

PRÓBA ZASTOSOWANIA GLICEROLU I ZIEMNIACZANEJ WODY SOKOWEJ DO PRODUKCJI KAROTENOIDÓW PRZEZ DROŹDŻE *RHODOTORULA GRACILIS*

Anna M. Kot[✉], Stanisław Błażejczak, Agnieszka Kurcz, Iwona Gientka, Joanna Bryś, Kamil Piwowarek, Kamil Konarski
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem badań było określenie zdolności biosyntezy karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula gracilis* podczas hodowli wglębnych w podłożach zawierających ziemniaczaną wodę sokową oraz glicerol. Największy plon biomasy komórkowej (ponad $30 \text{ g ss} \cdot \text{dm}^{-3}$) stwierdzono w podłożach z dodatkiem 3 i 5% glicerolu. Po hodowli w podłożu z dodatkiem 3% glicerolu uzyskano najwyższy stopień wykorzystania glicerolu (85,7%) oraz białka (69,3%), a także znaczną redukcję wskaźnika ChZT (84,8%) podłoża. Wysookie stężenie związków stanowiących źródło węgla zahamowało biosyntezę karotenoidów przez badane drożdże, a ich zawartość w biomacie po hodowli w podłożach z glicerolem była ponad trzy razy mniejsza ($34,6\text{--}40,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{ss}$) w porównaniu do podłoża kontrolnego ($142,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{ss}$). Dominującym związkiem syntetyzowanym przez drożdże w podłożach z glicerolem był torulen, a jego udział stanowił 66,9–69,7% ogólnej zawartości karotenoidów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badany szczep drożdży może stać się w przyszłości nowym źródłem karotenoidów, jednak z uwagi na mniejszą objętościową produktywność tych związków ($0,9\text{--}1,23 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) konieczne są dalsze badania w celu zwiększenia wydajności ich biosyntezy w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem.

Słowa kluczowe: karotenoidy, glicerol, ziemniaczana woda sokowa, *Rhodotorula gracilis*

WSTĘP

Karotenoidy znalazły szerokie zastosowanie w różnych branżach przemysłu. Związki te, ze względu na swoje prozdrowotne właściwości, są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. W chwili obecnej poszukuje się nowych

[✉]anna_kot@sggw.pl

metod pozyskiwania karotenoidów, a alternatywą dla chemicznej syntezy może być wykorzystanie mikroorganizmów jako bioreaktorów do ich produkcji [Kot i in. 2016]. Zdolność biosyntezy barwników karotenoidowych mają różne drożdże, w tym drożdże z rodzaju *Rhodotorula* wytwarzające β -karoten, torulen i torularodynę [Frengova i Beshkova 2009]. Najbardziej pożądanym związkiem jest β -karoten, powszechnie stosowany jako barwnik do żywności oraz suplement diety [Maldonado i in. 2008]. Torulen i torularodyna nie są obecnie wykorzystywane przemysłowo, jednak ze względu na swoje właściwości mogą w przyszłości być stosowane jako składniki żywności bądź produktów kosmetycznych [Zoz i in. 2015].

Najważniejszą zaletą procesu mikrobiologicznej syntezy karotenoidów jest możliwość zmniejszania jego kosztów poprzez zastosowanie tanich składników podłoży hodowlanych [Bhosale i Gadre 2011], takich jak odpady przemysłowe. Jednym z takich surowców może być gliceryna powstająca podczas produkcji biodiesla [Cutzu i in. 2013]. Surowa gliceryna zawiera głównie glicerol (50–70%), metanol (10–20%), sole (5–10%), wodę (3–10%) oraz wolne kwasy tłuszczowe (1–5%) [Quispe i in. 2013]. W dużych rafineriach frakcja glicerynowa jest poddawana zabiegom oczyszczania, jednak ze względu na dużą energochłonność oraz koszty zakupu instalacji mniejsze przedsiębiorstwa produkujące biodiesel mają poważne kłopoty z jej utylizacją [Gaca 2006]. Ze względu na dużą zawartość glicerolu frakcja glicerynowa może być źródłem węgla w podłożach hodowlanych. Kolejnym niezbędnym składnikiem podłoży są związki będące źródłem azotu. Alternatywnym składnikiem podłoży hodowlanych może stać się odpadowa odbiałczona ziemniaczana woda sokowa, która powstaje w procesie produkcji skrobi ziemniaczanej. Zawiera ona duże ilości związków azotowych (ok. 1–1,5%) i składników mineralnych (ok. 1%). Najczęściej ziemniaczaną wodę sokową wykorzystuje się do zraszania pól i łąk, a takie działania mogą doprowadzić do intensyfikacji niekorzystnego dla środowiska naturalnego procesu eutrofizacji wód [Kot i in. 2015b].

