

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **216012**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **391223**

(22) Data zgłoszenia: **14.05.2010**

(51) Int.Cl.

**C12P 1/02 (2006.01)**

**C12N 9/26 (2006.01)**

**C07C 31/22 (2006.01)**

**C11C 3/00 (2006.01)**

---

(54) **Sposób otrzymywania bioproduktów z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica***

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**11.10.2010 BUP 21/10**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**28.02.2014 WUP 02/14**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy  
WE WROcŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAŁGORZATA ROBAK, Wrocław, PL  
ZBIGNIEW LAZAR, Jastrzębie-Zdrój, PL  
EWA WALCZAK, Krosnowice, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Stanisław Mączka**

---

**PL 216012 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bioproduktów z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*.

Sposób, według wynalazku, może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, paszowym, oraz włókienniczym i poligraficznym.

Kwas cytrynowy stosuje się jako regulator kwasowości, przeciwutleniacz, wzmacniacz zapachów, dodatek do farb drukarskich, a jego sole wykorzystuje się jako dodatek do wyrobu leków czy konserwowania krwi.

Inwertaza, ze względu na swoje zdolności do rozkładu sacharozy, znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, jest używana na przykład do produkcji czekoladek o nadzieniu miękkim. Z innych zastosowań należy wymienić produkcję sztucznego miodu czy czynników plastyzujących, stosowanych w produktach kosmetycznych, lekach i przemyśle papierniczym. Pozostałość komórkową po ekstrakcji inwertazy można wykorzystać jako dodatek paszowy, gdyż stanowi cenne źródło białka, tłuszczy, makro i mikroelementów oraz witamin.

Znany jest sposób, opisany w patencie PL 160027, produkcji kwasu cytrynowego przez drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica*. Sposób ten polega na jednoczesnym otrzymywaniu kwasu cytrynowego i izocytrynowego przy pomocy szczepu *Yarrowia lipolytica* A101. Produkcję przy udziale tego szczepu prowadzi się w bioreaktorze w podłożu z glukozą, w temperaturze 301K. Odczyn środowiska utrzymuje się na poziomie pH 5,5. W czasie fazy produkcji dodaje się periodycznie 80% roztwór glukozy. W czasie 144 godzin prowadzenia hodowli, z 1 litra pożywki, otrzymuje się: 123 g jednowodnego kwasu cytrynowego, 12 g kwasu izocytrynowego, 15 g suchej masy drożdży. Wydajność kwasu cytrynowego wyniosła  $0,88 \text{ gg}^{-1}$ , a wydajność biomasy -  $0,42 \text{ gg}^{-1}$ .

Znane są również sposoby produkcji kwasu cytrynowego przez genetycznie modyfikowane szczepy drożdży *Yarrowia lipolytica* (Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., Żarowska B., Nicaud J., 1997, Pol. J. Food Nutr. Sci., 6/47, 4, s. 49 - 54).

Jeden ze wspomnianych sposobów polega na hodowli szczepu *Yarrowia lipolytica* W29 ura 3-302 o fenotypie  $\text{Suc}^+$ , w podłożu zawierającym w 1 litrze 200 g niehydrolizowanej melasy. Proces hodowlany prowadzono w bioreaktorze, gdzie odczyn środowiska utrzymywano na poziomie pH 5,5. Po zakończeniu procesu biosyntezy, z 1 litra pożywki, uzyskano: 50,2 g kwasu cytrynowego oraz 15 g suchej masy drożdży. Wydajność kwasu cytrynowego, uzyskanego z melasy, wynosiła  $0,25 \text{ gg}^{-1}$ .

Drugi ze sposobów polegał na hodowli szczepu *Yarrowia lipolytica* H222-S4 T5 o fenotypie  $\text{Suc}^+$  w podłożu zawierającym w 1 litrze 170 g sacharozy (Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G.: 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol., 75, 6, s. 1409 - 1417). Hodowlę prowadzono w bioreaktorze, w którym odczyn środowiska hodowlanego utrzymywano na poziomie pH 6,8. Po zakończeniu procesu otrzymano z 1 litra podłoża produkcyjnego: 140 g kwasu cytrynowego, 8 g suchej masy drożdży. Wydajność kwasu cytrynowego wyniosła  $0,82 \text{ gg}^{-1}$ . Ponieważ w procesie tym używano szczepu o fenotypie  $\text{Suc}^+$  otrzymano również 105 U inwertazy z 1 g wytworzonej biomasy drożdży.

