а также вкусовых добавок, бактериостатических и нейтрализующих агентов в пищевой промышленности. Кроме того, ЯК имеет спрос у производителей защитных покрытий, поверхностно-активных веществ, красителей, моющих средств, растворителей, биоразлагаемого пластика, а также веществ, стимулирующих рост животных и растений. За счет линейной насыщенной структуры при наличии двух карбоксильных групп ЯК служит источником для получения множества химических соединений, таких как 1,4-бутандиол, γ -бутиролактон, тетрагидрофуран, адипиновая кислота, *n*-метилпирролидон и различные алифатические эфиры [1–4].

В связи с ухудшением экологической обстановки ожидается значительное увеличение спроса на ЯК, так как путем ее термической поли-

конденсации с 1,3-пропандиолом можно, например, производить новый биоразлагаемый полимер поли-(1,3-пропиленсукцинат) [5]. Из ЯК также может быть получен 1,4-бутандиол, который в дальнейшем используют, в частности, для производства биоразлагаемого полибутиленсукцината [6–8].

Янтарная кислота может быть получена различными химическими способами, которые в основном включают окисление парафинов или каталитическое восстановление малеиновой кислоты или малеинового ангидрида. В процессе каталитического окисления парафинов образуется смесь различных дикарбоновых кислот, из которой ЯК затем извлекают и очищают перегонкой [9–10]. Уже в 1929 г. американская компания National Aniline & Chemical запустила промышленное производство ЯК путем электролитического восстановления малеинового ангидрида [11]. При получении ЯК химическим путем используют невозобновляемое сырье (нефть, природный газ) и энергоемкие технологии, требующие высоких температур и давлений. Кроме того, проблема утилизации отходов, а также постоянно растущие

Список сокращений: ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; КЖ – культуральная жидкость; ЯК – янтарная кислота.

цены на нефть заставляют искать другие пути для получения ЯК с использованием возобновляемого сырья [12].

В последнее время разработки в области производства ЯК были сосредоточены на использовании микроорганизмов, в частности, бактериальных продуцентов, ассимилирующих возобновляемое растительное сырье: *Propionibacterium* sp., *Escherichia coli*, *Pectinatus* sp., *Bacteroides* sp., *Ruminococcus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvans*, *Wolinella succinogenes*, *Lactobacillus* sp. и *Cytophaga succinicans* [13–16].

Следует отметить, что процесс получения ЯК с использованием бактерий протекает в анаэробных условиях с поглощением углекислого газа, и это можно рассматривать как преимущество с точки зрения экологии. С другой стороны, использование бактерий возможно только при нейтральных значениях pH, в связи с чем необходимо применять щелочь для нейтрализации продукта – ЯК. В результате образуются соли янтарной кислоты, и для регенерации ЯК приходится использовать сильную минеральную кислоту, что влечет за собой удорожание конечного продукта и образование дополнительных отходов. Одним из возможных способов очистки ЯК является использование ионообменных смол. Однако подобные методы выделения продукта легко реализуемы в небольших лабораторных установках, но, как правило, неприменимы в промышленных объемах [17].

В последнее время активно ведутся работы по получению дрожжевых продуцентов ЯК, способных синтезировать ее при низких значениях pH. Наилучшими на сегодняшний день являются результаты с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* SUC-632: накопление ЯК – 80,1 г/л; выход ЯК – 0,512 г/г глюкозы при конечном pH 3,0. При этом культивирование проходило с возвратом биомассы (каждые 48 ч) и с использованием мела в качестве буферного агента. Такой режим обеспечивал продуктивность – 1,67 г/(л·ч) [18]. Наиболее высокие результаты по накоплению ЯК (160,2 г/л) дрожжами *Yarrowia lipolytica* RGC01003 были получены при культивировании в отъемно-доливном режиме при pH 6,0 с использованием 5 М NaOH в качестве титрующего агента и глицерина как источника углерода. При этом выход ЯК составлял 0,4 г/г глицерина, а продуктивность – 0,4 г/(л·ч) [19].

Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y3753, полученный в Государственном научно-исследовательском институте генетики и се-

лекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика), при культивировании в пробирках на богатой среде, содержащей дрожжевой экстракт и пептон, способен накапливать 60,0 г/л ЯК за 96 ч. При этом выход продукта составляет 0,57 г/г глюкозы при конечном pH 3,0 [20].