Celem pracy była ocena możliwości biosyntezy karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach przygotowanych wyłącznie z glicerolu (źródło węgla) oraz odbiałczonej ziemniaczanej wody sokowej (źródło azotu oraz składników mineralnych).

MATERIAŁ I METODY

Ziemniaczaną wodę sokową przygotowano w warunkach laboratoryjnych z ziemniaków odmiany Irga, według metodyki opracowanej na podstawie etapów procesu technologicznego otrzymywania skrobi ziemniaczanej [Kot i in. 2015a]. Ziemniaczana woda sokowa zawierała $1,42 \text{ g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$ białka ogółem (oznaczonego metodą Kjeldahla) oraz $3,29 \text{ g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$ cukrów redukujących (oznaczonych metodą Millera).

Materiałem biologicznym do badań były drożdże *Rhodotorula gracilis* pochodzące z kolekcji czystych kultur Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Inokulum drożdży przygotowano poprzez zaszczipienie ezą 100 cm^3 płynnego podłoża YPD (2% glukozy, 2% peptonu, 1% ekstraktu drożdżowego, pH 5,0). Hodowlę prowadzono na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej ($200 \text{ obr} \cdot \text{min}^{-1}$, SM-30 Control, Edmund Bühler, Niemcy), w temperaturze 28°C przez 24 h. Po tym czasie do jałowych gilz przelano 10 cm^3 płynu z hodowli inokulacyjnej i odwirowano przez 10 min przy prędkości odwirowania

3500 obr·min⁻¹. Zlewano supernatant, a do biomasy dodawano 10 cm³ jałowej wody destylowanej, dokładnie wymieszano i ponownie odwirowano przy takich samych parametrach. Do przemytej biomasy dodawano 10 cm³ odpowiedniego podłoża, a następnie tak przygotowany materiał biologiczny przeniesiono do jałowych kolb płaskodennych zawierających podłoża hodowlane.

W badaniach zastosowano trzy podłoża doświadczalne, w których jako źródło węgla wykorzystano glicerol (cz.d.a), a jako źródło azotu odbiałczoną ziemniaczną wodę sokową. Glicerol dodawano do wody sokowej w ilości 3, 5 oraz 10%. W dalszej części pracy podłoża doświadczalne oznaczono odpowiednio następującymi skrótami: W+G3%, W+G5% oraz W+G10%. Jako podłoże kontrolne wykorzystano niewzbogaconą w dodatkowe źródło węgla ziemniaczną wodę sokową. Kwasowość czynną podłoży ustalono na początku hodowli na poziomie pH 5,0 ±0,1. Hodowle wglębne drożdży prowadzono na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej, przez 96 h, stosując prędkość wytrząsania 200 obr·min⁻¹ i temperaturę 28°C.

Gęstość optyczną hodowli drożdży określano metodą spektrofotometryczną ($\lambda = 600$ nm), a plon biomasy komórkowej metodą wagową [Kot i in. 2015b]. Podczas hodowli w podłożach pohodowlanych oznaczano zawartość białka ogółem (metoda Kjeldahla), cukrów redukujących (metoda Millera) oraz zawartość glicerolu metodą chemiczną [BN-76/6026-02]. Po zakończeniu hodowli, w Centrum Wodnym SGGW oznaczano dodatkowo wskaźnik chemicznego zapotrzebowania na tlen podłoży pohodowlanych metodą dwuchromianową.

