

Piotr JUSZCZYK¹, Aleksandra SMOLCZYK², Zygmunt GIL³, Anita RYWIŃSKA¹, Waldemar RYMOWICZ¹

e-mail: piotr.juszczczyk@up.wroc.pl

¹ Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław² Zakład produkcyjny Skotan S.A., Czechowice-Dziedzice³ Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław

Produkcja drożdży paszowych *Yarrowia lipolytica* wzbogaconych w aminokwasy selenowe i witaminę B₁₂

Wstęp

Biomasa drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces fragilis* czy *Yarrowia lipolytica* jest stosowana od wielu lat jako alternatywne źródło białka (*Single-Cell-Protein*) i witamin w żywieniu zwierząt i ludzi [Juszczczyk i in., 2013]. Obecność dużych ilości aminokwasów egzogennych w białku drożdży, w tym szczególnie lizyny, wpływa na jego wysoką wartość odżywczą [Rywińska i in., 2013]. Drożdże mają także udział w wiązaniu różnych metali na powierzchni ściany komórkowej lub akumulują je wewnątrz komórki w połączeniach organicznych, głównie z białkami (tzw. metaloproteiny) lub enzymami np. peroksydaza glutationowa, w której znajduje się selen [Esmaeli i in., 2012]. Selen jest ważnym mikroelementem niezbędnym w funkcjonowaniu organizmu człowieka lub zwierząt. Pierwiastek ten w postaci związków organicznych takich jak selenometionina, selenocysteina czy selenometyloselenocysteina jest bardziej bezpieczny i mniej toksyczny niż formy nieorganiczne selenu. Selen w połączeniach z aminokwasami jest także bardziej przyswajalny przez organizm ludzki lub zwierzęcy. Spośród wielu organicznych form selenu, selenometionina należy do najbardziej preferowanych związków tego pierwiastka, ze względu na jego antynowotworowe właściwości [Bronzetti i in., 2001; Bierla i in., 2008; Mapelli i in., 2011]. W procesach hodowli drożdży w pożywkach zawierających selen w postaci nieorganicznej, głównie jako selenin sodu, zachodzi jego biotransformacja do form organicznych, które akumulują się w białkach wewnątrzkomórkowych drożdży. Drożdże z rodzaju *Candida*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* czy *Yarrowia* wykazują dużą tolerancję na podwyższone stężenia selenu w podłożu i efektywnie akumulują ten pierwiastek w komórce. Także witaminy obecne w brzezce hodowlanej, których nie mogą produkować organizmy eukariotyczne np. wit. B₁₂, a głównie jej najważniejsza forma cyjanokobalamina, mogą być akumulowane w komórce drożdży. Drożdże paszowe *Y. lipolytica* otrzymywane w podłożach zawierających glicerol odpadowy są dopuszczone od roku 2010 przez *European Feed Manufacture's Federation*, jako dodatek do pasz (nr kat. 00575-EN). Otrzymanie drożdży paszowych *Y. lipolytica* wzbogaconych dodatkowo w aminokwasy selenowe i wit. B₁₂ może być atrakcyjnym nowym produktem otrzymywanym z wykorzystaniem odpadowego glicerolu i stosowanym w komponowaniu specjalnych mieszanek paszowych dla zwierząt.

