

Charakterystyka biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* wyprodukowanej na substratach tłuszczowych

¹Waldemar Rymowicz

²Stefania Kinal

¹Maria Wojtatowicz

¹Izabela Musiał

²Rafał Bodarski

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza, Wrocław

²Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej
Akademia Rolnicza, Wrocław

1. Wstęp

Drożdże od lat stanowią cenny komponent mieszanek paszowych dla zwierząt monogastrycznych. Są one również źródłem związków mineralnych i witamin, a ich udział w mieszankach wynosi 2-5%. Wartość odżywcza drożdży paszowych zależy od zawartości w nich białka, jego składu aminokwasowego, tłuszczu, witamin i kwasów nukleinowych (3,12,17).

Przemysłowa produkcja drożdży paszowych opiera się głównie na surowcach węglowodanowych, takich jak: melasa, wywar melasowy, ługi posulfitowe, odpady skrobiowe i lignocelulozowe oraz serwatka. Ponadto wykorzystywane są również alkohole: etylowy i metylowy, a w latach siedemdziesiątych biomasę drożdży *Yarrowia lipolytica* produkowano na węglowodorach nafty (3,6).

W ostatnich latach ukazuje się coraz więcej prac dotyczących możliwości wykorzystania lipidów do produkcji *Single Cell Protein* (SCP). Wśród mikroorganizmów dobrze rosnących na tłuszczach wymienia się gatunki *Candida utilis*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida rugosa*, *Candida curvata*, *Geotrichum candidum* oraz *Yarrowia lipolytica* (8). Do produkcji biomasy tych mikroorganizmów stosowano różne oleje roślinne (sojowy, rzepakowy, palmowy), oleje zwierzęce lub odpady z przemysłu tłuszczowego i chemicznego, zawierające kwasy tłuszczowe, mieszaniny mydeł i tłuszczów neutralnych (13,18-20,24).

Zainteresowanie odpadowymi i ubocznymi produktami tłuszczowymi do produkcji SCP wynika z korzyści, jakie osiąga się produkując biomasę na takich źródłach węgla. Uzyskane w ten sposób drożdże charakteryzują się

podwyższoną zawartością tłuszczu w komórce, wynoszącą od 3 do 33%, w zależności od użytego szczepu i substratu, w którym ponad 90% kwasów tłuszczowych, to kwasy nienasycone o znacznym udziale (28-44%) NNKT (10, 14).

Efekty stosowania w mieszankach paszowych dla kurcząt rzeźnych zamiennie tanich tłuszczów odpadowych (2), drożdży *Trichosporon cutaneum* zawierających dużą ilość tłuszczu (5, 11) lub biomasy PEKILO (9) nie są jednoznaczne i na ogół kontrowersyjne. Z tego względu konieczna jest ocena wartości pokarmowej biomasy drożdży paszowych otrzymywanych na drodze biotechnologicznej.

Celem pracy była ocena biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica*, wyprodukowanej na surowym oleju rzepakowym i porafinacyjnych kwasach tłuszczowych, w warunkach zróżnicowanego źródła azotu i odczynu środowiska, jako ewentualnego komponentu mieszanek paszowych.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał badawczy

W badaniach wykorzystano biomase sześciu szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica*: A-10; A-101.1.22; ATCC 8661; ATCC 20324; W29 ura 3.302 i JM23/pINA 169 uzyskaną na substratach tłuszczowych i melasie w hodowlach stacjonarnych (opisanych w artykule „Dobór szczepów i składu podłoża do produkcji biomasy *Yarrowia lipolytica* na substratach tłuszczowych” — w tym numerze „Biotechnologii”).

2.2. Metody analityczne

2.2.1. Oznaczanie biomasy

Biomase oznaczano wagowo, przy czym próbę pobieraną z hodowli (10 cm³) wirowano przy 4000 obr/min, biomase filtrowano na sączkach firmy Synpor i suszono do stałej masy w temp. 105°C.