Oznaczenie zawartości karotenoidów w biomase drożdży wykonywano metodą spektrofotometryczną, po uprzedniej dezintegracji ściany komórkowej za pomocą DMSO, według metodyki opisanej przez Cutzu i innych [2013]. Biomase komórkową zawieszano w 2 cm³ DMSO (ogrzanego do 60°C) oraz dodawano 0,5 g szklanych kulek (o średnicy 500 μ m). Próbkę intensywnie wytrząsano na vortexie przez 5 min, po czym inkubowano w łaźni wodnej (WNB 7-45 Memmert) przez 15 min, w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu próbek do temperatury pokojowej dodawano do nich po 2 cm³ acetonu, 2 cm³ eteru naftowego z 0,25-procentowym BHT, 2 cm³ 20-procentowym chlorku sodu, a następnie energicznie wytrząsano przez 5 min i odwirowano przy 3500 obr·min⁻¹ przez 5 min. Fazę eterową zawierającą karotenoidy przenoszono do nowych próbek, a procedurę powtarzano, aż do całkowitego odbarwienia próbki biomasy drożdży. Frakcje eterowe po ekstrakcji łączono i mierzono absorbancję (UV-1800UV/VIS, RayLeigh) przy $\lambda = 450$ nm. Wynik odczytano z krzywej wzorcowej przygotowanej dla roztworu β -karotenu (Sigma Aldrich) oraz obliczono zawartość karotenoidów w biomase drożdży (μ g·g⁻¹ss) w przeliczeniu na β -karoten. Karotenoidy identyfikowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem UV (Agilent 1200 Series, Palo Alto, CA, USA). Rozdział prowadzono na kolumnie analitycznej C18 (Luna HILIC – Phenomenex, 250 × 4,6 mm, 5 μ m). Temperaturę termostatu, w którym została umieszczona kolumna, utrzymywano przez cały czas analizy na poziomie 25°C. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu, izopropanolu i octanu etylu zmieszanych w stosunku objętościowym 4:4:2. Prędkość przepływu ustalono na 0,7 cm³ obr·min⁻¹ (izokratycznie), a detektor pracował przy $\lambda = 457$ nm [Bhosale i Gadre 2001]. Identyfikację β -karotenu prowadzono na podstawie czasu retencji standardu (Sigma-Aldrich), a torulen i torularodynę identyfikowano na podstawie czasów retencji wzorców rozdzielonych za pomocą

cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC). Jako fazę stacjonarną zastosowano żel silikonowy (5×20 cm, Kieselgel 60 F254, Fulka), a jako fazę ruchomą mieszaninę acetonu i heksanu (3:7) [Kim i in. 2004].

Wyniki analizowano w programie R, w zakładce RCommander (wersja i386 2.15.3). Rozkład normalny danych sprawdzano za pomocą testu Shapiro-Wilk, a jednorodność wariancji za pomocą testu Levene'a. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DISKUSJA

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że badany szczep drożdży *Rhodotorula gracilis* był zdolny do wzrostu zarówno w podłożu kontrolnym, jak i w podłożach doświadczalnych. Czynnikiem w największym stopniu determinującym wzrost drożdży była zawartość związków stanowiących źródło węgla. Po hodowli w podłożach wzbogaconych glicerolem plon biomasy komórkowej (ponad $30 \text{ g ss}\cdot\text{dm}^{-3}$) po 96 h był ponad dwukrotnie wyższy niż w podłożu kontrolnym ($13,4 \text{ g ss}\cdot\text{dm}^{-3}$). W podłożu W+G10% wzrost drożdży był istotnie niższy niż w pozostałych podłożach z glicerolem ($26,0 \text{ g ss}\cdot\text{dm}^{-3}$), co wynikało prawdopodobnie z podwyższonego ciśnienia osmotycznego środowiska hodowlanego. Podobną zależność odnotowano również w innych pracach, w których stosowano wysokie dawki tego związku jako źródło węgla w hodowli drożdży z rodzaju *Rhodotorula* [Saenge i in. 2011, Yen i in. 2012, Błażej i in. 2014].