Celem niniejszej pracy był dobór warunków operacyjnych procesu produkcji drożdży *Y. lipolytica* A-101, wzbogaconych w aminokwasy selenowe oraz w wit. B₁₂, głównie cyjanokobalaminy, w instalacji pilotowej.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystywano drożdże *Y. lipolytica* A-101. Substratem do produkcji biomasy drożdży był 76% glicerol odpadowy firmy *Lotos* oraz służy otrzymywane po procesie degumingu oleju rzepakowego, zawierające głównie fosfolipidy. Hodowle drożdży prowadzono w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym typu *Bio-stat B-Plus* o objętości 5 l oraz bioreaktorze barbotażowym o objętości 2000 l w temperaturze 30°C, pH 3,5÷3,8 regulowanym automatycznie za pomocą wody amoniakalnej lub NaOH. Pożywka do produkcji biomasy drożdży zawierała, jako źródło węgla glicerol odpadowy i służy w ilości odpowiednio 40 i 20 g/l. W podłożu hodowlanym stosunek C:N:P wynosił jak 10:1:0,2. Podłoże uzupełniano dodatkowo odpowiednią ilością seleninu sodu oraz wit. B₁₂. Selenin sodu był wprowadzany do pożywki od początku hodowli w sposób ciągły z szybkością 3 mg/h. Celem zwiększenia przepuszczalności ściany komórkowej u drożdży, do podłoża dodawano związki powierzchniowo czynne takie jak niejonowe detergenty *Span 20* i *Triton 100x*. Po zakończeniu procesu produkcji drożdży, biomasa była

separowana na wirówce i suszona w suszarce walcowej. Białko surowe oznaczano metodą *Kjeldahla*, aminokwasy za pomocą automatycznego analizatora aminokwasów (*INGOS*, Czechy). Selen całkowity i organiczne połączenia selenu (selenometionina i selenocysteina) oznaczano metodą wg *Bierla* i in. [2008]. Stężenie wit. B₁₂ w biomacie drożdży oznaczano wg *Kośmider* i in. [2013]. Zawartość popiołu i tłuszczów wewnątrzkomórkowych oznaczano według wg *Juszczyka* i in. [2013].

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań oceniono wpływ stężenia selenu na produkcję biomasy, ilość akumulowanego selenu oraz zawartość białka w suchych drożdżach *Y. lipolytica* A-101. Jak pokazano w tab. 1, wzrost stężenia selenu w pożywce miał wpływ na obniżenie plonu biomasy z 19 do 8 g/l oraz zawartości białka surowego z 45 do 35 %, a także powodował wzrost ilości selenu całkowitego w biomacie z 194 do 2358 mg/kg. Najlepsze efekty produkcji biomasy obserwowano, gdy stężenie seleninu sodu w podłożu nie przekraczało 20 mg/l. Wg *Stabnikowej* i in. [2005], drożdże *S. cerevisiae* CEE12 otrzymywane w podłożu uzyskanym z ekstrakcji wodnej odpadów z warzyw (kapusta, arbuż, zielona sałata) i owoców tropikalnych, zawierały 45 % białka i akumulowały do 150 mg Se (IV)/kg. Drożdże bogate w selen były otrzymywane w tanich pożywkach otrzymywanych na bazie innych naturalnych komponentów takich jak mieszanka soku z brązowego ryżu, brzezki piwnej i kielków sojowych w proporcji 4:4:2 [Yin i in., 2009]. W innych badaniach drożdże *S. cerevisiae* akumulowały do 287,6 mg selenu/kg, kiedy w 9 godzinie hodowli dodawano do pożywki selenin sodu w ilości 25 mg/l [Soudi i in., 2003]. Badania własne i innych autorów potwierdzają, że dodawanie selenu do pożywki w sposób periodyczny lub ciągły od początku prowadzenia procesu jest najlepszym systemem hodowli, który pozwala uzyskać wysokie ilości selenu w komórce, wysokie stężenia biomasy i białka [Yin i in., 2009; Wang i in., 2012].

Tab. 1. Plon biomasy oraz zawartość białka i selenu w biomacie drożdży *Y. lipolytica* A-101 otrzymanej w hodowli wglębnej prowadzonej w bioreaktorze 5 l

Na ₂ SeO ₃ [mg/l]	Plon biomasy [g/l]	Zawartość białka w biomacie [%]	Zawartość Se (IV) w biomacie [mg/kg _{s.m.}]
10	19	45	194
20	15	42	378
30	11	39	948
60	8	35	2358

