

OCENA ZDOLNOŚCI BIOSYNTETYZY TŁUSZCZU PRZEZ DROŹDŻE *RHODOTORULA GRACILIS* W PODŁOŻACH ZAWIERAJĄCYCH ZIEMNIACZANĄ ODPADOWĄ WODĘ SOKOWĄ WZBOGACONĄ GLICEROLEM

Stanisław Błażej, Iwona Gientka, Anna Bzducha-Wróbel,
Lidia Stasiak-Róžańska, Magdalena Maszewska
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem badań było określenie zdolności wzrostu drożdży *Rhodotorula gracilis* i biosyntezy przez nie wewnątrzkomórkowego tłuszczu (SCO – Single Cell Oil) podczas 72-godzinnej hodowli węgłnej w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową wzbogaconą glicerolem w ilościach 5, 10, 15 i 20% obj. Największy plon biomasy komórkowej ($28,65 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskano w podłożu zawierającym 5% obj. glicerolu, a najwięcej wewnątrzkomórkowego tłuszczu ($25,57 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) stwierdzono w biomacie drożdży rosnących w podłożach zawierających 20% obj. glicerolu. Ta ilość tłuszczu była 3 i 5 razy większa w porównaniu z eksperymentami prowadzonymi w podłożu kontrolnym YPD ($8,87 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) i doświadczalnym bez gliceryny ($4,81 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$). W podłożach wzbogaconych 15 lub 20% obj. dodatkiem glicerolu największa objętościowa produktywność biosyntezy tłuszczu w komórkach stosowanego szczepu drożdży przekraczała $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodowla węglna drożdży *Rhodotorula gracilis* w podłożu stanowiącym odpadową wodę sokową ziemniaczaną wzbogaconą glicerolem w ilości 15–20% obj. prowadzi do biosyntezy tłuszczu wewnątrzkomórkowego.

Słowa kluczowe: SCO (Single Cell Oil), *Rhodotorula*, ziemniaczana odpadowa woda sokowa, glicerol, biosynteza wewnątrzkomórkowego tłuszczu

WSTĘP

Wszystkie mikroorganizmy produkują substancje tłuszczowe niezbędne do tworzenia błon komórkowych. Jedynie w przypadku niektórych drobnoustrojów tłuszcz może być odkładany w komórkach jako substancja zapasowa. Szczepy, w których tłuszcz

Adres do korespondencji – Corresponding author: Stanisław Błażej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa, e-mail: stanislaw_blazejak@sggw.pl

może stanowić więcej niż 20% suchej substancji biomasy nazywa się „olejogennymi” (ang. *oleaginous*) [Ratledge 2002, Ratledge 2004, Karatay i Donmez 2010]. Produkcja olejów pochodzenia mikrobiologicznego SCO (ang. *Single Cell Oil*), w porównaniu do otrzymywanych z tradycyjnych surowców roślinnych lub zwierzęcych, niesie ze sobą wiele korzyści. Jest niezależna od klimatu, wymaga stosunkowo niewiele pracy ludzkiej, cykl produkcji jest krótki, a skład kwasów tłuszczowych może być modyfikowany zmianami parametrów środowiska hodowlanego biomasy [Komorowski i Błażej 2011]. Ze względu na zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, olej mikrobiologiczny może być stosowany jako dodatek do preparatów w żywieniu ludzi lub w postaci biomasy komórkowej, jako wysokoenergetyczny dodatek paszowy dla zwierząt. Spośród poznanych szczepów drożdży olejogennych większość należy do rodzajów *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Candida*, *Yarrowia* i *Rhodotorula* [Li i in. 2008, Ageitos i in. 2011].