W literaturze dostępne są wyniki badań dotyczące wykorzystania glicerolu jako źródła węgla do hodowli drożdży z rodzaju *Rhodotorula*, jednak w podłożach doświadczalnych najczęściej źródłem związków azotowych są sole mineralne, ekstrakt drożdżowy lub pepton. Przykładem są badania Gientki i innych [2016], w których jako źródło azotu zastosowano ekstrakt drożdżowy oraz pepton, a jako źródło węgla glicerol w dawce 5%. Po 72 h hodowli plon biomasy komórkowej drożdży *R. gracilis* wynosił $9,43 \text{ g ss}\cdot\text{dm}^{-3}$ i był znacząco mniejszy w porównaniu do wyników osiągniętych w niniejszych badaniach, co świadczy o stymulującym działaniu składników ziemniaczanej wody sokowej na wzrost drożdży *R. gracilis*.

Drożdże *R. gracilis* wykazały zdolność do metabolizowania cukrów redukujących, glicerolu oraz związków białkowych obecnych w podłożach hodowlanych. W dwóch pierwszych dobach hodowli, czyli w czasie najbardziej intensywnego wzrostu, drożdże wykorzystywały przede wszystkim łatwo przyswajalne cukry redukujące zawarte w ziemniaczanej wodzie sokowej. Po wyczerpaniu ich zasobów w trzeciej dobie rosnące komórki drożdży zaczęły metabolizować obecny w środowisku hodowlanym glicerol (rys.). Najwyższy stopień wykorzystania tego związku odnotowano w podłożach, w których drożdże wykazały najintensywniejszy wzrost. W podłożach W+G3% oraz W+G5% komórki drożdży wykorzystywały odpowiednio 85 i 61% zasobów tego związku (tab. 1).

Zarówno podczas hodowli w podłożu kontrolnym, jak i w podłożach doświadczalnych, badany szczep drożdży najintensywniej metabolizował związki azotowe w trakcie pierwszych 48 h, czyli w fazie najintensywniejszego wzrostu (rys.). Po 96 h hodowli w podłożu W+G3% stopień wykorzystania białka ogółem wynosił prawie 70%, a w pozostałych pod-

Tabela 1. Plon biomasy komórkowej, procentowy stopień wykorzystania glicerolu, białka ogółem oraz cukrów redukujących z podłoży oraz stopień redukcji wskaźnika ChZT po 96 h hodowli drożdży *R. gracilis*Table 1. Biomass yield, the percentage level of glycerol, protein and reducing sugars usage from the media and level of the COD index reduction after 96 h of cultivation *R. gracilis* yeast

Podłoże Medium*	Plon biomasy Biomass yield [g ss·dm ⁻³]	Stopień wykorzystania glicerolu Level of glycerol usage [%]	Stopień wyko- rzystania białka ogółem Level of protein usage [%]	Stopień wykorzysta- nia cukrów reduku- jących Level of reducing sugars usage [%]	Stopień reduk- cji wskaźnika ChZT – Level of COD index reduction [%]
W	13,4 ± 0,7 ^{c*}	–	52,9 ± 4,3	94,4 ± 1,0	47,3 ± 8,0
W+G3%	30,4 ± 1,1 ^a	85,7 ± 3,9	69,3 ± 1,0	94,3 ± 0,5	84,8 ± 0,8
W+G5%	30,2 ± 2,1 ^a	61,3 ± 4,4	66,1 ± 2,6	94,5 ± 0,9	59,5 ± 4,3
W+G10%	26,0 ± 0,6 ^b	28,1 ± 2,1	62,1 ± 1,8	94,5 ± 0,4	19,7 ± 2,6