Witamina B₁₂ (kobalamina) to termin stosowany wobec związków czteropirolowych z centralnie zlokalizowanym jodem kobaltu: cyjanokobalaminy, adenozynekobalaminy oraz hydroksylkobalaminy. Biosynteza wit. B₁₂ jest domeną wyłącznie organizmów prokariotycznych. Do biosyntezy tej witaminy jest uzdolnionych wiele gatunków bakterii, ale tylko dwa mają istotne znaczenie: *Propionibacterium freudenreichii* i *Pseudomonas denitrificans*. Witamina ta jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka i zwierząt, zapobiegająca anemii żłóśliwej. Trwałą formą wit. B₁₂, produkowaną na skalę przemysłową i nie występującą w przyrodzie, jest cyjanokobalamina. Możliwość wzbogacenia biomasy organizmów eukariotycznych, np. drożdży, w wit. B₁₂ jest ważne z punktu widzenia zastosowania takich drożdży w żywieniu zwierząt monogastycznych. W tym celu przeprowadzono badania oceny wpływu stężenia wit. B₁₂ w pożywce na akumulację tej witaminy w komórkach drożdży *Y. lipolytica* A-101. Jak obrazuje tab. 2, drożdże hodowane w podłożu glicerynowym, akumulowały witaminę w ilości 7,2÷9,7 µg/g_{s.m.} drożdży. Zwiększenie ilości wit. B₁₂ w podłożu do 4 mg/l nie wpływało znacząco na zwiększenie stężenia tej witaminy

w komórkach drożdży. Dawka 0,5 mg/l wit. B₁₂ w pożywce wystarcza w zupełności do uzyskania drożdży paszowych, które stosowane w mieszankach paszowych w ilości 5 %, zapewniają codzienne zapotrzebowanie na tę witaminę przez trzodę chlewną o wadze około 100 kg [badania własne niepublikowane]. Ze względu na dużą masę cząsteczkową tej witaminy (1355,37 g/mol), oceniono wpływ modyfikacji przepuszczalności ściany komórkowej drożdży *Y. lipolytica* przez związki powierzchniowo-czynne takie jak *Span 20* czy *Triton 100x*. Jak obrazuje tab. 3, dodatek 0,25 g/l substancji powierzchniowo czynnych zwiększał ilość akumulowanej witaminy w drożdżach od 17,9 do 35,8 %, a 2-krotnie lepsze efekty uzyskiwano stosując surfaktant *Span 20*.

Ponadto biomasa drożdży otrzymywana na podłożu glicerynowym ze śluzami zawierała oprócz wit. B₁₂, także wysoką zawartość białka surowego, dochodzącą do 50 %. W innych badaniach szczepy drożdży z gatunku *Y. lipolytica* wykorzystywane do produkcji SCP w pożywkach glicerynowych, charakteryzowały się podobną zawartością białka w komórkach rzędu 42,1÷46,8 %. Białko to cechowało się dobrą strawnością, powyżej 57%, i wysoką wartością biologiczną dochodzącą do 72,3% [Juszczak i in., 2013; Michalik i in., 2014].

Tab. 2. Zawartość białka surowego i witaminy B₁₂ w biomacie *Y. lipolytica* A-101 otrzymanej w hodowli węglanej (Bioreaktor o obj. 5 l, pożywka glicerynowa zawierająca różne dawki wit. B₁₂)

B ₁₂ , [mg/l]	Białko, [%]	B ₁₂ , [μg/g s.m. drożdży]
0	48,4 ± 1,3	n.d.
0,5	50,1 ± 1,1	7,2 ± 0,14
1,0	46,4 ± 1,5	8,1 ± 0,18
2,0	48,4 ± 1,8	8,9 ± 0,25
4,0	47,2 ± 1,2	9,7 ± 0,43

Tab. 3. Wpływ substancji powierzchniowo czynnych na akumulację wit. B₁₂ w komórkach drożdży *Y. lipolytica* A-101 (Bioreaktor 5 l, zawartość wit. B₁₂ w podłożu hodowlanym wynosiła 4 mg/l)

Span 20, [mg/l]	Triton 100x, [(mg/l)]	Białko, [%]	B ₁₂ , (μg/g s.m. drożdży)
0	0	48,8 ± 1,3	9,5 ± 0,14
0,5	0	50,3 ± 1,1	12,9 ± 0,21
0	0,5	49,1 ± 1,2	11,2 ± 0,34