Znany jest także ze zgłoszenia patentowego PL 385009 sposób mikrobiologicznej utylizacji odpadów uzyskiwanych w produkcji biodiesla, z wykorzystaniem gatunku *Yarrowia lipolytica*. W procesie tym uzyskuje się biomasę drożdży wykorzystywanych do produkcji pasz. Uzyskano  $33 \text{ gL}^{-1}$  suchej masy drożdży, a wydajność biomasy wyniosła 0,6 g drożdży z 1 g gliceryny.

Znany jest sposób wytwarzania inwertazy z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Z opisu patentowego DE 3915616 wiadomo, że używano komercyjnie dostępne drożdże piekarskie, które rozdrabniano w homogenizatorze wysokociśnieniowym. Uzyskany ekstrakt komórkowy poddawano obróbce termicznej w wymiennikach ciepła. Oddzielenie pozostałości komórkowych od ekstraktu przeprowadzano stosując separator talerzowy. Celem zagęszczenia i oczyszczenia preparatu inwertazy stosowano ultrafiltrację. W przeprowadzonym procesie uzyskano 540 U inwertazy z 1 g drożdży piekarskich.

W światowej literaturze ostatnich lat opisywane są nowe szczepy drożdży wykorzystywane do produkcji inwertazy. Świadczy to o poszukiwaniu ekonomicznie uzasadnionej technologii produkcji tego enzymu.

Znane są hiperprodukcyjne szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* GCA-I - GCA-V, które są wykorzystywane do produkcji inwertazy (Ikram Ul-Haq, Sikander Ali, Pak. J. Bot., 2005, 37, 3,

s. 749-759). Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmayera, w których odczyn środowiska ustalano na poziomie pH 6,0.

Proces biosyntezy inwertazy prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 303K. Po zakończonej hodowli, z 1 litra płynu pofermentacyjnego, uzyskiwano: 0,86 - 1,52 g suchej masy drożdży oraz 75 700 - 107 400 U inwertazy. Wydajność enzymu z sacharozy wynosiła 4,98 - 6,32 U z 1 g substratu.

Z 1 g drożdży uzyskano 60,6 - 120,7 U inwertazy.

W dostępnej literaturze brak jest doniesień o sposobach jednoczesnego uzyskiwania kwasu cytrynowego, inwertazy i suplementu paszowego.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania bioproduktów na drodze mikrobiologicznej z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*.

Istota wynalazku polega na tym, że proces biosyntezy prowadzi się, z użyciem szczepów o fenotypie  $Suc^+$  w podłożu zawierającym alkohole albo substraty tłuszczowe.

Korzystnie jest, gdy stosuje się szczepy B56-5 albo B60-4, albo K10.

Korzystnie jest także, gdy alkoholem jest glicerol albo frakcja glicerynowa, będąca odpadem z biorafinerii a substratami tłuszczowymi są oleje roślinne albo kwasy tłuszczowe, zwłaszcza porafinacyjne kwasy tłuszczowe, będące odpadem z przemysłu tłuszczowego.

Zaletą wynalazku w porównaniu ze znanymi sposobami produkcji kwasu cytrynowego, inwertazy i suplementu paszowego jest to, iż trzy biopreparaty wytwarza się jednocześnie, technologią bezodpadową, przyjazną środowisku.

Dodatkową zaletą wynalazku są zdecydowanie wyższe wydajności inwertazy oraz porównywalne wartości wydajności kwasu cytrynowego i biomasy, co przedstawione jest w tabeli 1.

T a b e l a 1.

