Dobór szczepów i składu podłoża do produkcji biomasy *Yarrowia lipolytica* na substratach tłuszczowych

Waldemar Rymowicz
Dorota Rafałowicz
Maria Wojtatowicz
Izabela Musiał
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Wrocław

1. Wstęp

Tłuszcze pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego mogą być dobrym źródłem węgla i energii do produkcji biomasy przez drożdże z rodzaju *Candida, Rhodotorula, Torulopsis, Yarrowia i Trichosporon* (4,5,6,9,10). Szczególne zainteresowanie zwrócono na wykorzystanie do produkcji *Single Cell Protein* (SCP) olejów roślinnych: palmowego, słonecznikowego, rzepakowego i produktów ubocznych i odpadowych z przemysłu tłuszczowego (6,13,17). Produkcję SCP prowadzono w hodowlach stacjonarnych (8), półciągłych (5) i ciągłych (11), w których stosowano różne rodzaje drożdży. Procesy produkcji biomasy na tłuszczach prowadzono w warunkach zróżnicowanego odczynu środowiska w zakresie pH 3,5-6,5 (7,8). W porównaniu do substratów węglowodanowych takich jak melasa czy serwatka, na których uzyskiwano wysoką właściwą szybkość wzrostu drożdży rzędu μ = 0,5-0,62 h^{-1}, procesy na substratach tłuszczowych charakteryzowały się mniejszą dynamiką szybkości wzrostu (μ = 0,1-0,3 h^{-1}), porównywalną do stwierdzanej na glicerolu i n-parafinach (7,14,15). Natomiast wydajność biomasy na takich źródłach węgla była generalnie wyższa, często przekraczała $Y_{x/s}$ = 1,0 (5,6,11).

Celem pracy był dobór szczepów drożdży z gatunku *Y. lipolytica* z przeznaczeniem do produkcji SCP na surowym oleju rzepakowym i porafinacyjnych kwasach tłuszczowych, wybór szczepu najlepiej przystosowanego do wzrostu na tych substratach i wstępna ocena kinetyki procesu produkcji biomasy w warunkach zróżnicowanego źródła azotu, stężenia substratu tłuszczowego oraz odczynu środowiska.

2. Materiał i metody

2.1. Mikroorganizmy

Do badań wykorzystano dziesięć szczepów drożdży z gatunku *Y. lipolytica* pochodzących z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności AR we Wrocławiu, z Laboratorium Genetyki Molekularnej i Komórkowej C.B.A.I. w Thiverval-Grignon (Francja), oraz z kolekcji amerykańskiej ATCC. Zapasy kultur drożdży przechowywano na skosach YM pod parafiną w temp. 4°C.

2.2. Substrat

Do produkcji biomasy wykorzystywano surowy olej rzepakowy (SORZ) i porafinacyjne kwasy tłuszczowe (PKT), które pochodziły z Nadodrzańskich Zakładów Przemysłu Tłuszczowego w Brzegu.

2.3. Podłoża hodowlane

Do wstępnego namnażania kultur drożdży stosowano podłoże inokulacyjne o składzie (g/dm^3): SORZ lub PKT — 20,0; NH_4Cl — 6,0; KH_2PO_4 — 1,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ — 1,0; $CaCO_3$ — 10,0; ekstrakt drożdżowy — 1,0; woda wodociągowa, pH 6,0. Biomasę drożdży paszowych produkowano w podłożu o składzie (g/dm^3): SORZ lub PKT — 20,0; KH_2PO_4 — 1,5; $MgSO_4$ x $7H_2O$ — 2,5; ekstrakt drożdżowy — 1,0; woda wodociągowa. W zależności od eksperymentu stosowano cztery źródła azotu w ilości (g/dm^3): NH_4Cl — 7,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 9,0; NH_4NO_3 — 9,0; $(NH_4)_2HPO_4$ — 11,0.

2.4. Sposób prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne prowadzono w 250 cm^3 kolbach stożkowych zawierających 25 cm^3 podłoża inokulacyjnego na wstrząsarce rotacyjnej typu G-10 firmy New Brunswick przy 160 rpm przez 48 godzin w temp. 30°C. Hodowle produkcyjne, w zależności od eksperymentu, prowadzono w 300 cm^3 kolbkach stożkowych zawierających 30 cm^3 podłoża produkcyjnego, na wstrząsarce w warunkach analogicznych jak hodowle inokulacyjne przez trzy dni lub w 3-litrowym bioreaktorze typu AK-3, zawierającym 1000 cm^3 podłoża produkcyjnego. W zależności od stężenia substratu tłuszczowego, hodowle prowadzono w ciągu 12-18 godzin. W czasie hodowli utrzymywano temp. 30°C, pH automatycznie na poziomie 2,9; 3,5; 4,5 lub 5,5 za pomocą 10% KOH, szybkość obrotową mieszadła 400 rpm, przepływ powietrza 1 vvm.