2.2.2. Energia brutto

Wartość energetyczną (WE) drożdży określano jako ciepło całkowitego spalania 1 grama s.m. drożdży w automatycznym kalorymtrze KL-10. Do spalania użyto drutu oporowego Kanthal ϕ 0,1 mm przy ciśnieniu tlenu 3,0 Mpa wewnątrz bomby kalorymetrycznej.

2.2.3. Aminokwasy

Aminokwasy oznaczano techniką chromatografii cieczowej wg Moore i Stein (15) używając analizatora aminokwasów typu Amino Acid Analyser T-339.

2.2.4. Wartość biologiczna białka

Wartość biologiczną białka (WB) oceniano metodą chemiczną, obliczając wskaźnik aminokwasowy metodą Osera (1). Tak oznaczona wartość biologiczna jest średnią geometryczną stosunku procentowego wszystkich niezbędnych aminokwasów w białku drożdży do tych aminokwasów w białku jaja kurzego, przyjętych za wzorzec.

2.2.5. Białko

Białko oznaczano metodą Kjedahla w aparacie typu Buchi 323.

2.2.6. Tłuszcz surowy

Tłuszcz oznaczano metodą Soxchleta używając do ekstrakcji eter etylowy.

3. Wyniki i dyskusja

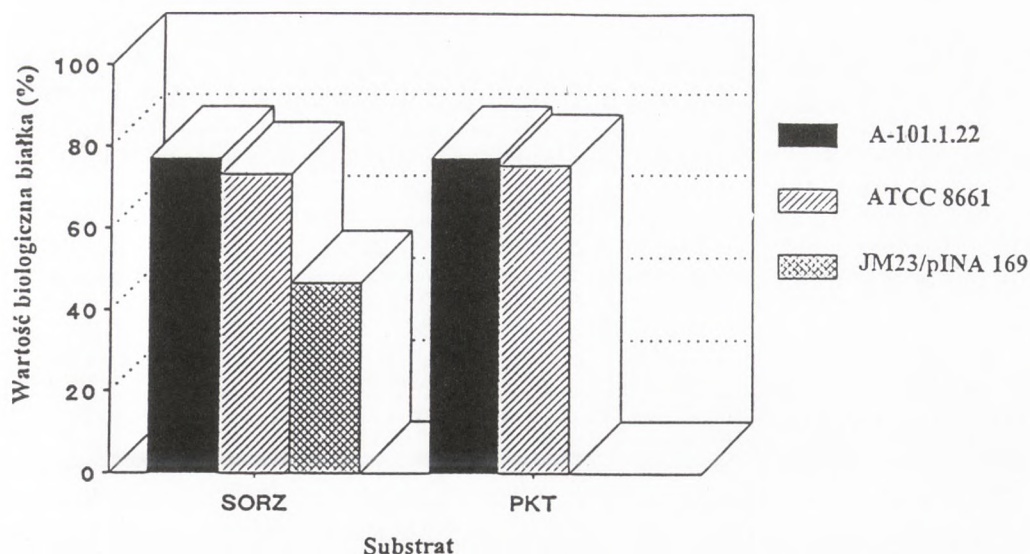
Drożdże *Y. lipolytica* dobrze rosły, dając wysoki plon biomasy, w pożywkach syntetycznych zawierających lipidy jako jedyne źródło węgla i energii. W porównaniu do tradycyjnych technologii produkcji drożdży paszowych, bazujących na węglowodanach, osiągnięto prawie 2-krotnie wyższą wydajność biomasy, co nadaje temu procesowi walory konkurencyjności. W zależności od użytego szczepu drożdży, wynosiła ona od 0,66 do 1,08 g/g wprowadzonego substratu. Transformanty mające uzdolnienia do wzrostu na sacharozie nagromadzały na melasie biomasę z wydajnością 0,49-0,51 g/g (tab. 1).