Целью настоящего исследования было проведение оптимизации процесса биосинтеза ЯК штаммом *Yarrowia lipolytica* (ВКПМ Y3753) в лабораторном ферментере путем выбора эффективного режима культивирования и подбора его параметров.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y3753, полученный из Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (БРЦ ВКПМ, ГосНИИгенетика).

Культуру поддерживали при 4°C на агаризованной среде YPG с мелом следующего состава, г/л: дрожжевой экстракт (Springer, Франция) – 10; пептон дрожжевой (Springer) – 10; глицерин («Химмед», Россия) – 20; агар (BD, Франция) – 20; Ca₂CO₃ («Химмед») – 10. Пересев на свежую среду проводили один раз в месяц.

Посевной материал для ферментеров выращивали сначала в пробирках в течение 48 ч при температуре 30°C и 250 об/мин в 10 мл минеральной среды следующего состава, г/л: (NH₄)₂HPO₄ – 7,3; NH₄H₂PO₄ – 10,89; KCl – 1,0; NaCl – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,65; CaCl₂ – 0,111; лимонная кислота (все производства «Химмед») – 1,8; глюкоза (Roquette, Франция) – 30; L-лейцин («Диам», Россия) – 5,0; раствор микроэлементов – 4,6 мл (состав раствора микроэлементов, г/л: CuSO₄·5H₂O – 6,0; KI – 0,088; MnSO₄·5H₂O – 3,0; H₃BO₃ – 0,2; CoCl₂·6H₂O – 0,955; ZnSO₄·7H₂O – 42,0; FeSO₄·7H₂O – 65,0 (все производства «Химмед»); H₂SO₄конц. («Сигма Тек», Россия) – 5,0 мл/л; биотин (AppliChem, Германия) – 0,2 мг/л; тиамин (AppliChem) – 1,0 мг/л.

КЖ из пробирок использовали в качестве посевного материала для колб в количестве 10% (об.). Выращивание в колбах проводили в течение 24 ч в тех же условиях и в 100 мл минеральной среды того же состава, что и в пробирках.

Аппаратурное культивирование проводили в ферментерах Marubishi (Япония) с интегрированной системой программного управления MERABIT (Keklab, Россия) объемом 1,0 л (рабочий объем 600 мл). Аэрацию осуществляли подачей воздуха (600 мл/мин) при скорости вращения

мешалки 700 об/мин. Концентрацию кислорода в среде контролировали датчиком Mettler Toledo InPro6800 (Швейцария). Культивирование осуществляли при температуре 30°C. Среда имела тот же состав, что и для выращивания посевного материала, но начальная концентрация глюкозы была индивидуальна для каждого режима. Значение pH среды (начальное значение указано для каждого эксперимента в тексте) контролировали датчиком Mettler Toledo InPro3030 (Швейцария), при необходимости повышая это значение добавлением 25%-ного раствора NH₄OH.

Культивирование в периодическом режиме проводили в течение 68 ч с начальной концентрацией глюкозы 150 г/л и начальным значением pH 7,28. С 49-го часа pH поддерживали на уровне 3,6 путем добавления 25%-ного раствора NH₄OH. Посевной материал, выращенный в колбах, вносили в количестве 30% (об.).

Оптимизацию отъемно-доливного режима проводили на основе трех различных алгоритмов, отличающихся длительностью цикла «отъем-долив» – 48 ч, 24 и 8 ч. При периодичности в 48 ч и 24 ч в конце цикла отбирали 70,0% (об.) КЖ, при периодичности в 8 ч – 33,3% (об.). После слива в ферментеры подавали свежую питательную среду того же состава в указанном выше объеме, но с такой концентрацией глюкозы, чтобы к концу цикла культивирования она полностью ассимилировалась. Начальное значение pH среды в ферментере при периодичности в 48 ч и 24 ч в каждом цикле повышали до значения 7,0. При периодичности в 8 ч начальное значение pH последовательно понижали в каждом новом цикле (в первом – 6,0, а в последних двух – 4,3). Конечный pH в каждом цикле снижался до минимального значения, при котором не наблюдалось ингибирование роста дрожжей. Процедуру отъема-долива повторяли до тех пор, пока не устанавливалось стационарное состояние полунепрерывного процесса при оптимальных значениях начальной концентрации глюкозы и pH КЖ, т.е. пока эти показатели не начинали воспроизводиться самостоятельно, что происходило в двух последних циклах каждого режима.