2.5. Metody analityczne

Biomasę oznaczano wagowo. Do 10 cm^3 próbki hodowlanej dodawano dwukrotnie po 2,5 cm^3 eteru naftowego w celu rozpuszczenia frakcji tłusz-

czowej, wirowano przez 5 minut przy 4000 obr/min. Następnie, biomasę filtrowano na sączkach, przemywano wodą i suszono w temp. 105°C do stałej masy. Oznaczanie tłuszczu resztkowego. Frakcję eterową otrzymaną przy wirowaniu biomasy, odparowywano w temp. 50°C, a następnie dosuszano w temp. 105°C do stałej masy i ważono.

3. Omówienie wyników i dyskusja

3.1. Dobór szczepów

Dobór szczepów do produkcji SCP na substratach tłuszczowych przeprowadzono w dwóch etapach: 1) wstępna selekcja szczepów w hodowlach wstrząsanych i 2) wybór najlepszego szczepu do środowiska zawierającego surowy olej rzepakowy (SORZ) lub porafinacyjne kwasy tłuszczowe (PKT), w hodowli w bioreaktorze. Wszystkie badane szczepy były zdolne do wzrostu w podłożach zawierających substraty tłuszczowe jako jedyne źródło węgla i energii. Potwierdza to spostrzeżenia wielu autorów, że drożdże z gatunku *Y. lipolytica* wykazują dobry wzrost w środowiskach zawierających takie źródło węgla (9,17). Poziom biomasy był zróżnicowany i kształtował się od 16,3 do 21,3 g s.m./dm^3 w hodowlach zawierających SORZ i od 13,2 do 20,0 g s.m./dm^3 w hodowlach z PKT, (tab. 1). Szczepy A-101, A-10 i A-15 dawały wysoki plon biomasy w hodowlach wstrząsanych z SORZ, natomiast szczepy A-8, A-10 i ATCC 20320 były najlepszymi producentami biomasy w środowisku zawierającym PKT. SORZ był lepszym substratem do produkcji biomasy przez badane szczepy *Y. lipolytica* w porównaniu do PKT. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano sześć szczepów *Y. lipolytica*.

TABELA 1
PRODUKCJA BIOMASY PRZEZ DROŻDŻE *Yarrowia lipolytica* NA PKT I SORZ W 3-DOBOWYCH HODOWLACH WSTRZĄSANYCH

Nazwa szczepu	Biomasa (g s.m./dm^3)	
	SORZ	PKT
Y. lipolytica A-101	19,7	17,1
Y. lipolytica A-101.1.14	18,3	16,1
Y. lipolytica A-101.1.22	18,6	16,8
Y. lipolytica A-8	17,1	20,0
Y. lipolytica A-10	21,3	18,7
Y. lipolytica A-15	19,9	14,1
Y. lipolytica JM-23/pINA 169	16,3	14,2
Y. lipolytica ATCC 8661	18,3	15,3
Y. lipolytica ATCC 20324	17,2	17,6
Y. lipolytica ATCC 20461	16,9	13,2

substrat 2%; pH 5,5; NH_4Cl jako źródło N

W hodowlach stacjonarnych w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym, oceniono tempo wzrostu drożdży, plon i wydajność biomasy na substratach tłuszczowych, co przedstawiono w tabeli 2. Badane szczepy *Y. lipolytica* produkowały biomasę z wysoką wydajnością wynoszącą $Y_{x/s}$ = 0,73-1,14. Najlepszym producentem biomasy, zarówno na SORZ i PKT, był szczep ATCC 8661, który charakteryzował się ponadto dynamicznym wzrostem na obu substratach tłuszczowych. Poziom tłuszczu resztkowego w hodowlach tego szczepu był najniższy i wynosił około 1g/dm^3. Szybkość właściwa wzrostu w fazie logarytmicznej tego szczepu była bardzo wysoka i wynosiła μ = 0,24 – 0,28 h^{-1}. Szczep JM-23/pINA 169 produkował biomasę z niską wydajnością równą $Y_{x/s}$ = 0,73 i charakteryzował się niską dynamiką wzrostu na SORZ.