Drożdże z gatunku *Rhodotorula gracilis* są anamorficzną formą *Rhodospodium toruloides*, zaliczaną do rodziny Sporidiobolaceae, rzędu Sporidiales, klasy Urediniomycetes i gromady podstawczaków (Basidiomycota) w królestwie grzybów (Fungi) [Fell i in. 1998]. Poza biosyntezą karotenoidów (beta-karoten, torulen, torularodyna), które nadają koloniom różowo-łososiowe zabarwienie, wykazują szczególną zdolność wewnątrzkomórkowego gromadzenia tłuszczu jako substancji zapasowej [Buzzini i in. 2007, Saenge i in. 2011]. Biosynteza lipidów w komórkach drożdży olejogennych rozpoczyna się zazwyczaj w obecności dużej zawartości źródła węgla w podłożu oraz ograniczonego dostępu do źródła azotu. Niedobór azotu prowadzi do zmniejszenia aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej w cyklu Krebsa i zwiększonej produkcji cytrynianu, który poprzez błonę mitochondrialną zostaje przeniesiony do cytozolu komórkowego. Warto zaznaczyć, iż w komórkach drożdży olejogennych zawartość cytrynianu jest 3–4-krotnie wyższa niż u tych o niewielkiej zdolności do biosyntezy lipidów, a dodatkowo obecne są cytoplazmatyczne liazy cytrynianowe [Evans i in. 1983]. Następnie cytrynian w cytozolu ulega przekształceniu do acetylo-CoA przy udziale liazy ATP-cytrynianowej. W kolejnym etapie karboksylacja acetylo-CoA (wymaga witamin z grupy B, zwłaszcza biotyny) prowadzi do powstania malonylo-CoA, który wraz z drugą cząsteczką acetylo-CoA są substratami w syntezie łańcucha kwasów tłuszczowych. Proces syntezy tłuszczu w postaci trójglicerydów w komórkach drożdży zachodzi w ciałkach lipidowych, tzw. LB (ang. *Lipid Bodies*), oraz retikulum endoplazmatycznym [Ageitos i in. 2011].

Pozyskiwanie tłuszczu mikrobiologicznego z olejogennych szczepów drożdży z wykorzystaniem alternatywnych źródeł przyswajalnych form węgla, azotu, fosforu i składników mineralnych może być jednym ze sposobów utylizacji odpadów przemysłowych. Rolę podstawowych składników pożywki do hodowli drobnoustrojów mogą spełniać odpadowa gliceryna z produkcji biodiesla i odpadowa ziemniaczana woda sokowa. Produkcja biodiesla w warunkach krajowych osiągnęła poziom ok. 500 tys. ton, co wygenerowało ok. 100 tys. ton fazy glicerynowej zawierającej 50–60% gliceryny [Borychowski 2012]. Jednocześnie w ostatnich latach roczna produkcja skrobi ziemniaczanej kształtuje się na poziomie ok. 100–150 tys. ton, co z kolei wymaga zagospodarowania odpadowej wody sokowej powstającej po termiczno-kwasowej koagulacji białek z soku ziemniaczanego.

Celem badań było określenie zdolności wzrostu drożdży z gatunku *Rhodotorula gracilis* i biosyntezy przez nie wewnątrzkomórkowego tłuszczu podczas 72-godzinnej hodowli węgłnej w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową oraz glicerol w ilościach 5, 10, 15 i 20% obj.

MATERIAŁY I METODY

Materiał biologiczny

W badaniach zastosowano gatunek drożdży *Rhodotorula gracilis* pochodzący z kolekcji czystych kultur Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Drożdże przechowywano w temperaturze +4°C na stałym podłożu YPD (skosy) [Robinson i in. 2000].

Podłoża hodowlane

Podłoże kontrolne – płynna pożywka YPD o następującym składzie (% wag.): glukoza (2), pepton (2), ekstrakt drożdżowy (1), pH 5,0 [Robinson i in. 2000].

Podłoża doświadczalne – do ich przygotowania zastosowano ziemniaczaną odpadową wodę sokową z Przedsiębiorstwa Przemysłu Spożywczego PEPEES S.A. w Łomży oraz zróżnicowany dodatek glicerolu (POCH, Polska) w ilościach 5, 10, 15 lub 20% obj. jako główne źródło węgla. Odpadowa woda sokowa była pozostałością po produkcji białka paszowego, otrzymanego w wyniku termiczno-kwasowej koagulacji białek soku ziemniaczanego. Zawierała ok. 3,5% suchej substancji, w tym: 0,3% cukrów bezpośrednio redukujących oraz związki mineralne, w tym fosfor (jako P₂O₅ – ok. 0,8%). Białka ogółem (oznaczone metodą Kiejdahla) stanowiły 1,0% s.s. wody sokowej, z czego ok. połowę stanowiły białka oznaczone metodą Lowry'ego. Podłoża, po ustaleniu pH na poziomie 5,0 za pomocą 0,1 M HCl, sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut.