В процессе ферментации отбирали пробы КЖ, биомассу отделяли на микроцентрифуге Eppendorf MiniSpin (Германия) при 14100 г в течение 5 мин, дважды отмывали дистиллированной водой, а затем лиофильно высушивали перед взвешиванием. В супернатанте измеряли концентрацию глюкозы и ЯК.

Содержание глюкозы в супернатанте определяли спектрофотометрически глюкозооксидаз-

ным методом с помощью набора реагентов «Диаком Глюкоза» (ЗАО «Диаком–ВНЦМДЛ», Россия) согласно инструкции производителя.

Содержание ЯК и других органических кислот определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографа Alliance (модуль разделения Waters 2695; фотодиодный детектор Waters 2996, США) и колонки с обращенной фазой YMC-Triart C18 (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм, 12 нм, Dr. Maisch, Германия). Элюцию проводили водным раствором фосфорной кислоты (0,1%) при скорости 1 мл/мин. Пики регистрировали при длине волны 210 нм.

Удельную скорость роста культуры μ (ч⁻¹) рассчитывали по формуле:

$$\mu = \frac{\ln m_2 - \ln m_1}{t_2 - t_1},$$

где m_1 и m_2 – концентрация биомассы, г/л, в момент времени t_1 и t_2 , ч, соответственно.

Удельную скорость биосинтеза ЯК q_p (г ЯК/г биомассы·ч) рассчитывали по формуле:

$$q_p = \frac{P_2 - P_1}{\frac{m_2 + m_1}{2} \cdot (t_2 - t_1)},$$

где P_1 и P_2 – концентрация ЯК, г/л, в момент времени t_1 и t_2 , ч, соответственно.

Выход ЯК на единицу потребленного субстрата Y (г/г) рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{R}{S},$$

где R – общее количество кислоты в конце культивирования, г; S – количество потребленного субстрата (глюкозы) за период роста и биосинтеза, г.

Продуктивность ЯК (г кислоты/(л КЖ·ч)) рассчитывали по формуле:

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1},$$

Скорость разбавления D (ч⁻¹) для отъемно-доливных ферментаций рассчитывали по формуле:

$$D = \frac{V_{об}}{V_p T},$$

где $V_{об}$ – объем сливаемой КЖ/доливаемой свежей среды, л; V_p – рабочий объем ферментера, л; T – время проведения отъемно-доливной ферментации, ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для промышленного производства биотехнологического продукта кроме подходящего продуцента с необходимыми свойствами, выделенного из природных источников, селекционированного или полученного генно-инженерными методами, необходимо иметь информацию о множестве факторов, которые обуславливают себестоимость продукта. К таким факторам относятся стоимость сырья, продолжительность ферментации, срок эксплуатации оборудования, а также материальные и энергетические затраты на выделение продукта. Для того, чтобы оценить возможность снижения себестоимости, необходимо моделировать различные режимы и условия производства в лабораторных ферментерах, а также подбирать оптимальные параметры ферментации: скорость подачи питательной среды; интенсивность аэрации (в случае аэробного процесса), скорость вращения перемешивающего устройства, а также значения pH и максимальные концентрации продукта и основного источника углерода, при которых не происходит ингибирование культуры.

Правильную оценку эффективности биотехнологического производства можно проводить лишь на основе определения главных критериев (параметров), по которым можно сравнивать различные процессы ферментации. В настоящее время принято использовать такие критерии, как концентрация продукта в КЖ (г/л), выход продукта (экономический коэффициент), определяемый как отношение количества полученного продукта к количеству потребленного субстрата (г/г, или %), и продуктивность процесса, характеризующаяся количеством продукта, получаемого на единицу рабочего объема биореактора в единицу времени (г/(л·ч)). Проводя сравнение данных критериев эффективности, можно подобрать режимы культивирования дрожжей в лабораторном ферментере, наиболее близкие к оптимальным с экономической точки зрения. Полученные результаты можно использовать при масштабировании процесса производства продукта от модельной к опытно-промышленной установке.