TABELA 2
PRODUKCJA BIOMASY PRZEZ WYBRANE SZCZEPY DROŻDŻY *Y. lipolytica* NA SORZ I PKT W HODOWLI STACJONARNEJ W BIOREAKTORZE

Nazwa szczepu	Biomasa (g s.m./dm^3)		Tłuszcz resztkowy (g/dm^3)		$Y_{x/s}$		μ (h^{-1})	
	SORZ	PKT	SORZ	PKT	SORZ	PKT	SORZ	PKT
A-10	15,7	16,0	4,0	3,4	0,95	0,93	0,23	0,22
A-101	14,1	**	4,1	**	0,86	**	0,19	**
A-101.1.22	15,0	14,0	3,6	3,0	0,88	0,79	0,21	0,25
ATCC 8661	21,5	18,9	1,2	0,9	1,13	0,96	0,24	0,28
ATCC 20 324	17,0	15,2	2,6	4,2	0,95	0,93	0,22	0,19
JM-23/pINA 169	13,1	**	1,8	**	0,69	**	0,12	**

substrat 2%; pH 5,5; NH_4Cl jako źródło N,
** — brak wzrostu, komórki oblepione tłuszczem

W przypadku dwóch szczepów, JM-23/pINA 169 i A-101, nie zaobserwowano wzrostu biomasy w ciągu 24-godzinnej hodowli na PKT, z powodu oblepienia komórek drożdży substratem tłuszczowym i przypuszczalnie niedostępności rozpuszczonego O_2. Do dalszych badań optymalizacyjnych wybrano szczep ATCC 8661, który na SORZ i PKT dawał najwyższy plon biomasy i charakteryzował się najwyższą dynamiką wzrostu na tych substratach. Szczep ten cytowany przez Takata (13) był również najlepszym producentem biomasy na oleju palmowym i odpadach z produkcji oleju palmowego. Autor podkreślił, że szczep ten jest niepatogeniczny, co ma podstawowe znaczenie przy wykorzystaniu jego biomasy na cele paszowe. Ponadto Yoshida i Hashimoto prowadząc szeroko zakrojone badania patogeniczności drożdży zaliczyli gatunek *Y. lipolytica* do grupy mikroorganizmów bezpiecznych (16). Porafinacyjne kwasy tłuszczowe jako produkt uboczny przemysłu tłuszczowego, o cenie dwukrotnie niższej niż surowy olej rzepakowy, zostały wybrane jako substrat do dalszych badań optymalizacyjnych.

3.2. Wpływ źródła azotu

Z prac wielu autorów wynika celowość doboru odpowiedniego źródła azotu, które ma duży wpływ na kształtowanie się podstawowych parametrów hodowlanych przy produkcji biomasy (2,3). Przebadano cztery źródła azotu nieorganicznego w formie soli amonowych, przyswajalnych przez drożdże. Rodzaj soli amonowej miał wpływ na poziom i wydajność biomasy oraz szybkość właściwą wzrostu *Y. lipolytica*, (tab. 3). Najlepsze efekty produkcji biomasy przez badany szczep ATCC 8661, uzyskano w hodowli z siarczanem amonowym. Proces charakteryzował się najwyższą wydajnością równą $Y_{x/s}$ = 1,07, przy szybkości właściwej wzrostu w fazie logarytmicznej $\mu = 0{,}35\ h^{-1}$, równoważnej czasowi zdwojenia biomasy t_d = 2 godziny. Dobrym źródłem azotu dla tego szczepu był także fosforan amonowy, jednak przy podobnej wartość szybkości wzrostu, uzyskano niższą wydajność biomasy $Y_{x/s}$ = 0,95. Obie sole amonowe były najczęściej stosowanym źródłem N w procesach produkcji biomasy (3,4,7,8). W dalszych badaniach stosowano w pożywkach $(NH_4)_2SO_4$.

Tabela 3

Wpływ źródła azotu, odczynu środowiska i stężenia substratu na podstawowe parametry technologiczne produkcji biomasy na pkt przez szczep *Y. lipolytica* ATCC 8661

Źródło azotu	Biomasa (g s.m./dm^3)	Resztkowe PKT (g/dm^3)	$Y_{x/s}$	μ (h^{-1})	t_d (h)
	2% substratu pH 5,5				
NH_4Cl	16,2	3,1	0,93	0,29	2,4
NH_4NO_3	17,7	1,1	0,91	0,28	2,5
$(NH_4)_2HPO_4$	17,9	1,2	0,93	0,35	2,0
$(NH_4)_2SO_4$	20,5	1,3	1,07	0,35	2,0
pH	$(NH_4)_2SO_4$ jako źródło N, 2% substratu				
2,9	14,0	4,3	0,86	0,23	3,0
3,5	16,3	2,4	0,90	0,31	2,2
4,5	14,5	3,0	0,91	0,29	2,4
5,0	17,2	1,3	0,89	0,33	2,1
5,5	20,5	1,3	0,98	0,35	2,0
Substrat (%)	$(NH_4)_2SO_4$ jako źródło N, pH 3,5				
2,0	16,3	2,4	0,90	0,31	2,2
3,0	15,0	9,0	0,71	0,19	3,6
3 x 1,0	19,7	6,2	0,81	0,30	2,3
2 x 2,0	32,6	4,9	0,91	0,29	2,4