TABELA 1

WYDAJNOŚĆ WZROSTU DROŻDŻY NA RÓŻNYCH SUBSTRATACH I CHARAKTERYSTYKA OTRZYMANEJ BIOMASY

<i>Yarrowia lipolytica</i>	Rodzaj substratu								
	Olej rzepakowy			Porafinacyjne kwasy tłuszczowe			Melasa		
	Y g/g	WE MJ/kg	Białko (%)	Y g/g	WE MJ/kg	Białko (%)	Y g/g	WE MJ/kg	Białko (%)
A-101.1.22	0,75	24,8	36,5	0,70	27,5	34,1	brak wzrostu	—	—
A-10	0,79	25,5	37,5	0,80	25,3	34,5	brak wzrostu	—	—
ATCC 8661	1,08	25,2	33,7	0,95	24,5	39,4	brak wzrostu	—	—
ATCC 20324	0,85	27,8	31,3	0,76	24,4	42,1	brak wzrostu	—	—
JM23/pINA 169	0,66	20,5	50,9	0,70	21,0	48,9	0,39	20,8	34,2
W29 ura 3.302	brak wzrostu	—	—	brak wzrostu	—	—	0,45	19,5	29,2

(podłoże zawierało NH_4Cl jako źródło N, pH 5,3), Y — wydajność biomasy (g suchej biomasy/g wprowadzonego tłuszczu lub sacharozy), WE — wartość energetyczna.



Rys. 1. Wartość biologiczna białka różnych szczepów drożdży *Y. lipolytica*.

Poziom białka ogólnego w suchej masie drożdży był zróżnicowany i wynosił na substratach tłuszczowych 31,3 – 50,9%, na melasie 29,2 – 34,2%. Generalnie, poziom białka był zbyt niski jak na wymagania stawiane drożdżom paszowym, które wynoszą od 40 do 52% (16). Należy dodać, że spośród przebadanych szczepów jedynie JM23/pINA 169 zawierał około 50% białka. Stosunkowo niski poziom białka w badanych drożdżach mógł być spowodowany deficytem azotu w podłożu, co wymaga zoptymalizowania proporcji pomiędzy stężeniem źródła węgla i azotu.

Wartość energetyczna uzyskanej biomasy drożdży, kształtowała się w granicach 19,4 – 27,8 MJ/kg i była wyższa niż wartość podawana przez normy żywieniowe. Na podkreślenie zasługuje to, że drożdże wyprodukowane na lipidach miały średnio o 25% wyższą wartość energetyczną w porównaniu do uzyskanych na melasie. Wartość energetyczna biomasy szczepu JM23/pINA 169 wyprodukowana na tłuszczach i melasie była podobna i wynosiła 20,5 – 21,0 MJ/kg. Wysoka wartość energetyczna biomasy drożdżowej uzyskanej na tłuszczach jest korzystna z punktu widzenia żywieniowego. W praktycznym żywieniu młodych zwierząt, podane w mieszance drożdże wyprodukowane na tłuszczach dostarczają więcej potrzebnej zwierzętom energii.

Wartość biologiczna biomasy drożdżowej ściśle wiąże się z zawartością w niej niezbędnych aminokwasów. Oznaczony skład aminokwasowy trzech szczepów drożdży rosnących na oleju rzepakowym i porafinacyjnych kwasach tłuszczowych, wskazuje, że A-101.1.22 i ATCC 8661 bez względu na źródło węgla miały podobną wartość biologiczną, która wynosiła 73,1 – 77,1%. Natomiast biomasa szczepu JM23/pINA 169, zawierająca ponad 50% białka

ogólnego, miała niską wartość biologiczną 46,6% (rys. 1). Białko tego szczepu zawierało prawie 2 razy mniej lizyny, cystyny i fenyloalaniny w porównaniu do białek szczepów A-101.1.22 i ATCC 8661, zawierających podobną ilość aminokwasów niezależnie od zastosowanego surowca tłuszczowego. Zaobserwowano jedynie znaczny wzrost poziomu fenyloalaniny w drożdżach ATCC 8661, wyprodukowanych na porafinacyjnych kwasach tłuszczowych (tab. 2).