Przygotowanie inokulum

Inokulum przygotowano przez zaszczepienie 90 cm³ płynnego podłoża YPD 48-godziną czystą kulturą stosowanego gatunku drożdży *Rhodotorula gracilis*. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C, przez 24 godziny w kolbach płaskodennych o obj. 500 cm³, na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej (SM-30 Control E.Buchler, Niemcy) o amplitudzie drgań 200 cykli/min. Uzyskany materiał służył do inokulacji podłoży kontrolnych i doświadczalnych.

Hodowla drożdży w podłożach kontrolnych i doświadczalnych

Podłoża kontrolne i doświadczalne szczepiono 24-godzinnym inokulum, po wcześniejszym odwirowaniu biomasy z 10 cm³ hodowli inokulacyjnej (10 min, 1400 g, 4°C, Centrifuge 5804R, Niemcy), dwukrotnym płukaniu wodą destylowaną, zawieszeniu w 10 cm³ podłoża YPD lub jałowej odpadowej wody sokowej i ilościowym przeniesieniu do podłoża hodowlanych. W ten sposób wsiew inokulum wynosił 10% obj. Hodowle w podłożach kontrolnych i doświadczalnych prowadzono przez 72 godziny w takich samych warunkach jak w hodowli inokulacyjnej. Próbkę do oznaczenia plonu biomasy

i zawartości gliceryny w podłożach doświadczalnych pobierano bezpośrednio po inokulacji oraz po 24, 48 i 72 godzinach hodowli. Zawartość tłuszczu w suchej substancji biomasy komórkowej oznaczano po 48 i 72 godzinach.

Oznaczenie plonu biomasy

Plon biomasy komórkowej oznaczano metodą suszenia po odwirowaniu (10 min, 1400 g, 4°C, Centrifuge 5804R, Niemcy) określonej objętości płynu pohodowlanego w zważonej gilzie. Supernatant zlewano, a osad dwukrotnie przemywano wodą destylowaną i ponownie wirowano. Odwirowaną biomasę suszono w temperaturze 80°C (suszarka SML 32/250, Zelmed, Polska) do uzyskania stałej masy. Wynik plonu biomasy podawano w $\text{g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Oznaczenie zawartości glicerolu

Oznaczanie zawartość glicerolu prowadzono metodą zaproponowaną przez Milcherta, polegającą na utleniającym działaniu kwasu meta-nadjodowego na grupy hydroksylowe w glicerolu. Wynik zawartości glicerolu w podłożach doświadczalnych podawano w $\text{g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$ [Milchert i in. 1995].

Oznaczenie zawartości tłuszczu

Wysuszoną i zważoną biomasę komórkową drożdży *Rhodotorula*, uzyskaną z określonej objętości płynu pohodowlanego, przenoszono do gilz, ważono i umieszczano w aparacie Soxhleta w celu ekstrakcji z użyciem eteru naftowego (POCH, Polska) jako rozpuszczalnika. Po 6 godzinach ekstrakcji gilzy suszono w temperaturze 80°C do uzyskania stałej masy. Z różnicy masy przed i po ekstrakcji obliczano zawartość wewnątrzkomórkowego tłuszczu. Wynik podawano w $\text{g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$ biomasy komórkowej drożdży.

Analiza statystyczna wyników

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statgraphics Centurion XVI.I. Średnie wyniki plonu biomasy, zawartości gliceryny w podłożach hodowlanych oraz wewnątrzkomórkowego tłuszczu uzyskane z trzech serii doświadczeń analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji. Wnioskowanie prowadzono przy zastosowaniu testu Tukeya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I Dyskusja

Stosowany gatunek drożdży *Rh. gracilis* wykazał zdolność asymilacji glicerolu z podłoży doświadczalnych w badanym zakresie stężeń (5–20% obj.). Największy plon biomasy (tab. 1.) uzyskano w podłożu z 5-procentowym dodatkiem glicerolu ($28,65 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$). Większe dawki glicerolu (10, 15 i 20% obj.) prowadziły do statystycznie istotnego zmniejszenia plonu biomasy, co mogło świadczyć o zakłóceniu metabolizmu komórkowego spowodowanego wzrostem ciśnienia osmotycznego. Wielu autorów [Galafassi i in. 2012, Taccari 2012, Yen i in. 2012] wskazywało podobnie, iż duże stężenia glicerolu zmniejszają plon biomasy drożdży gatunków: *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginoso* i *Rh. graminis*. Z tego