3.3. Wpływ odczynu środowiska

W badaniach prowadzonych przez Montet i wsp. (8,11) wykazano, że tempo wzrostu różnych szczepów drożdży na oleju palmowym lub rzepakowym jest zależne od wielkości utrzymywanego pH. Ogólnie wyższe tempo wzrostu drożdży autorzy ci osiągali w pH 6,5. Jednak wśród badanych drożdży gatunki takie jak *Candida rugosa* i *Geotrichum candidum* dynamicznie rosły w warunkach niskiego pH 3,5. Możliwość prowadzenia procesu produkcji biomasy w niskim pH, bez znacznego obniżenia podstawowych parametrów technologicznych, jest cenną właściwością stosowanego szczepu, stwarza bowiem możliwość prowadzenia procesu w warunkach niesterylnych. Obniżenie pH poniżej 4,0 zabezpiecza przed rozwojem bakteryjnej mikroflory zakażającej, a ponadto pominięcie energochłonnego i kosztownego procesu sterylizacji podłoża hodowlanego, wpływa zasadniczo na cenę uzyskanego produktu. Z tego względu oceniono proces produkcji biomasy *Y. lipolytica* ATCC 8661 w zakresie pH 2,9-5,5. Prowadzenie i kontrola hodowli szczepu w pH wyższym niż 5,5, były utrudnione z powodu obfitej piany. Cechą charakterystyczną procesu produkcji biomasy na tłuszczach jest silne obniżanie się pH w czasie wzrostu. W eksperymentach prowadzonych bez regulacji pH wykazano, że początkowe pH 5,5 szybko obniżyło się do poziomu pH 1,5, co spowodowało całkowite zahamowanie wzrostu *Y. lipolytica*. Z tego względu prowadzono automatyczną regulację pH za pomocą ługu potasowego.

Najwyższą wydajność biomasy równą $Y_{x/s}$ = 1,05 i najwyższą szybkość właściwą wzrostu w fazie logarytmicznej uzyskano w pH 5,5. Dopiero w pH 2,9 zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu biomasy, szybkości właściwej wzrostu i wydajności, odpowiednio do 14 g s.m./dm^3, μ = 0,23 h^{-1} i $Y_{x/s}$ = 0,86. W środowisku kwaśnym o pH 3,5, szybkość właściwa wzrostu była podobna jak w pH 5,5, jednak wydajność biomasy obniżyła się do poziomu $Y_{x/s}$ = 0,90. Dobrą szybkość wzrostu drożdży w pH 3,0-3,5 osiągano także w hodowlach *Candida tropicalis* na n-alkanach, *Kluyveromyces fragilis* na serwatce i *Pichia pastoris* na metanolu, uzyskując szybkości właściwe wzrostu w zakresie μ = 0,11 – 0,33 h^{-1} (7). Wysoką szybkość właściwą wzrostu *Candida rugosa* na oleju palmowym, uzyskano zarówno w pH 3,5 jak i w pH 6,5; odpowiednio 0,23 h^{-1} i 0,28 h^{-1} (8).

3.4. Wpływ stężenia substratu

Szybkość konwersji substratu do biomasy, w przypadku kiedy jest on jedynym źródłem węgla i energii, zależy od jego stężenia. Przeprowadzono wiele hodowli stacjonarnych w pH 3,5 zawierających zróżnicowane stężenie tłuszczu w zakresie 2-4% wagowych. Wszystkie hodowle prowadzono w warunkach niesterylnych. Wprowadzenie jednorazowo 3% substratu, spowodowało oblepienie komórek tłuszczem, który uniemożliwiał prawdopodobnie transport składników podłoża i tlenu do komórki, efektem czego było spowolnienie wzrostu drożdży i niska wydajność biomasy, odpowiednio 0,19 h^{-1} i 0,71 (tab. 3). Znaczny wzrost wydajności i szybkości procesu produkcji

biomasy uzyskano wprowadzając 3% substratu w trzech porcjach po 1% co 4 godziny hodowli. Periodyczne dozowanie substratu pozwoliło również zwiększyć poziom biomasy w hodowli z całkowitym stężeniem 4% tłuszczu do 32,6 g s.m./dm^3. Najwyższą wydajność biomasy i szybkość właściwą wzrostu uzyskano w hodowlach zawierających od 1 do 2% substratu tłuszczowego (tab. 3). Prowadzenie hodowli w niskim pH 3,5 skutecznie hamowało rozwój obcej mikroflory; w płynach pohodowlanych nie stwierdzono zakażających mikroorganizmów.