TABELA 2

SKŁAD AMINOKWASOWY DROŻDŻY *Y. lipolytica* OTRZYMANÝCH NA RÓŻNYCH SUBSTRATACH TŁUSZCZOWYCH (g/100 g białka)

Aminokwas	<i>Y. lipolytica</i> A-101.1.22		<i>Y. lipolytica</i> ATCC 8661		<i>Y. lipolytica</i> JM-23/pINA 169
	SORZ	PKT	SORZ	PKT	SORZ
lizyna	8,2	8,5	7,7	8,4	4,7
leucyna	9,7	11,0	9,1	10,5	5,5
izoleucyna	4,2	4,3	4,0	4,2	2,4
walina	4,7	4,7	4,6	4,8	2,7
metionina	1,2	1,3	1,0	1,2	0,6
cystyna	1,0	0,9	1,0	1,0	0,6
treonina	4,9	5,1	5,3	5,5	3,0
fenyloalanina	5,5	3,9	3,2	5,7	2,4
tryptofan	1,6	1,7	1,6	1,7	0,9

Przy wyborze szczepu produkcyjnego do biosyntezy SCP ważna jest nie tylko wysoka zawartość białka, jego skład aminokwasowy, lecz także wysoka wydajność i szybkość wzrostu drożdży oraz możliwość prowadzenia procesu w warunkach niesterylnych. Takie wymagania spełniał szczep ATCC 8661, który w niskim pH 3,5 wykazywał wysokie tempo wzrostu na porafinacyjnych kwasach tłuszczowych (dane nie publikowane), z tego względu szczep ten został wybrany do dalszych badań.

TABELA 3

CHARAKTERYSTYKA BIOMASY DROŻDŻY *Y. lipolytica* ATCC 8661 W HODOWLACH NA PKT PRZY ZRÓŻNICOWANYM ŹRÓDLE AZOTU I PH

Źródło azotu	pH	Plon biomasy (g/l)	Wartość biologiczna (%)	Tłuszcz (%)	Białko ogólne (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,3	22,1	79,7	11,9	35,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5	18,8	77,4	28,1	43,9
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,3	19,7	78,0	18,7	38,9
NH ₄ NO ₃	5,3	19,1	75,8	16,1	39,0
NH ₄ Cl	5,3	18,9	74,9	14,2	39,4

Mając na uwadze, że skład chemiczny biomasy drożdży zależy od składu pożywki i warunków hodowlanych (7), oceniono wpływ źródła azotu na poziom białka, jego skład aminokwasowy oraz zawartość tłuszczu w biomase drożdży *Y. lipolytica* ATCC 8661. Hodowle w pożywce z siarczanem amonowym prowadzono przy pH 5,3 i pH 3,5. Rodzaj użytych soli amonowych nie wpływał wyraźnie na ilość białka, która w hodowli w pH 5,3 kształtowała się w zakresie 35,4-39,4%. Wzrost zawartości białka z 35,4 do 43,9%, uzyskano w hodowli z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w pH 3,5 (tab. 3). Zawartość białka w drożdżach paszowych *Torula utilis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* czy *Kluyveromyces fragilis* wynosiła od 52 do 54%, w zależności od stosowanego substratu, a *Candida lipolytica* hodowana na n-alkanach gromadziła nawet do 65% białka (12,22). Wartość biologiczna białka wahała się w granicach od 74,9 do 79,7% (tab. 3). Uzyskana w badaniach Waslien i wsp. (23) wartość biologiczna drożdży paszowych *Candida utilis* była zróżnicowana w zależności od stosowanego szczepu i wynosiła od 51 do 87%. Należy dodać, że tak wysoka wartość biologiczna białka badanego szczepu ATCC 8661 wynikała z dużej zawartości w nim niezbędnych aminokwasów, a zwłaszcza fenyloalaniny i lizyny (tab. 4). Jedynie poziom metioniny był niższy w porównaniu do standardów FAO (tab. 5) (4). Zmiana parametrów hodowlanych lub ingerencja w materiał genetyczny mikroorganizmu, poprzez mutacje lub fuzje protoplastów, może podnieść zawartość aminokwasów siarkowych w biomase drożdży. Według Halasza i wsp. (7) ilość metioniny w białku można zwiększyć poprzez ograniczenie natlenienia brzeczki hodowlanej lub zmianę składu pożywki.

