

PIOTR JUSZCZYK
WALDEMAR RYMOWICZ

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Optymalizacja procesu produkcji drożdży paszowych z odpadowego glicerolu

Wstęp

Tradycyjnie, głównym źródłem węgla i energii w podłożach do produkcji biomasy komórkowej są węglowodany [1]. Z ekonomicznego punktu widzenia w produkcji przemysłowej biomasy drożdży wykorzystuje się odpady z przemysłu rolno-spożywczego zawierające cukry [1, 2]. W ostatniej dekadzie wzrosło również zainteresowanie odpadami z produkcji biopaliw, których produkcja z roku na rok dynamicznie wzrasta. Frakcja glicerynowa może być wykorzystywana jako jedyne źródło węgla i energii w procesach biotechnologicznych między innymi do produkcji biomasy komórkowej drożdży. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że odpadowy glicerol oraz jego poszczególne składniki tj. glicerol, kwasy tłuszczowe i estry etylowe są dobrymi surowcami do produkcji biomasy różnych gatunków drożdży, takich jak *Y. lipolytica*, *Candida tropicalis*, *C. utilis* czy *C. robusta*. Wyselekcjonowanym, najlepszym producentem biomasy z takich surowców był szczep *Y. lipolytica* 8661 UV¹, który w procesach wglębnym charakteryzował się najwyższymi parametrami technologicznymi (wysoka produktywność i wydajność biomasy) [3, 4]. Ważnym czynnikiem pozwalającym na uzyskanie zadowalających parametrów technologicznych jest obok odpowiedniego mikroorganizmu i źródła węgla, optymalny skład podłoża produkcyjnego, dobór warunków hodowlanych (temperatura, natlenienie, pH) oraz systemu hodowli [1]. Podłoża stosowane do produkcji biomasy drożdży oprócz źródła węgla powinny zawierać odpowiednie ilości przyswajalnego azotu, fosforu, czynniki wzrostowe oraz makro i mikroelementy.

Celem pracy była optymalizacja dawki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 i autolizatu drożdży oraz natlenienia podłoża hodowlanego dla procesu produkcji biomasy drożdży paszowych *Yarrowia lipolytica* 8661 UV¹ z frakcji glicerynowej.

Materiały i metody

Mikroorganizm

W badaniach wykorzystano szczep drożdży *Y. lipolytica* 8661 UV¹ pochodzący z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Podłoża hodowlane

Do wstępnego namnażania drożdży stosowano podłoże YM z dodatkiem 20 g/L kwasów tłuszczowych. Optymalizację dawki azotu i źródła witamin przeprowadzono w podłożu o składzie [g/L]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; bacto-pepton – 0,75; odpadowy glicerol – 25 (zawierający 45% glicerolu i 50% kwasów tłuszczowych), sporządzonym w buforze fosforanowym o pH 4,5, wzbogaconym dodatkowo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w zakresie

0–16 g/L, autolizatem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zakresie 0–50 ml/L. Optymalizację dawki fosforu prowadzono w hodowlach bioreaktorowych w podłożu zawierającym [g/L]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; bacto-pepton – 0,75; odpadowy glicerol – 25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10, autolizat drożdży – 34 ml/L i uzupełnionym KH_2PO_4 w zakresie 0–0,75 g/L. Wpływ natlenienia środowiska na wzrost drożdży określono w podłożu o składzie jw. z KH_2PO_4 w ilości 0,125 [g/L].

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne oraz okresowe w bioreaktorze, wykonywane w celu optymalizacji dawki fosforu i stopnia natlenienia podłoża, prowadzono zgodnie z metodyką według Juszczyka i wsp. [3].

W celu optymalizacji dawki azotu przeprowadzono szereg 120 godzin hodowli wstrząsanych.

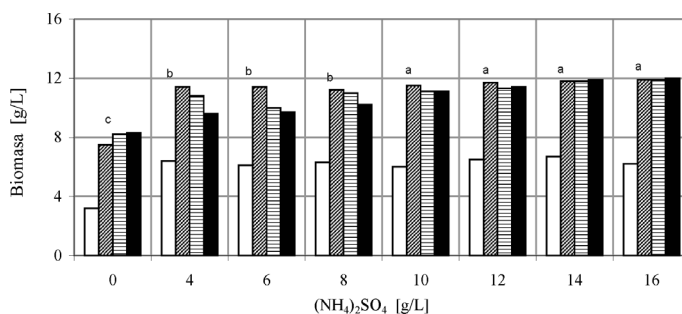
Do pomiaru stężenia tlenu użyto wielofunkcyjnego przyrządu komputerowego CX-741. Inokulum stanowiło 10% objętości hodowli.