Tabela 1. Plon biomasy komórkowej drożdży *Rh. gracilis* podczas hodowli wglębnej w podłożach kontrolnych i doświadczalnychTable 1. Biomass yield of *Rh. gracilis* yeast during bath cultivation in control and experimental media

Rodzaj podłoża hodowlanego Medium type	Czas hodowli – Time of cultivation [h]			
	0	24	48	72
	Plon biomasy – Biomass yield [$\text{g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$]			
Kontrolne YPD Control YPD	0,98 ±0,02 ^{a*}	16,29 ±0,65 ^{cd}	16,95 ±0,83 ^d	17,22 ±0,80 ^d
Woda sokowa Wastewater	0,96 ±0,03 ^a	12,02 ±0,48 ^b	14,82 ±0,58 ^c	14,91 ±0,48 ^c
Woda sokowa + 5% glicerolu Wastewater + 5% glycerol	1,23 ±0,05 ^a	17,43 ±0,72 ^d	28,11 ±0,89 ^h	28,65 ±0,95 ^h
Woda sokowa + 10% glicerolu Wastewater + 10% glycerol	1,15 ±0,05 ^a	12,52 ±0,45 ^b	22,45 ±0,84 ^e	22,66 ±0,62 ^e
Woda sokowa + 15% glicerolu Wastewater + 15% glycerol	1,26 ±0,07 ^a	13,12 ±0,60 ^b	22,64 ±0,91 ^e	21,68 ±0,78 ^{fe}
Woda sokowa + 20% glicerolu Wastewater + 20% glycerol	0,93 ±0,04 ^a	12,35 ±0,38 ^b	19,97 ±0,92 ^c	20,71 ±0,85 ^{ef}

SD – odchylenie standardowe/standard deviation.

*Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy/The same letter indices indicate a lack of significant difference.

powodu rekomendowany dodatek glicerolu jako źródła węgla w produkcji biomasy wynosi na ogół 5–6% obj.

W podłożu z odpadową ziemniaczaną wodą sokową (bez suplementacji glicerolem), ze względu na niewielką zawartość przyswajalnych źródeł węgla (ok. 0,3% cukrów redukujących), plon biomasy był najmniejszy ($14,91 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$) i nie różnił się on statystycznie istotnie od plonu uzyskanego w podłożu YPD po 24 godzinach hodowli ($16,29 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$). Świadczyło to, że odpadowa woda sokowa była dobrym źródłem przyswajalnych form azotu, składników mineralnych (zwłaszcza fosforu) i witamin z grupy B dla badanego szczepu drożdży. Warto zauważyć, że w kontrolnym podłożu YPD zakończenie fazy wzrostu logarymicznego drożdży nastąpiło w pierwszej dobie hodowli, a w przypadku podłoży doświadczalnych z gliceryną w drugiej dobie hodowli. Prawdopodobnie był to czas (po zasymilowaniu łatwo przyswajalnych cukrów redukujących zawartych w wodzie sokowej) potrzebny do ukierunkowania metabolizmu badanego szczepu na wykorzystanie glicerolu jako źródła węgla.

Według danych literaturowych, biosynteza wewnątrzkomórkowego tłuszczu w postaci triacylogliceroli zachodzi w późnej fazie wzrostu stacjonarnego drożdży [Ageitos i in. 2011], a rozpoczyna się, gdy w podłożu hodowlanym wyczerpaniu ulega źródło azotu, przy czym źródło węgla pozostaje w nadmiarze [Ratledge 2004]. Oznaczenia zawartości tłuszczu w biomase *Rh. gracilis* przeprowadzone po 48 i 72 godzinach wykazały zdolność biosyntezy związków lipidowych przez badany szczep (tab. 2) i różnicowaną jego zawartość, gdy dodatek glicerolu wynosił 5 i 10% obj. Przy większym dodatku glicerolu (15 i 20% obj.) stwierdzone różnice zawartości tłuszczu były statystycznie nieistotne.