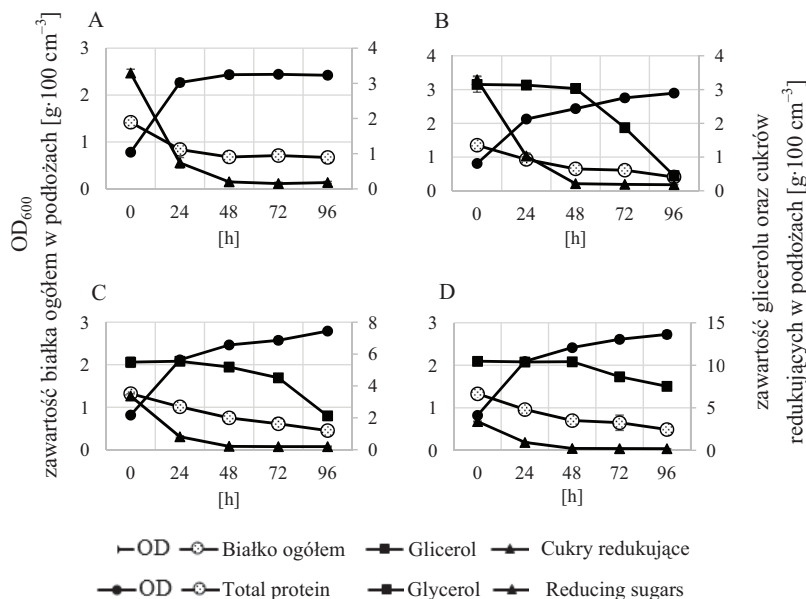
*Uwzględniono wartość odchyłeń standardowych oraz podano wyniki testu Tukeya ($\alpha = 0,05$) wykonanego w ramach tych samych godzin hodowli (a, b... – indeksy oznaczają grupy homogenne).

*The values of the standard deviation were considered and the results of Tukey's test ($\alpha = 0,05$) within the same hours of cultivation (a, b... indexes denote homogeneous groups) were reported.

łożach doświadczalnych był tylko nieznacznie niższy (tab. 1). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że istnieje możliwość jednoczesnej częściowej biodegradacji tych dwóch odpadów na drodze mikrobiologicznej, co potwierdzono, oznaczając wskaźnik chemicznego zapotrzebowania na tlen. Odbiałczona ziemniaczana woda sokowa charakteryzowała się dużą początkową wartością wskaźnika ChZT, który wynosił ponad 59 g O₂·dm⁻³. Dodatek 3, 5 lub 10% glicerolu do wody sokowej podwyższył jego wartość odpowiednio do 83, 110 oraz 196 g O₂·dm⁻³. Po 96 h hodowli drożdży *R. gracilis* najwyższy stopień redukcji wskaźnika ChZT (84,8%) stwierdzono po hodowli w podłożu z dodatkiem 3% glicerolu, a jego wartość wynosiła nieco ponad 12 g O₂·dm⁻³. Pozostałe podłoża doświadczalne charakteryzowały się o wiele większymi wartościami wskaźnika ChZT, co wynikało z obecności pozostałości niezmetabolizowanego przez drożdże glicerolu.

Największą zawartość karotenoidów w biomacie komórkowej drożdży *R. gracilis* stwierdzono po hodowli w podłożu kontrolnym z ziemniaczaną wodą sokową. Po 96 h zawartość karotenoidów w biomacie komórkowej drożdży uzyskanej po hodowli w podłożu kontrolnym wynosiła 142,6 µg·g⁻¹ ss, a w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem była ponad trzy razy niższa (34,6 – 40,9 µg·g⁻¹ ss). Na podstawie uzyskanych wyników obliczono objętościową produktywność karotenoidów (tab. 2), która jest zależna od plonu biomasy komórkowej. Największą produktywność odnotowano po hodowli drożdży w podłożu kontrolnym bez dodatku glicerolu (1,92 mg·dm⁻³). Znacznie mniejszą produktywność karotenoidów (0,9–1,23 mg·dm⁻³) miały hodowle prowadzone w podłożach z dodatkiem glicerolu, mimo iż całkowity plon biomasy komórkowej był w nich znacznie większy.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wysokie stężenie związków stanowiących źródło węgla w podłożach doświadczalnych zahamowało biosyntezę barwników karotenoidowych przez badany szczep drożdży. Podobną zależność odnotowali El-Banna i inni [2012], prowadząc badania nad wpływem różnych czynników środowiska na biosyntezę karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula glutinis*. Autorzy zastosowali