Metody analityczne

Biomasę i tłuszcz resztkowy oznaczono metodą wagową. Glicerol oznaczono metodą HPLC na kolumnie typu *Aminex* HPX 87H połączonej z detektorem IR w temperaturze pokojowej. Szybkość fazy ciekłej 20 mM H_2SO_4 wynosiła 0,6 mL/min. Białko oznaczono metodą biuretową wg *Stewart*. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji przy wykorzystaniu programu *Statistica*.

Omówienie i dyskusja wyników

Poziom biomasy drożdży uzyskanej w hodowlach wstrząsanych był zróżnicowany i zależał zarówno od stężenia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jak również od ilości autolizatu drożdży w podłożu



Rys. 1. Wpływ różnych dawek azotu i autolizatu drożdżowego na produkcję biomasy drożdży *Y. lipolytica* ATCC 8661 UV¹ z frakcji glicerynowej w hodowlach wstrząsanych. Warunki hodowli: frakcja glicerynowa 25 g/L, podłoże sporządzone w 0,2 M buforze fosforanowym o pH = 4,5, autolizat drożdży (□ 0, ■ 16, ■ 34, ■ 50 ml/L). a-c – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$)

Tablica 1
Wpływ stężenia fosforu na podstawowe parametry technologiczne produkcji biomasy drożdży *Y. lipolytica* ATCC 8661 UV'1 z frakcji glicerynowej w hodowli węglanej

KH ₂ PO ₄ [g/L]	Ilość biomasy [g/L]	Białko [%]	Y _c [g/g]	Q _x [g/Lh]
0	10,5 ^a	32,9	0,42 ^a	0,98 ^a
0,060	10,7 ^a	37,5	0,43 ^a	0,91 ^a
0,125	17,2 ^b	35,4	0,69 ^b	1,56 ^b
0,250	17,5 ^b	38,3	0,70 ^b	1,50 ^b
0,500	18,3 ^b	36,4	0,73 ^b	1,71 ^b
0,750	18,8 ^b	38,0	0,75 ^b	1,88 ^b

Q_x – produktywność biomasy, Y_c – wydajność całkowita biomasy, a-b – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$)

Tablica 2
Wpływ stopnia natlenienia pożywki na produkcję biomasy, produktywność i wydajność biomasy oraz zawartość białka w drożdżach *Y. lipolytica* ATCC 8661 UV'1 w hodowli węglanej

Natlenienie [%O ₂]	Ilość biomasy [g/L]	Białko [%]	Y _c [g/g]	Q _x [g/Lh]
35	18,9 ^a	40,5	0,76 ^a	1,43 ^a
50	13,9 ^b	40,3	0,56 ^b	1,32 ^b
65	10,3 ^c	40,3	0,41 ^c	1,01 ^c

a-c – wartości średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha = 0,05$)
 Y_c, Q_x – oznaczenia jak w tablicy 1

hodowlany (Rys. 1). Najwyższy poziom biomasy (12 g/L) oraz najwyższą wydajność całkowitą (Y_c = 0,48 g/L) uzyskano w hodowli z dodatkiem 16 g/L (NH₄)₂SO₄ i 50 ml/L autolizatu drożdżowego. W hodowli kontrolnej bez dodatku autolizatu i (NH₄)₂SO₄ stężenie biomasy był na niskim poziomie 3,2 g/L. Analiza wariancji wykazała istotne statystycznie różnice ($\alpha = 0,05$) w uzyskanym poziomie biomasy, zależne od dawki azotu jak i autolizatu. Dodatek (NH₄)₂SO₄ do podłoża w stężeniu od 10 do 16 g/L nie miał istotnego wpływu na przyrost biomasy drożdży (około 1g/L). Doboru źródła azotu dla procesu produkcji biomasy drożdży *Y. lipolytica* dokonano na podstawie danych literaturowych [5, 6]. Jak podaje Boze i wsp. [1] najczęściej stosowanym źródłem azotu nieorganicznego, wykorzystywanym do produkcji biomasy drożdży, są sole amonowe. Rymowicz i wsp. [5] w swoich badaniach wykorzystując porafinacyjne kwasy tłuszczowe jako źródło węgla, wykazali, że najwyższe stężenie (20,5 g/L) i wysoką wydajność całkowitą (Y_{x/s} = 1,07 g/g), uzyskano w hodowli szczepu *Y. lipolytica* ATCC 8661 przy zastosowaniu 9 g/L (NH₄)₂SO₄. Musiał i wsp. [6] optymalizowali skład podłoża hodowlanego do produkcji biomasy komórkowej *Y. lipolytica* A-101 z surowego oleju rzepakowego, a (NH₄)₂SO₄ okazał się najlepszym źródłem azotu. Także badania Choi i Park [7] potwierdzają przydatność tej formy azotu nieorganicznego w procesach hodowli drożdży. Na podstawie analizy statystycznej wyników otrzymanych w tej części pracy oraz zawartości białka w biomacie