Ферментация в периодическом режиме

Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, является закрытой системой, в которой скорость роста биомассы стремится к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо

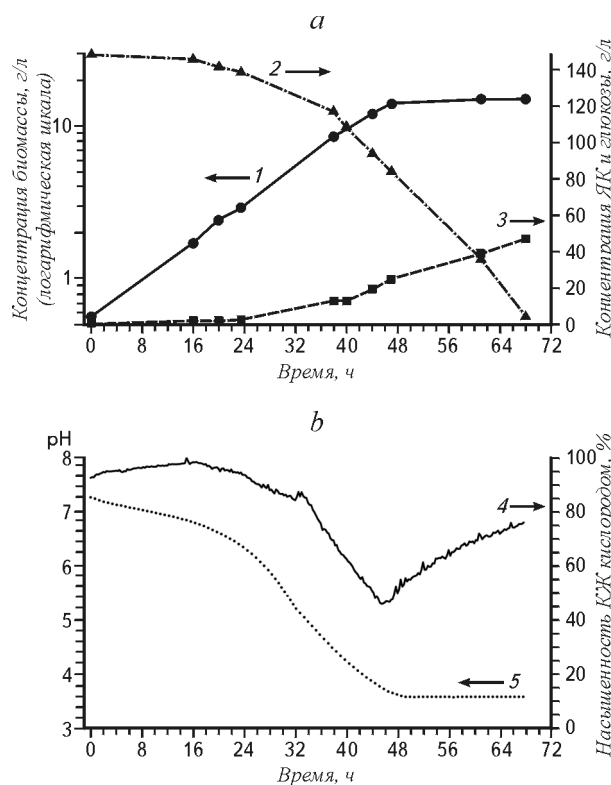


Рис. 1. Изменение параметров синтеза ЯК штаммом *Y. lipolytica* ВКПМ Y3753 при периодическом культивировании продуцента в ферментере. а – динамика накопления биомассы (1), содержания глюкозы (2) и содержания ЯК (3); б – динамика концентрации кислорода (4) и pH (5)

Fig. 1. Parameters of succinic acid batch synthesis in fermenter by *Y. lipolytica* VKPM Y3753. (a): (1), biomass accumulation (logarithmic scale); (2), glucose content; (3), succinic acid content. (b): (4), oxygen concentration; and (5), pH

из-за непереносимости продукта при его накоплении. Такие системы всегда находятся в неустойчивом состоянии [21]. Исследуя причины неустойчивого состояния, можно определить направление оптимизации режима культивирования штамма, продуцирующего, в частности, ЯК.

На рис. 1 представлена динамика концентрации биомассы, потребления глюкозы и накопления ЯК, а также содержания растворенного кислорода и pH среды при периодическом культивировании в ферментере штамма *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y3753. Первые 45 ч культура находилась в экспоненциальной фазе, при этом сохранялась максимальная удельная скорость роста (μ_{max}) $0,076 \text{ ч}^{-1}$ Затем наступала стационарная фаза, что отражалось на интенсивности дыхания культуры (см. рис.1, б); при этом в момент замедления роста концентрация глюкозы составляла 94 г/л, концентрация ЯК – около 25 г/л, а значе-

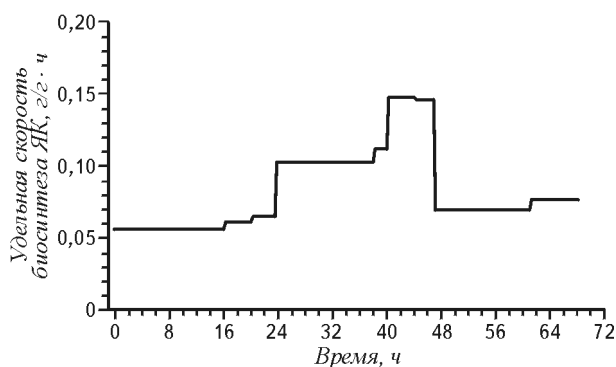


Рис. 2. Изменение удельной скорости биосинтеза ЯК штаммом *Y. lipolytica* VKPM Y3753 (средние значения в интервалах между соседними отборами проб)

Fig. 2. Specific rate of succinic acid biosynthesis by *Y. lipolytica* VKPM Y3753 strain (mean values between neighboring samplings)

ние pH опускалось до 3,8. Известно, что данный штамм при культивировании в пробирках на богатой питательной среде YPD способен накапливать 60 г/л ЯК за 96 ч [20]. На этом основании можно предположить, что ЯК не ингибирует рост продуцента при концентрации 25 г/л, и, вероятно, замедление накопления биомассы в ферментере связано с низким значением pH среды.