Rys. Zmiany gęstości optycznej (OD), zawartości białka ogółem, glicerolu oraz cukrów redukujących podczas hodowli drożdży *R. gracilis* (A – W, B – W+3%G, C – W+5%G, D – W+10%G)

Fig. Changes in optical density (OD) and in the content of total protein, glycerol and reducing sugars during the cultivation *R. gracilis* yeast (A – W, B – W+3%G, C – W+5%G, D – W+10%G)

jako źródło węgla glukozę w stężeniach (0,625, 1,25, 2,50, 3,75 i 5,0%). Po hodowli w podłożach zawierających od 0,625 do 2,5% tego związku zawartość karotenoidów w biomase komórkowej drożdży była zbliżona i wahała się w zakresie 314–371 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ss. Przy większych dawkach glukozy, podobnie jak w niniejszej pracy, nastąpiło znaczące zmniejszenie ich zawartości (125–142 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ss).

Wiadomo, że biosynteza karotenoidów w komórkach drożdży ma miejsce w późnej fazie ich stacjonarnego wzrostu [Braunwald i in. 2013]. Charakter zmian wartości OD podczas hodowli w podłożach doświadczalnych (rys.) wskazuje, że do 96 h nie została osiągnięta późna faza stacjonarna. Związki stanowiące źródło węgla również nie zostały w pełni zmetabolizowane, co uzasadnia konieczność wydłużenia czasu hodowli.

Przeprowadzona analiza profilu poszczególnych karotenoidów wykazała, że badany szczep drożdży w zastosowanych podłożach hodowlanych syntetyzował w największej ilości torulen (61–70%) oraz β -karoten (26–34%). Choć zakłada się, że drożdże z rodzaju *Rhodotorula* syntetyzują głównie torulen i torularodynę [Zoz i in. 2015], to udział torularodyny po hodowli we wszystkich podłożach był znikomy (2–3,8%). Stwierdzono również, że dodatek glicerolu do ziemniaczanej wody sokowej intensyfikował biosyntezę torulenu zmniejszał się natomiast udział β -karotenu (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość karotenoidów w biomacie drożdży *R. gracilis* i ich objętościowa produktywność podczas hodowli w podłożu kontrolnym i podłożach doświadczalnych oraz udział procentowy β -karotenu, torulenu i torularodiny po 96 h hodowli

Table 2. Carotenoid content in *R. gracilis* yeast biomass and their volumetric productivity during the cultivation in control and experimental media and percentage contribution of β -carotene, torulene and torularhodin after 96 h of cultivation

Podłoże Medium	Zawartość karotenoidów w biomacie drożdży Carotenoid content in yeast biomass [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ss] ^a	Objętościowa produktywność karotenoidów Volumetric carotenoid productivity [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$] ^a	Profil karotenoidów – Carotenoids profile [%] ^a		
			β -karoten β -carotene	Torulen Torulene	Torularodyna Torularhodin
W	142,6 \pm 20,9 ^a	1,92 \pm 0,37 ^a	33,9 \pm 1,5 ^b	61,4 \pm 2,5 ^b	3,8 \pm 0,8 ^a
W+G3%	40,2 \pm 7,3 ^b	1,22 \pm 0,25 ^b	29,7 \pm 0,6 ^a	67,1 \pm 2,0 ^a	2,0 \pm 0,7 ^b
W+G5%	40,9 \pm 2,4 ^b	1,23 \pm 0,15 ^b	26,4 \pm 2,0 ^a	69,7 \pm 2,6 ^a	2,9 \pm 0,4 ^a
W+G10%	34,6 \pm 4,8 ^b	0,90 \pm 0,04 ^c	29,6 \pm 2,8 ^a	66,9 \pm 2,5 ^a	2,8 \pm 0,9 ^a

*Uwzględniono wartość odchyień standardowych oraz podano wyniki testu Tukey'a ($\alpha = 0,05$), a, b... – indeksy oznaczają grupy homogenne.