Na podstawie uzyskanych wyników w skali laboratoryjnej, przeprowadzono proces produkcji drożdży wzbogaconych w selen i wit. B₁₂ w skali technicznej, w reaktorze o objętości 2000 l. Charakterystyka chemiczna uzyskanych drożdży została zamieszczona w tab. 4. We wszystkich przeprowadzonych wariantach hodowli, poziom białka surowego w drożdżach wynosił od 40,5 do 45% i był niższy w stosunku do biomasy *Y. lipolytica* A-101 otrzymywanej w reaktorze 5 l. Analiza składu aminokwasowego białka *Y. lipolytica* A-101 wykazała, że zawartość najważniejszych aminokwasów egzogennych była na wysokim poziomie, zwłaszcza zawartość lizyny, która wynosiła 5,9÷6,8 g/100 g białka. Białko drożdży szczepu *Y. lipolytica* S6 otrzymane w hodowli z gliceryną zawierało wyższe ilości lizyny i treoniny, odpowiednio 8,26 i 5,39 g/100 g białka [Juszczak i in. 2013]. W badaniach Michalik i in. [2014], potwierdzono wysoką wartość biologiczną białka drożdży *Y. lipolytica*, otrzymanego w pożywkach glicerynowych, które nie różniło się od białka drożdży *S. cerevisiae* i zawierało podobne ilości lizyny

Tab. 4. Charakterystyka biomasy drożdży *Y. lipolytica* A-101 (Reaktor barbotażowy o objętości 2000 l, pożywki z dodatkiem seleninu sodu i witaminy B₁₂)

Aminokwas [g/100 g białka]	Kontrola	Na ₂ SeO ₃ 10 mg/l	B ₁₂ 4 mg/l	Na ₂ SeO ₃ + B ₁₂ 10 mg/l + 4 mg/l
Izoleucyna	4,1	3,4	3,9	3,3
Leucyna	6,5	5,3	5,8	5,6
Lizyna	6,8	5,9	6,0	6,2
Metionina/cystyna	2,5	2,2	1,9	2,1
Fenylalanina	6,9	5,6	5,8	6,0
Treonina	5,0	3,8	4,2	4,3
Tryptofan	1,1	1,0	1,0	0,8
Walina	5,0	4,0	4,1	4,3
Selenometionina	n.d.	0,058	n.d.	0,047
Selenocysteina	n.d.	0,008	n.d.	0,0062
Białko surowe	45,3	41,0	45	40,5
Zawartość B ₁₂	n.d.	n.d.	11,1	12,1
Zawartość popiołu	7,8	8,2	7,3	8,1
Zawartość tłuszczu	17,5	18,2	16,9	17,7

i treoniny jak w niniejszych badaniach, odpowiednio 6,22 i 4,18 g/100 g białka. Wzbogacenie pożywki nieorganicznym źródłem selenu w ilości 10 mg Na₂SeO₃/l, pozwalało uzyskać w białku drożdży dodatkowo aminokwasy selenowe, selenometioninę w ilości 0,047÷0,058 g/100 g białka i selenocysteinę w ilości 0,006÷0,008 g/100 g białka, które nie tworzyły się w hodowli kontrolnej bez selenu. Niniejsze badania potwierdzają doniesienia innych autorów, że selenometionina jest głównym aminokwasem selenowym, który tworzy się w komórkach drożdżowych w połączeniu z aminokwasami siarkowymi. Badania Wang i in. [2012] wykazały, że drożdże *C. utilis*, 81% obecność w pożywce selenu w postaci Na₂SeO₃ akumulowały w formie organicznej. W innych badaniach, genetycznie modyfikowane drożdże *S. cerevisiae* produkowały 24-krotnie więcej selenometyloselenocysteiny, innego aminokwasu selenowego, w porównaniu do innych drożdży selenowych [Mapelli i in., 2011]. Jak obrazuje tab. 4, w otrzymanych drożdżach paszowych *Y. lipolytica* A-101, nie było różnic w ilości akumulowanej wit. B₁₂ (11,1÷12,1 μg/g), zawartości popiołu (7,3÷8,2%) i zawartości tłuszczu w biomacie (18,2÷19,9%).