Биосинтез ЯК происходил на протяжении всего процесса культивирования в ферментере, причем максимальная удельная скорость биосинтеза q_{pmax} наблюдалась в период с 40-го по 47-й час и составляла 0,15 г/(г · ч) (рис. 2). К концу культивирования (68 ч) накопление ЯК составляло 47,1 г/л (см. рис.1, а). Средняя продуктивность за весь процесс была равна 0,69 г/(л·ч); выход продукта составил 0,32 г/г.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что для интенсификации процесса биосинтеза ЯК необходимо, чтобы культура как можно дольше находилась в экспоненциальной фазе роста при высокой концентрации биомассы, причем не следует продолжительное время выдерживать культуру при pH ниже 3,8.

Ферментация в отъемно-доливном режиме

С учетом полученных результатов культивирования в периодическом режиме было решено проводить исследования по культивированию в отъемно-доливном режиме. Последний позволяет не только постоянно обеспечивать культуру субстратом, но и разбавлять среду, повышая pH и давая культуре возможность вернуться на стадию максимального роста. Такой способ культивирования делает возможным ведение процесса в практически непрерывном режиме при периодическом удалении из ферментера продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут оказывать ингибирующее воздействие, обуслов-

ливая тем самым более высокую продуктивность данного процесса по сравнению с другими режимами.

Основной задачей этой части исследования было определение оптимального алгоритма культивирования (объем отбираемой КЖ и периодичность отъема-долива). При этом необходимо было подобрать такую концентрацию глюкозы в среде, чтобы она полностью расходовалась к концу периода, так как присутствие глюкозы может негативно повлиять на процесс выделения и очистки ЯК. Важно было также подобрать начальное значение pH, которое бы обеспечивало культуре максимальную скорость роста и установить по возможности наиболее низкое значение pH отбираемой КЖ.

При культивировании с периодичностью 48 ч и 24 ч скорость разбавления (D) составляла $0,015 \text{ ч}^{-1}$ и $0,03 \text{ ч}^{-1}$, соответственно. При использовании периодического режима ферментации было установлено, что максимальная удельная скорость роста культуры (μ_{max}) равна $0,076 \text{ ч}^{-1}$, что значительно выше скорости разбавления, характерной для отъемно-доливных режимов. Поэтому концентрация биомассы в конце каждого периода увеличивалась до тех пор, пока система не входила в стационарное состояние, подобное стационарному состоянию при хемостате, которое характеризуется постоянной концентрацией биомассы, ЯК и глюкозы в начале и в конце каждого периода (табл. 1).

При сравнении результатов этих двух режимов отъема-долива оказалось, что при 24-часовой периодичности средняя продуктивность составляла 0,95 г/(л·ч), а при 48-часовой – 0,57 г/(л·ч). При этом выход ЯК в обоих вариантах был одинаковым – 0,26 г/г, что говорит о преимуществе сокращения периода отъемно-доливного режима. Конечная концентрация ЯК при периоде 24 ч оказалась ниже – 31,3 г/л по сравнению с 48-часовой

Концентрация биомассы при отъемно-доливном культивировании

Biomass concentration at repeated-batch culturing

Длительность цикла, ч	Длительность ферментации, ч	Количество циклов	Концентрация биомассы, г/л			
			Начало 1-го цикла	Конец 1-го цикла	Начало последних двух циклов	Конец последних двух циклов
48	144	3	2,5	8,1	4,5	17,0
24	144	6	2,5	9,8	5,5	23,0
8	48	6	8,5	17,0	18	27,5

периодичностью – 35,3 г/л. Это объясняется более частым разбавлением КЖ одним и тем же объемом свежей среды (420 мл).

Учитывая полученные результаты, было решено далее сократить длительность периода отъема-долива, но одновременно и снизить влияние эффекта разбавления свежей средой на конечную концентрацию продукта путем уменьшения объема сливаемой КЖ и добавляемой свежей среды. Далее отъемно-доливное культивирование проводили с периодичностью в 8 ч, обновляя 33,3% объема культуральной жидкости; при этом скорость разбавления составляла 0,042 ч⁻¹, что меньше максимальной удельной скорости роста (так же, как это имело место и при 24- и 48-часовой периодичности).

На рис. 3 видно, как в течение каждого периода в КЖ постепенно накапливались биомасса и ЯК до установления стационарного состояния.