drożdży (dane nieprezentowane) jako optymalną dawkę autolizatu drożdżowego wybrano 34 ml/L, co odpowiada ok. 1 g ekstraktu drożdżowego, oraz 10 g/L siarczanu amonu.

W niniejszej pracy stężenie KH₂PO₄ optymalizowano w hodowlach bioreaktorowych. Najniższy plon biomasy, na poziomie od 5 do 10,7 g/L, obserwowano w hodowlach, gdzie stężenie KH₂PO₄ nie przekraczało 0,06 g/L. Wyraźny wzrost stężenia biomasy do 17,2 g/L oraz produktywności (1,56 g/Lh) i wydajności biomasy (Y_c = 0,69 g/g), uzyskano w podłożach zawierających 0,125 g/L soli fosforanowej. W fachowym piśmiennictwie dotyczącym procesów produkcji biomasy drożdży z różnych substratów, fosforan (V) potasu w stężeniach od 0,34 do 1,5 g/L jest najczęściej wykorzystywanym źródłem fosforu [1, 3, 5, 6, 8].

Jednym z ważniejszych parametrów hodowlanych w procesie produkcji biomasy komórkowej jest stopień nasycenia tlenem podłoża. Jak obrazuje tablica 2, wielkość tego parametru miała wyraźny wpływ na podstawowe parametry technologiczne procesu. Najwyższe wartości produktywności i wydajności biomasy uzyskiwano w warunkach natlenienia około 35% nasycenia tlenem, odpowiednio Q_x = 1,43 g/Lh i Y_c = 0,76 g/g. W tych warunkach otrzymano również najwyższe stężenie biomasy 18,9 g/L. Zawartość białka w drożdżach w całym zakresie badanego natleniania środowiska hodowlanego była podobna na poziomie powyżej 40%, co daje produkt końcowy o dobrych parametrach handlowych. Wzrost natlenienia z 35 do 65% stanu nasycenia, powodował obniżenie zarówno poziomu biomasy, produktywności i wydajności całkowitej biomasy. Rymowicz i Lenart [8], badając wpływ natlenienia środowiska hodowlanego na wzrost i biosyntezę kwasu cytrynowego przez drożdże z syropu glukozowego, stwierdzili, że zwiększenie natlenienia środowiska z 20 do 60% O₂ wpływało korzystnie na produkcję biomasy oraz dynamikę wzrostu drożdży, co pozostaje w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w dyskutowanej pracy, gdzie surowcem była frakcja glicerynowa.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że szczep drożdży *Y. lipolytica* ATCC 8661 UV'1 jest dobrym producentem biomasy drożdży paszowych z odpadowej frakcji glicerynowej. W zoptymalizowanym podłożu produkuje biomasę komórkową z wysoką szybkością i wydajnością, dając finalny produkt o wysokiej zawartości białka.

LITERATURA

- H. Boze H, G. Moulin, P. Galzy: Crit. Rev. Biotech., 12, 65 (1992).
- R.C. Kuhad, A. Singh, K. Tripathi, R. Saxena, K. Ericsson: Nutr. Rev., 55, 65 (1997)
- P. Juszczyk, I. Musiał, W. Rymowicz: Acta Sci. Pol. Biotechnol., nr 4, 65 (2005).
- P. Juszczyk, W. Rymowicz: Microbial bioconversion of raw glycerol, Nova Publish., 2009.
- W. Rymowicz, D. Rafałowicz, M. Wojtatowicz, I. Musiał: Biotechnol., nr 3, 62 (1997).
- I. Musiał, W. Rymowicz, E. Cibis: Electr. J. Pol. Agric. Univ., Biotechnol., nr 7, 1 (2004).
- M.H. Choi, Y.H. Park: Biom. Bioenerg., 25, 221 (2003).
- I. Musiał, W. Rymowicz, A. Kita: Acta Sci. Pol. Biotechnol., nr 3, 75 (2004).
- W. Rymowicz, D. Lenart: Acta Sci. Pol. Biotechnol., nr 3, 67 (2004).