Wnioski

W procesie produkcji biomasy *Y. lipolytica* A-101 w skali pilotowej, w pożywkach zawierających surowce odpadowe z produkcji biodiesla tj. surowy glicerol i śluzu po procesie degumingu oleju roślinnego oraz dodatkowo selen nieorganiczny w postaci seleninu sodu otrzymywano drożdże paszowe, które w białku zawierały aminokwasy selenowe, tj. selenometioninę i selenocysteinę jako organiczne związki selenu.

Dodatek do pożywki niewielkiej ilości wit. B₁₂, poniżej 0,5 mg/l oraz niejonowego detergentu *Span 20* w ilości 0,25 g/l, pozwala otrzymać drożdże paszowe, które akumulują tę witaminę w komórkach drożdży na poziomie 11,1÷12,1 μg/g. Stosowanie takich drożdży w mieszankach paszowych w żywieniu zwierząt monogastrycznych, zapewnia codzienne zapotrzebowanie na tę witaminę dla takich zwierząt.

LITERATURA

- Bierla K., Dernovics M., Vacchina V., Szpunar J., Bertin G., Lobinski R., 2008. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1789–1798. DOI: 10.1007/s00216-008-1883-5
- Bronzetti G., Cini M., Andreoli E., Caltavuturo L., Panunzio M., Della Croce C., 2001. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mutat. Res.*, **496**, 105–115. DOI: 10.1016/S1383-5718(01)00213-3
- Esmaili S., Khosravi-Darani K., Pourahmad R., Komeili R., 2012. An experimental design for production of selenium-enriched yeast. *World Appl. Sci.*, **19**, 31-37. DOI: 10.1007/s00216-008-1883-5
- Juszczak P., Tomaszewska L., Kita A., Rymowicz W., 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Biores. Technol.*, **137**, 124-131. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.010
- Kośmider A., Białas W., Kubiak P., Drożdżyńska A., Czarczyk K., 2012. Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* sp. shermanii: Optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Biores. Technol.*, **105**, 128-133. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.074
- Mapelli V., Hilleström P.P., Kapolna E., Larsen E.H., Olsson L., 2011. Metabolic and bioprocess engineering for production of selenized yeast with increased content of seleno-methylselenocysteine. *Metab. Eng.*, **13**, 282–293. DOI: 10.1016/j.ymben.2011.03.001
- Michalik B., Biel W., Lubowicki R., Jacyno E., 2014. Chemical composition and biological value of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol. *Can. J. Anim. Sci.*, **94**, 99-104. DOI: 10.4141/cjas2013-052
- Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W., 2013. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioen.*, **48**, 148-166. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.11.021
- Soudi M.R., Malekzadeh F., Norouzi P., 2003. Screening yeast cells for absorption of selenium oxyanions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 181-184. DOI: 10.1023/A:1023290908937
- Stabnikova O., Wang J.Y., Ding H.B., Tay J.H., 2005. Biotransformation of vegetable and fruit processing wastes into yeast biomass enriched with selenium. *Biores. Technol.*, **96**, 747–751. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.022
- Wang D., Yang B., Wei G., Liu Z., Wang C., 2013. Efficient preparation of selenium/glutathione-enriched *Candida utilis* and its biological effects on rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, **150**, 249-257. DOI: 10.1007/s12011-012-9459-9
- Yin H., Chen Z., Gu Z., Han Y., 2009. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. *Food Sci. Technol.*, **42**, 327-331. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.04.002

Badania były realizowane i finansowane w ramach programu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju INNOTECH w ścieżce programowej „Podniesienie wartości probiotycznych (selenometionina, selenocysteina, B₁₂) w drożdżach *Yarrowia lipolytica*, jako składnika paszy dedykowanej dla poszczególnych gatunków zwierząt”.