В таком режиме выращивания культура первые шесть часов находилась в экспоненциальной фазе, а последние два часа перед обновлени-

ем среды начиналась фаза замедления роста. И именно этот период времени характеризовался наиболее активным биосинтезом ЯК.

Средняя продуктивность по ЯК при данном режиме составляла 2,6 г/(л·ч), что почти в 4 раза превосходит среднюю продуктивность при периодическом режиме культивирования и подтверждает преимущество сокращения периода отъемно-доливной ферментации. Выход ЯК составил 0,34 г/г; конечная концентрация в среде – 55,3 г/л. Нельзя сказать, что предлагаемый режим обеспечивает значительное увеличение выхода ЯК и ее конечной концентрации по сравнению с периодическим, однако первый имеет явное преимущество по продуктивности, а значит, и по продолжительности ферментации (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенной работы удалось показать преимущество использования отъемно-доливного режима культивирования по сравнению с периодическим, а также возможность увеличения эффективности биосинтеза путем подбора алгоритма осуществления

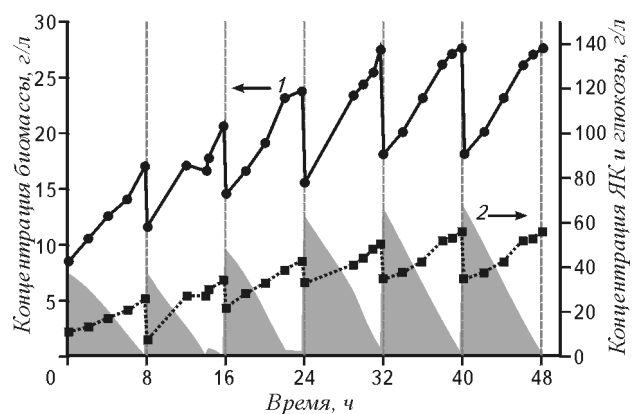


Рис. 3. Синтез ЯК штаммом *Y. lipolytica* Y3753 в отъемно-доливном режиме с периодичностью 8 ч: 1 – концентрация биомассы; 2 – концентрация ЯК; серый цвет – концентрация глюкозы

Fig. 3. Succinic acid biosynthesis by *Y. lipolytica* Y3753 strain under repeated-batch regime with 8-h period: (1), biomass concentration; (2), succinic acid concentration. Glucose concentration is shown gray

Критерии эффективности различных режимов ферментации

Criteria of various fermentation regimes efficiency

Критерий эффективности	Периодический режим	Отъемно-доливной режим с длительностью цикла		
		48 ч	24 ч	8 ч
Сливаемый объем, %	100,0	70,0	70,0	33,3
Продолжительность ферментации (время слива 100% рабочего объема ферментера), ч	68,0	68,6	34,3	24,0
Скорость разбавления, ч ⁻¹	–	0,015	0,030	0,042
pH в конце ферментации	3,60	3,89	3,98	3,65
Средняя продуктивность по ЯК, г/(л·ч)	0,69	0,57	0,95	2,60
Выход ЯК от потребленной глюкозы, г/г	0,32	0,26	0,26	0,34
Конечная концентрация ЯК, г/л	47,1	35,3	31,3	55,3

данного режима. Оптимизированный процесс культивирования может быть использован для промышленного производства ЯК на основе штамма дрожжей *Y. lipolytica* Y3753.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проведена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62514X0005).

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF (Unique Identifier of the Project RFMEFI62514X0005).

ЛИТЕРАТУРА

1. Beauprez J.J., De Mery M., and Soetaert W.K. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process. Biochem.*, 2010, 45(7), 1103–1114. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.035
2. Werpy T., Frye J., and Holladay J. Succinic acid – a model building block for chemical production from renewable resources. In: Biorefineries-industrial processes and products: status quo and future directions [Ed. B. Kamm, P.R. Gruber, M. Kamm]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag. 2006, 367–379. doi: 10.1002/9783527619849.ch30