Najwięcej tłuszczu ($25,57 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) zawierały drożdże po 72 godzinach hodowli w podłożu suplementowanym glicerolem w dawce 20% obj. W tych warunkach spełniały one kryterium drobnoustrojów olejogennych, a zawartość tłuszczu w komórkach drożdży z tej hodowli była 3- i 5-krotnie wyższa niż odpowiednio w kontrolnym podłożu YPD i z wodą sokową o znikomej zawartości przyswajalnych źródeł węgla (tab. 2). Niższa wartość relacji C : N w kontrolnym podłożu YPD i podłożu doświadczalnym bez dodatku glicerolu powodowała statystycznie istotne zmniejszenie zawartości wewnątrzkomórkowego tłuszczu po 72 godzinach w porównaniu do drożdży z hodowli 48-godzinnej. Stosunek molowy C : N jest kluczowy dla wydajnej biosyntezy wewnątrzkomórkowych lipidów i na ogół powinien wynosić powyżej 100 [Rupic i in. 1996, Ratledge 2002, Papanikolaou i in. 2004, Beopoulos i in. 2009].

O opłacalności biosyntezy tłuszczu mikrobiologicznego decydują zarówno plon biomasy, zawartość w niej tłuszczu, jak i ilość tłuszczu wytworzona w 1 dm^3 podłoża hodowlanego. Z tego punktu widzenia największą objętościową produktywność biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu osiągnięto w podłożach doświadczalnych z 15 i 20% obj. zawartością glicerolu. W tych warunkach po 72-godzinnej hodowli wglębnej drożdży uzyskano powyżej 5 g tłuszczu komórkowego z jednego dm^3 podłoża doświadczalnego (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość tłuszczu w biomacie komórkowej drożdży *Rh. gracilis* oraz objętościowa produktywność biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu podczas hodowli wglębnej w podłożach kontrolnych i doświadczalnych

Table 2. Fat content in *Rh. gracilis* yeast cell biomass and volumetric productivity of biosynthesis intracellular fat during bath cultivation in control and experimental media

Rodzaj podłoża hodowlanego Medium type	Czas hodowli – Time of cultivation [h]			
	48	72	48	72
	Zawartość tłuszczu Fat content [$\text{g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$]		Objętościowa produktywność biosyntezy Volumetric productivity of biosynthesis [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	
Kontrolne YPD Control YPD	9,80 \pm 0,40 ^{d*}	8,87 \pm 0,38 ^c	1,66	1,53
Woda sokowa Wastewater	5,41 \pm 0,34 ^b	4,81 \pm 0,25 ^a	0,80	0,72
Woda sokowa + 5% glicerolu Wastewater + 5% glycerol	5,79 \pm 0,25 ^b	8,24 \pm 0,32 ^c	1,63	2,40
Woda sokowa + 10% glicerolu Wastewater + 10% glycerol	8,58 \pm 0,35 ^c	11,88 \pm 0,45 ^c	1,93	2,69
Woda sokowa + 15% glicerolu Wastewater + 15% glycerol	13,48 \pm 0,47 ^f	25,45 \pm 0,52 ^g	3,05	5,52
Woda sokowa + 20% glicerolu Wastewater + 20% glycerol	13,97 \pm 0,34 ^f	25,57 \pm 0,48 ^g	2,78	5,30

SD – odchylenie standardowe/standard deviation.

*Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy/The same letter indices indicate a lack of significant difference.

W pozostałych wariantach podłoży objętościowa produktywność biosyntezy tłuszczu w komórkach drożdży *Rh. gracilis* była kilkakrotnie niższa i w przypadku podłoża doświadczalnego bez dodatkowego źródła węgla w postaci glicerolu nie przekroczyła $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Odpadową wodę sokową powstającą przy produkcji chipsów ziemniaczanych stosowano jako źródła składników odżywczych także w hodowli grzybów strzępkowych *Aspergillus oryzae* [Muniraj i in. 2013]. W wyniku biosyntezy lipidów w biomacie tych pleśni w 1 dm^3 podłoża hodowlanego uzyskiwano ok. 3,5 g tłuszczu.

Ważnym aspektem, który należy brać pod uwagę przy mikrobiologicznych metodach pozyskiwania składników żywności z udziałem drobnoustrojów, jest wykorzystanie składników podłoży hodowlanych, w tym przypadku glicerolu (tab. 3). Po 72 godzinach wykorzystanie glicerolu było niepełne. Największe (86%) wystąpiło przy 5% obj. zawartości glicerolu w podłożu hodowlanym, a najmniejsze (59%) przy 20% obj. dodatku tego źródła węgla.