The values of the standard deviation were considered and the results of Tukey's test ($\alpha = 0,05$) were reported, a, b... – indexes denote homogeneous groups.

WNIOSKI

1. Badany gatunek drożdży *Rhodotorula gracilis* wykazał zdolność wzrostu w podłożu kontrolnym oraz podłożach doświadczalnych, a czynnikiem w największym stopniu determinującym wzrost drożdży był zastosowany dodatek glicerolu. Największy plon biomasy komórkowej (ponad 30 g ss·l⁻¹) stwierdzono przy stężeniu glicerolu na poziomie 3% i 5%.
2. Drożdże *R. gracilis* wykazały zdolność do biosyntezy karotenoidów podczas hodowli w głębszych prowadzonych w podłożu kontrolnym oraz podłożach doświadczalnych. Największą zawartość karotenoidów ogółem w biomacie drożdży (142,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ss) stwierdzono po hodowli w podłożu z ziemniaczaną wodą sokową (bez suplementacji glicerolem), a ich zawartość w biomacie po hodowli w podłożach wzbogaconych dodatkiem glicerolu była ponad trzy razy mniejsza (34,6–40,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ss).
3. Wzbogacenie ziemniaczanej wody sokowej w dodatkowe źródło węgla w postaci glicerolu (3%) pozwoliło na efektywne wykorzystanie zarówno glicerolu (85,7%), jak i substancji białkowych (69,3%), a także umożliwiła znaczną redukcję wskaźnika ChZT (84,8%) podłoża pohodowlanego po 96 h.
4. Drożdże zastosowane jako materiał doświadczalny mogą stać się nowym źródłem barwników karotenoidowych o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym. Dalsze badania ukierunkowane będą na optymalizację warunków hodowli badanego szczepu drożdży w celu wydajnej biosyntezy tłuszczu i karotenoidów.

LITERATURA

- Bhosale P.B., Gadre R.V., 2001. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55(4), 423–427.
- Błażej S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Róžańska L., Maszewska M., 2014: Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową wzbogaconą glicerolem. ZPPNR, 576, 3–12.
- BN-76/6026-02. Gliceryna surowa. Wydawnictwa Normalizacyjne Alfa, Warszawa.
- Braunwald T., Schwemmlin L., Graeff-Hönniger S., French W.T., Hernandez R., Holmes W.E., Claupein W., 2013. Effect of different C/N ratios on carotenoids and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 6581–6588.
- Cutzu R., Coi A., Rosso F., Bardi L., Ciani M., Budroni M., Zara G., Zara S., Mannazzu I., 2013. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. World J. Microbiol. Biotechnol. 29(6), 1009–1017.
- El-Banna A.A., El-Razek A.A.M., El-Mahdy A.R., 2012. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. Food Nutr. Sci. 3, 64–71.
- Frengova G.I., Beshkova D.M., 2009: Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36(2), 163–180.
- Gaca J., 2006. Faza glicerynowa po produkcji biodiesla – odpad czy cenny surowiec? Czysta Energia 11, 34–35.
- Gientka I., Gadaszewska M., Błażej S., Kieliszek M., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Róžańska L., Kot A.M., 2016. Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol. Eur. Food Res. Technol., doi:10.1007/s00217-016-2742-9.
- Kim B.K., Park .P.K., Chae H.J., Kim E.Y., 2004. Effect of phenol on β -carotene content in total carotenoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. Korean J. Chem. Eng. 21(3), 689–692.
- Kot A.M., Błażej S., Gientka I., Stasiak-Róžańska L., Kieliszek M., 2015a. Kinetyka wzrostu wybranych szczepów drożdży z rodzaju *Rhodotorula* w podłożach z ziemniaczaną wodą sokową i glicerolem. W: J. Stadnik, I. Jackowska (red.). Bezpieczeństwo zdrowotne żywności. Aspekty mikrobiologiczne, chemiczne i ocena towaroznawcza, 87–95.
- Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I., 2015b. Biodegradation of deproteinized potato wastewater and glycerol during cultivation of *Rhodotorula glutinis* yeast. Electron. J. Biotechnol. 18(6), 428–432.
- Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M., 2016a. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100(14), 6103–6117.
- Maldonado I.R., Rodriguez-Amaya D.B., Scamparini A.R.P., 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food Chem. 107(1), 145–150.
- Saenge C., Cherisilp B., Suksaroge T., Bourtoom T., 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochem. 46, 210–218.
- Quispe C.A.G., Coronado C.J.R., Carvalho J.A., 2013. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. Renew. Sust. Energy Rev. 27, 475–493.
- Yen W.H., Yang Y., Yu Y.H., 2012. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. J. Biosci. Bioeng. 114(4), 453–456.