TABELA 4

POZIOM NIEZBEDNYCH AMINOKWASÓW W BIAŁKU DROŻDŻY *Y. lipolytica* ATCC 8661 (g/100g białka)

Aminokwas	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 5,3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 3,5	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 5,3	NH_4NO_3 pH 5,3	NH_4Cl pH 5,3
lizyna	8,6	8,2	8,0	7,7	8,4
leucyna	11,3	9,5	10,1	9,8	10,5
izoleucyna	4,0	4,0	4,1	4,2	4,2
walina	4,9	4,7	4,8	4,8	4,8
metionina	1,3	1,3	1,3	1,1	1,2
cystyna	1,6	1,1	1,5	1,4	1,0
tryptofan	1,7	1,6	1,6	1,7	1,6
treonina	5,5	5,1	5,3	4,5	5,5
fenyloalanina	5,1	6,1	4,9	5,3	5,7

dane dotyczą hodowli przedstawionych w tab. 3

TABELA 5
PORÓWNANIE SKŁADU AMINOKWASOWEGO RÓŻNYCH DROŻDŻY (g/100g białka)

Aminokwas	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 8661 PKT	<i>Y. lipolytica</i> n-alkany (12)	<i>S. Cerevisiae</i> melasa (12)	Standardy FAO dla drożdży (4)
cystyna	1,1	1,1	1,6	0,9
izoleucyna	4,0	4,5	5,5	3,1
leucyna	9,5	7,0	7,9	7,7
lizyna	8,2	7,0	8,2	6,4
metionina	1,3	1,8	2,5	1,5
fenyloalanina	6,1	4,4	4,5	3,8
tyrozyna	5,1	4,9	4,8	3,7
tryptofan	1,6	1,4	1,2	1,2
walina	4,7	5,4	5,5	3,8

W hodowli z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w pH 3,5, drożdże zawierały także najwyższą ilość tłuszczu 28,1% (tab. 3). W hodowlach z innymi źródłami azotu, poziom tłuszczu w suchej masie drożdży był w granicach 11,9-18,7%. Według Montet i wsp. (13,14) drożdże *Y. lipolytica* akumulują dużą ilość *Single Cell Lipid*, które zawierają cenne z punktu widzenia żywieniowego nienasycone kwasy tłuszczowe, w tym około 29% kwasu linolenowego. Natomiast na węglowodanach biomasa drożdży *Y. lipolytica* zawierała poniżej 2% tłuszczu (10). Inne szczepy drożdży hodowane na serwatce, etanolu, n-parafinach lub melasie zawierały odpowiednio 1,0, 7,0, 8,1 i 6,3% tłuszczu (12).

Mając na uwadze, że istnieje możliwość częściowego zastąpienia śruty sojowej drożdżami, w badaniach Fritz i wsp. (5) wykazano, że drożdże *Trichosporon cutaneum* zawierające dużą ilość tłuszczu, nie miały wpływu na polepszenie wyników produkcyjnych. Z badań Tiews i wsp. (21) wynika, że w mieszankach dla kurcząt brojlerów można stosować do 15% drożdży alkanowych z gatunku *Y. lipolytica* o nazwie handlowej Lavera lub Torpina. W Polsce drożdże alkanowe nie są dopuszczone do produkcji pasz. Możliwość zastąpienia śruty sojowej w mieszankach dla kurcząt brojlerów biomasa „PE-KILO”, potwierdzili w swoich badaniach Korniewicz i wsp. (9). Natomiast Barteczko i Kamiński stosując jedynie tanie tłuszcze odpadowe jako energetyczne zamienniki zbóż, nie wykazali negatywnego ich wpływu na zdrowotność ptaków i jakość produktu finalnego (2).