Tabela 3. Zmiany zawartości glicerolu w podłożach doświadczalnych oraz stopień wykorzystania tego substratu przez drożdże *Rh. gracilis* podczas hodowli węglanej

Table 3. Changes of glycerol content in experimental media and ratio of using this substrate by *Rh. gracilis* yeast during bath cultivation

Rodzaj podłoża hodowlanego Medium type	Czas hodowli– Time of cultivation [h]				Stopień wykorzystania glicerolu Ratio of glycerol using [%]
	0	24	48	72	
	Zawartość glicerolu Glycerol content [%]				
Woda sokowa + 5% glicerolu Wastewater + 5% glycerol	5,0 ±0,10	3,5 ±0,10	1,60 ±0,05	0,70 ±0,04	86
Woda sokowa + 10% glicerolu Wastewater + 10% glycerol	10,0 ±0,10	8,7 ±0,10	4,60 ±0,10	2,80 ±0,10	73
Woda sokowa + 15% glicerolu Wastewater + 15% glycerol	15,0 ±0,10	12,6 ±0,20	7,10 ±0,10	3,70 ±0,10	75
Woda sokowa + 20% glicerolu Wastewater + 20% glycerol	20,0 ±0,10	18,2 ±0,30	14,00 ±0,20	8,20 ±0,10	59

SD – odchylenie standardowe/standard deviation.

W warunkach doświadczenia najwięcej tłuszczu w komórkach drożdży (powyżej 25% wag.) uzyskiwano przy dawkach glicerolu 15 i 20% obj., co potwierdziło zdolność gromadzenia tłuszczu przez stosowany gatunek *Rh. gracilis* przy dużym nadmiarze źródeł węgla, w czasie logarytmicznej fazy wzrostu. Z tego powodu hodowlę badanego szczepu drożdży w podłożach z odpadową ziemniaczaną wodą sokową i gliceryną należy prowadzić dłużej (powyżej 72 h) w celu pełnego zmetabolizowania źródła węgla [Zheng i in. 2005, Taha i in. 2010].

WNIOSKI

1. Badany gatunek drożdży *Rhodotorula gracilis* wykazał zdolność wzrostu i biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu podczas 72-godzinnej hodowli wglębnej w podłożach doświadczalnych z glicerolem i ziemniaczaną odpadową wodą sokową jako źródłami węgla i azotu.

2. Największy plon biomasy komórkowej ($28,65 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskano w podłożu doświadczalnym z ziemniaczaną wodą sokową i 5% obj. dodatkiem glicerolu.

3. Biosynteza wewnątrzkomórkowego tłuszczu w podłożach doświadczalnych z glicerolem przez drożdże *Rhodotorula gracilis* zachodziła w fazie wzrostu stacjonarnego. Najwięcej tłuszczu (powyżej $25,00 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) i najwyższą produktywność objętościową biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu (powyżej $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskano w podłożach doświadczalnych zawierających 15- i 20-procentowy dodatek glicerolu.

4. Wzrastająca zawartość glicerolu w podłożach doświadczalnych (od 5 do 20% obj.) prowadziła do zmniejszenia stopnia jego wykorzystania (z 86 do 59%) jako źródła węgla przez stosowane drożdże. Niepełny stopień wykorzystania glicerolu z podłoży doświadczalnych uzasadnia celowość przedłużenia hodowli wglębnej powyżej 72 godzin.

LITERATURA

- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga-Crespo P., Villa T.G., 2011. Oily yeast as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotech.* 90, 1219–1227.
- Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribe-larrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M., 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Res.* 48, 375–387.
- Borychowski M., 2012. Produkcja i zużycie biopaliw płynnych w Polsce i na świecie – szanse, zagrożenia, kontrowersje. W: *Roczniki Ekonomiczne Kujawsko-Pomorskiej Szkoły Wyższej w Bydgoszczy* 5, 39–59.
- Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., Broock M., Mulinacci N., 2007. Carotenoid profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*. *Can. J. Microbiol.* 53, 1024–1031.
- Evans C.T., Scragg A.H., Ratledge C., 1983. A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and nonoleaginous yeasts. *Europ. J. Biochem.* 130, 195–204.
- Fell J.W., Statzell-Tallman A., 1998. "Rhodotorula" Harison. In: *The yeast, a taxonomic study*, 4th ed., Ed by Kurtzman & Fell, Elsevier, Amsterdam, 800–827.
- Galafassi S., Cucchetti D., Pizza F., Bianchi D., Compagno C., 2012. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Biores. Technol.* 111, 398–403.
- Karatay S., Donmez G., 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cell for biodiesel production using molasses. *Biores. Tech.* 101, 7988–7990.
- Komorowski P., Błażej St., 2011. Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez wybrane drożdże. *Przem. Spoż.* 65(9), 48–51.
- Li Q., Du W., Liu D., 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 80, 749–756.
- Milchert E., Goc W., Lewandowski G., Myszkowski J., 1995. Dehydrochlorination of glycerol dichlorohydrin to epichlorohydrin. *Chem. Papers* 49(3), 133–136.