Poziom biomasy jaki uzyskiwano na substratach lipidowych zależał od stosowanego systemu hodowlanego i kształtował się w hodowlach stacjonarnych od 15 do 20 g s.m./dm^3 (9), a w hodowlach z dozowaniem substratu osiągano poziom biomasy do 50 g s.m./dm^3, przy niskiej szybkości wzrostu $\mu = 0{,}1\ h^{-1}$ (11).

W przeprowadzonych przez nas wcześniej badaniach wykazaliśmy wysoką wartość biologiczną i energetyczną biomasy szczepu ATCC 8661, która może być użyta jako drożdże paszowe (12). Dlatego celowa jest, jak się wydaje, intensyfikacja procesu produkcji biomasy tego szczepu w systemie *feed-batch*, jak również w hodowlach półciągłych i ciągłych w warunkach chemostatu, które są preferowane do tego typu procesów.

Literatura

1. Crueger W., Crueger A., (1992), *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Ed. Thomas D. Brock., Academic Press, New York, 2nd ed., 16, 306-316.
2. Ghaly A. E., Ben-Hassan R. M., (1995), Appl. Biochem. Biotechnol., 50, 79-94.
3. Halasz A., Barath A., Matrai B., (1988), Acta Aliment. Acad. Sci. Hung., 174, 374-375.
4. Koh J. J., Kodama P., Minoda Y., (1983), Appl. Microbiol. Biotechnol., 47, 1207-1212.
5. Kramarz M., (1992), Prace Nauk. AE, Wrocław, 626, 67-74.
6. Kramarz M., (1991), Prace Nauk. AE, Wrocław, 605, 24-31.
7. Litchfield J. M., (1979), *Production of single-cell protein for use in food or feed*, in: *Microbial Technology* (Eds. Peppler H. J., Perlman C.,), Academic Press, New York, vol. 1, 93-95.
8. Monet D., Ratomahenina R., Ba A., Pina M., Grailla J., Galzy P., (1983), J. Ferment. Technol., 61, 417-420.
9. Monet D., Ratomahenina R., Galzy P., Pina M., Graille J., (1985), Biotechnol. Lett., 10, 733-736.
10. Ratledge C., Evans C. T., (1989), in: *The yeast metabolism and physiology of yeast* (Eds. Rose A. H., Harrison J. S.,), Academic Press, London, 2nd ed., vol. 3, 367-455.
11. Riaublanc A., Boze H., Domuynck M., Maulin G., Ratomahenina R., M., Grailla J., Galzy P., (1992), Fat. Sci. Technol., 2, 46-51.
12. Rymowicz W., Kinal S., Wojtatowicz W., Musiał I., Bodarski R., 1997, Biotechnologia, 70-77.
13. Takata Y., (1992), J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol., 16, 306-313.
14. Triboli E. P. D. R., Jurkiewicz C. H., Borzani W., (1994), Biotechnol. Lett., 16, 385-388.
15. Vazquez D., Lage M. A., Parajo J. C., Alonso J. L., (1993), Alimentaria, 224, 99-104.
16. Yoshida M., Hashimoto K., (1986), Agric. Biol. Chem., 50, 2117-2118.

Selection of strains and medium composition for *Yarrowia lipolytica* biomass production on lipid substrates

Summary

The production of Single Cell Protein in the batch culture from crude rapeseed oil and waste fatty acids using *Y. lipolytica* strains was studied. The effect of nitrogen sources, lipid concentration and pH value on the yeast growth and biomass yield was also investigated. *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 was the best strain for SCP production on both lipid substrates. The specific growth rate and biomass yield were $\mu = 0,19 - 0,35\ h^{-1}$ and $Y_{x/s} = 0,68 - 1,07$ respectively, depending on the culture condition. With the above yeast strain it was possible to carry out the fermentation at low pH 3,5 without any significant lowering of kinetic and yield parameters.

Key words:
Yarrowia lipolytica, SCP, batch cultivation, crude rapeseed oil, waste fatty acids, specific growth rate, yield of biomass.

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