Zoz L., Carvalho J.C., Soccol V.T., Casagrande T.C. Cardoso L., 2015. Torularhodin and torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics – a review. Braz. Arch. Biol. Technol. 58(2), 278–288.

AN ATTEMPT TO APPLICATION GLYCEROL AND POTATO WASTEWATER TO PRODUCTION CAROTENOIDS BY *RHODOTORULA GRACILIS* YEAST

Summary. Carotenoids belong to the group of pigments widely used in different industries. Nowadays it is being looked for new methods of producing this compounds, and the use of microorganisms can constitute an new alternative for chemical synthesis. In order to reduce the costs of microbial synthesis, as components of culture media industrial wastes can be used. The aim of this study was to determine the ability of *Rhodotorula gracilis* yeast to biosynthesis of carotenoids during the cultivation in media with potato wastewater and glycerol. As a control medium not supplemented potato wastewater was used. Three experimental media were used for cultivation potato wastewater and glycerol in an amount of 3, 5 and 10 g·100 cm⁻³. Cultivation of yeast was carried out on a reciprocating shaker (200 rpm) for 96 h. Biomass yield was performed by weight method, while optical density by the spectrophotometric method. During the cultivation, glycerol (chemical method), reducing sugars (Miller method) and protein (Kjeldahl's method) concentration in the experimental media and the chemical-oxygen demand indicator (dichromate method) of media were determined. Carotenoids content in the yeast biomass were determined by spectrophotometric method and their contribution by HPLC-UV. The highest yield of the cell biomass (more than 30 g d.m.·dm⁻³) was obtained in the experimental media with potato wastewater supplemented with a 3 and 5% addition of glycerol. After cultivation of *R. gracilis* yeast in medium with 3% addition of glycerol the highest degree of glycerol content (85.7%), total protein content (69.3%) and COD index (84.8%) reduction were observed. Base of this results, it was found that there is a possibility of simultaneous biodegradation of glycerol and potato wastewater during the cultivation of tested yeast strain. The highest carotenoids content in the yeast biomass (142.6 µg·g⁻¹ d.m.) was obtained in control medium. The high concentration of compounds constitutes the source of carbon in the culture medium inhibited the biosynthesis of carotenoid pigments by the *R. gracilis*. Their content in the biomass after cultivation in experimental media with glycerol was more than three times lower (34.6–40.9 µg·g⁻¹ d.m.) to compare with control medium. In these conditions, the yeast synthesized mainly torulene (66.9–69.7%) and β-carotene (26.4–29.7%). It was found that the tested yeast strain in the future may become a new source of carotenoids, because of the low volumetric productivity of these compounds (0.9–1.23 mg·dm⁻³), the further studies should be about the effect of the optimization of the culture conditions to increase the efficiency of carotenoids biosynthesis in the media with potato wastewater and glycerol.

Key words: carotenoids, glycerol, potato wastewater, *Rhodotorula gracilis*