- Muniraj I.K., Xiao L., Hu Z., Zhan X., Shi J., 2013. Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*. *Water Res.* 47, 3477–3483.
- Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., 2004. Single Cell Oil (SCO) production by *Mortierella asabellina* grown on high-sugar content media. *Biores. Tech.* 95, 287–291.
- Ratledge C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 1047–1050.
- Ratledge C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochim.* 86, 807–815.
- Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D., 2000. Encyclopedia of food microbiology. Academic, New York, 252–300, 850–854.
- Rupcic J., Blagowic B., Maric V., 1996. Cell lipids of the candida lipolytica yeast grown on methanol. *J. Chrom.* 755, 75–80.
- Saenge C., Cheirsilp 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.
- Taccari M., Canonico L., Comitini F., Mannazzu I., Ciani M., 2012. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technol.* 110, 488–495.
- Taha E.M., Omar O., Yousoff W.M., Hamid A.A., 2010. Lipid biosynthesis in *Cunninghamella bairdieri* 2A1 in N-limited and N-excess media. *Annals in Microbiol.* 60, 615–622.
- 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.
- Zheng S., Yang M., Yang Z., 2005. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. *Biores. Technol.* 96, 1183–1187.

EVALUATION OF THE ABILITY OF THE INTRACELLULAR FAT BIOSYNTHESIS BY *RHODOTORULA GRACILIS* YEAST IN MEDIA CONTAINING POTATO WASTEWATER ENRICHED WITH GLYCEROL

Summary. The biosynthesis of intracellular fat by oleaginous yeast strains based on alternative sources of carbon, nitrogen, phosphorus and mineral ingredients can provide the opportunity for the utilization of the industrial wastes. The culture media for SCO production can include glycerol from biodiesel production as a source of carbon as well as potato wastewater as a source of nitrogen. Potato wastewater is a waste of the production of protein feed obtained by proteins thermal-acid coagulation from potato juice. The aim of the study was to determine the ability of *Rhodotorula gracilis* yeast to the growth and intracellular biosynthesis of fat during 72-hour bath cultivation in experimental media containing potato wastewater enriched with glycerol. Experimental media contained potato wastewater and diverse addition of glycerol in quantities of 5, 10, 15 or 20% vol. Control medium was YPD. Potato wastewater originated from PEPEES SA Food Industry in Łomża (Central East Poland). The biomass yield, intracellular fat content as well as glycerol in cultivation media content were determined during yeast cultivation. Biomass yield was performed by gravimetric method, while glycerol content by the Milchert's method. The intracellular fat content was determined after extraction according to the Soxhlet method

with petroleum ether. The highest yield of the cell biomass ($28.65 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$) was obtained in the experimental medium with wastewater and 5% of glycerol. Culturing of the yeast of *Rhodotorula gracilis* in medium containing potato wastewater media enriched with 15 or 20% glycerol leads to the biosynthesis of intracellular fat. The intracellular biosynthesis of fat in the experimental media glycerol occurred in the stationary growth phase. The highest intracellular fat ($25.57 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) was found in yeast biomass from the experimental media containing 20% glycerol. In comparison to the fat content in the biomass from YPD control medium ($8.87 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) and experimental without glycerol ($4.81 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}_{\text{s.s.}}^{-1}$) the value was about 3 and 5 times greater respectively. The volumetric productivity of fat in cells of the yeast strain tested exceeded $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ in potato wastewater media enriched with 15 or 20% glycerol. Increasing the glycerol content in the experimental media (from 5 to 20% vol) led to a reduction in glycerol utilization by yeast (from 86 to 59%). The fact of incomplete utilization of glycerol in experimental media should result in an extension of the submerged culture over 72 hours.

Key words: SCO (*Single Cell Oil*), *Rhodotorula*, potato wastewater, glycerol, biosynthesis of intracellular fat