Będąc przedmiotem badań drożdże *Y. lipolytica* odznaczały się wysoce dynamicznym wzrostem na substratach tłuszczowych. Biomasa drożdży charakteryzowała się wysoką wartością biologiczną i energetyczną. Ze względu jednak na zbyt niską zawartość białka, konieczna będzie optymalizacja hodowli i składu pożywki w celu uzyskania wysokiej wartości produktu finalnego, który może znaleźć zastosowanie jako drożdże paszowe.

Literatura

1. Armstrong D. G., Mitchell H. H., (1955), *J. Anim. Sci.*, 14, 49-51.
2. Barteczko J., Kamiński J., (1992), *Biuletyn AR, Kraków*, 301, 25-41.
3. Crueger W., Crueger A., (1992), *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Ed. Thomas D. Brock., Academic Press, New York, 2nd ed., 16, 306-316.
4. FAO/WHO, (1989), *Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*, Rome, FAO.
5. Fritz Z., Kinal S., Schleicher A., Lipstein B., Kramarz M., (1991), *Zesz. Nauk. Zoot.*, AR, Wrocław, 225, 235-244.
6. Ghaly A. E., Ben-Hassan R. M., (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 50, 79-94.
7. Halasz A., Barath A., Matrai B., (1988), *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 174, 374-375.
8. Koh J. J., Kodama P., Minoda Y., (1983), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 1207-1212.
9. Korniewicz A., Mazanowska A., Gwara T., (1980), *Rocz. Nauk. Zoot., Monografie i Rozprawy*, 16, 75-87.
10. Kot B., Neryng A., Sobczak E., (1969), *Przem. Ferment. Rol.*, 12, 16-18.
11. Kramarz M., (1991), *Prace Nauk. AE, Wrocław*, 605, 24-31.
12. Litchfield J. M., (1979), *Production of single-cell protein for use in food or feed*, in: *Microbial Technology*, Eds. Pepler H. J., Perlman C., Academic Press, New York, vol. 1, 93-95.
13. Monet D., Ratomahenina R., Ba A., Pina M., Grailla J., Galzy P., (1983), *J. Ferment. Technol.*, 61, 417-420.
14. Monet D., Ratomahenina R., Galzy P., Pina M., Grailla J., (1985), *Biotechnol. Lett.*, 10, 733-736.
15. Moore S., Stein W. H., (1963), *Methods Enzymol.*, 6, 819-831.
16. PN-81/A-79006. Drożdże paszowe suszone.
17. 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.
18. Riaublanc A., Boze H., Domuyneck M., Maulin G., Ratomahenina R., M., Grailla J., Galzy P., (1992), *Fat. Sci. Technol.*, 2, 46-51.
19. Takata Y., (1992), *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 16, 306-313.
20. Triboli E. P. D. R., Jurkiewicz C. H., Borzani W., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 385-388.
21. Tiews J., Gropp J., Schulz V., Ebersdorfer H., Beck H., (1974), *Tieren. Futtermittel.*, 34, 86-113.
22. Vazquez D., Lage M. A., Parajo J. C., Alonso J. L., (1993), *Alimentaria*, 224, 99-104.
23. Waslien C. I., Calloway D. H., Margen S., Costa F., (1970), *J. Food Sci.*, 35, 294-298.
24. Yamauchi T., Sida M., Othake Y., (1986), *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 33, 125-133.

Characteristic of *Yarrowia lipolytica* biomass produced on lipid substrates

Summary

The production of biomass by *Yarrowia lipolytica* on crude rapeseed oil and waste fatty acids and its characteristics were studied. The biomass obtained in both lipid media had high biological value in the range of 73-78%. The amount of essential aminoacids was in agreement with the FAO standards for fodder yeast, with lysine and phenylalanine which were present in the yeast biomass in higher amounts. The biomass contained 31,3-50,9% of protein and 11,9-28,1% of lipid depending on the yeast strain used. *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 turned out to be the most suitable strain for the production of SCP on lipid substrates.

Key words:

Yarrowia lipolytica, crude rapeseed oil, waste fatty acids, Single-Cell-Protein, fodder yeast.

Adres do korespondencji:

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