3. Cukalovic A., and Stevens C.V. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuel. Bioprod. Bio-ref.*, 2008, 2(6), 505–529. doi: 10.1002/bbb.105 .
4. Zeikus G.J., Jain M.K., Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biot.*, 1999, 51(5), 545–552. doi: 10.1007/s002530051431
5. Ranucci E., Liu Y., Lindblad M.S., and Albertsson A.C. New biodegradable polymers from renewable sources. High molecular weight poly(ester carbonate)s from succinic acid and 1,3-propanediol. *Macromol. Rapid. Commun.*, 2000, 21(10), 680–684. doi: 10.1002/1521-3927(20000601)21:10<680::AID-MARC680>3.0.CO;2-Y
6. Delhomme C., Weuster-Botz D., and Kühn F.E. Succinic acid from renewable resources as a C4 building-block chemical—a review of the catalytic possibilities in aqueous media. *Green Chem.*, 2009, 11, 13–26. doi: 10.1039/B810684C
7. Minh D.P., Besson M., Pinel C., et al. Aqueous-Phase hydrogenation of biomass-based succinic acid to 1,4-butanediol over supported bimetallic catalysts. *Top. Catal.*, 2010, 53(15), 1270–1273. doi: 10.1007/s11244-010-9580-y
8. Xu J., and Guo B.H. Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnol. J.*, 2010, 5(11), 1149–1163. doi: 10.1002/biot.201000136
9. Muzumdar A.V., Sawant S.B., and Pangarkar V.G. Reduction of maleic acid to succinic acid on titanium cathode. *Org. Process. Res. Dev.*, 2004, 8(4), 685–688. doi: 10.1021/op0300185
10. Vasudevan D. Reduction of maleic-acid at a Ti / ceramic TiO2 cathode. *J. Appl. Electrochem.*, 1995, 25(2), 176–178.

11. Palmer R., Chen J.S., and Zidwick M.J. Organic acid and solvent production. Part I: Acetic, lactic, gluconic, succinic and polyhydroxyalkanoic acids. In: Prokaryotes [Ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt]. N. Y., USA: Springer N. Y., 2006, 511–755 doi: 10.1007/0-387-30741-9_19
12. Cukalovic A., and Christian V.S. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels. Bioprod. Bio-ref.*, 2008, 2(6), 505–529. doi: 10.1002/bbb.105
13. Hatti-Kaul R., Tomvall U., Gustafsson L., and Borjesson P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.*, 2007, 25(3), 119–124. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.01.001
14. Kamm B., and Kamm M. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2004, 64(2), 137–145. doi: 10.1007/s00253-003-1537-7
15. Thomsen M.H. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2005, 68(5), 598–606. doi: 10.1007/s00253-005-0056-0
16. San K.Y., Bennett G.N., and Sanchez A.M. Mutant *E. coli* strain with increased succinic acid production. Patent of US, 7223567, C 12 P 1/00, C 12 P 21/04. 2006.
17. Sauer M., Porro D., Mattanovich D., and Branduardi P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.*, 2008, 26(2), 100–108. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.11.006
18. Jansen M.L.A., Verwaal R., Segueiha L., et al. Fermentation process. Patent of US, 20160194670(A1), C 12 P 7/44, C 12 P 7/46. 2016.
19. Gao C., Yang X., Wang H., et al. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels.*, 2016, 9, 179. doi 10.1186/s13068-016-0597-8.
20. Синеокий С.П., Соболевская Т.И., Лукина Г.П. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3753 – продуцент янтарной кислоты. Патент РФ, 2487931, C 12 N 1/16, C 12 P 7/46, C 12 P 7/50, C 07 C 55/10. 2013.
21. Перт С.Дж. Периодическая культура и культура полного вытеснения. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. [Ред. И. Л. Работнова]. М.: Мир, 1978, 35.

Optimization of Repeated-Batch Fermentation of an Yeast Recombinant Strain *Yarrowia lipolytica* for Succinic Acid Production at Low pH

P. Yu. BONDARENKO*, A.S. FEDOROV, and S.P. SINEOKY

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 117545 Russia

*e-mail: bondarenkopavel86@gmail.com

Received November 17, 2016

Abstract—The capacity of biosynthesis of succinic acid of a recombinant yeast strain *Yarrowia lipolytica* VKPM Y3753 has been studied in a laboratory fermenter at low pH. The batch and repeated-batch modes of culturing of the strain were compared. The optimal conditions for the repeated-batch cultivation that provided the accumulation of 55.3 g/L succinic acid with a productivity of 2.6 g/L/h at the final pH value in the culture broth equal to 3.65 by the end of fermentation were selected.

Key words: batch regime, low pH, repeated-batch culturing, succinic acid biosynthesis, *Yarrowia lipolytica*.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-68-75