Proces według	Wydajność z 1 g biomasy	Ilość [U/L]	Wydajność z 1 g substratu
Förster i in. 2007	105,0	840	0,62
DE 3915616	540,0	965000	-
Ikram Ul-Haq i Sikander Ali 2005	120,7	107400	6,32
Według wynalazku	470 - 4300	2880-26000	41 - 263

Kultury szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* o fenotypie  $Suc^+$  B56-5, B60-4, K10 są przechowywane w kolekcji kultur drobnoustrojów Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w postaci zliofilizowanej oraz na skosie YM w 277K.

Hodowlę inokulacyjną prowadzi się w pH 6,8, w podłożu o następującym składzie: w 1 litrze wody wodociągowej: 50 g glicerolu; 1,5 g  $NH_4Cl$ ; 1 g ekstraktu drożdżowego; 0,1 g peptonu, w temperaturze 301K przez 24 - 48 godzin na wstrząsarce. Inokulum stanowi 10% objętości hodowli produkcyjnej prowadzonej w bioreaktorze w podłożu zawierającym w 1 litrze wody wodociągowej: 50 - 200 g glicerolu albo porafinacyjnych kwasów tłuszczowych, albo olejów roślinnych oraz 0,1 - 1 g ekstraktu drożdżowego, 0,5 - 4,5 g  $KH_2PO_4$ , 0,1 - 1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 - 10 g  $NH_4Cl$ . Hodowlę prowadzi się w pH 5,6 - 7,8 w temperaturze 301K, przy napowietrzaniu 0,36 vvm, przez 72 godziny. Z hodowli tych uzyskuje się z 1 litra: 20 - 100 g kwasu cytrynowego, 2000 - 70000 jednostek inwertazy (U) oraz od 5 - 25 g suchej pozostałości komórkowej stanowiącej suplement paszowy.

Jednostkę aktywności U definiuje się jako ilość enzymu powodująca uwolnienie 1  $\mu$ mola cukrów redukujących w ciągu 1 minuty w 310K i pH 5,0.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1.

Do czterech kolb Erlenmayera o objętości 250 mL wlewa się po 50 mL podłoża, o składzie: 50 g glicerolu, 1,5 g  $NH_4Cl$ , 1 g ekstraktu drożdżowego, 0,1 g peptonu, rozpuszczonych w 1 litrze wody wodociągowej. Tak przygotowane podłoże sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 394K przy ciśnieniu 1 bara przez 20 minut. Wystudzone kolby zawierające podłoże inokulacyjne zaszczepia się niewielką ilością biomasy szczepu *Yarrowia lipolytica* B56-5 i umieszcza się na wstrząsarce. Hodowlę prowadzi się przez 48 godzin w temperaturze 301K przy częstotliwości wstrząsania 170 rpm i amplitudzie równej 7 mm. Otrzymana w ten sposób zawiesina drożdży (4x50 mL) stanowi inokulum,

którym zaszczepia się hodowlę produkcyjną w bioreaktorze. Inokulum w sterylny sposób przenosi się do wcześniej przygotowanego 6 litrowego bioreaktora mieszadłowego, który zawiera 1800 mL sterylnego podłoża produkcyjnego o składzie: 100 g glicerolu, 0,3 g ekstraktu drożdżowego, 0,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , rozpuszczonych w 1 litrze wody wodociągowej. Proces hodowlany prowadzi się przez 72 godziny w temperaturze 303K, przy szybkości obrotów mieszadła 800 rpm i szybkości napowietrzania 0,36 vvm. W celu utrzymania odczynu środowiska na poziomie pH 6,8 automatycznie dozuje się 10 N NaOH. Po zakończeniu procesu uzyskuje się z 1 litra pożywki: 57 g kwasu cytrynowego, 3400 U inwertazy oraz 5,8 g biomasy. Metodą wirowania oddziela się płyn pohodowlany i biomasę drożdży, którą umieszcza się w sterylnej kolbie o objętości 1 litra i zalewa 500 mL sterylnego roztworu sody oczyszczonej. Ekstrakcję inwertazy prowadzi się przez 24 godziny w temperaturze 313K, następnie w temperaturze 277K przez kolejne 24 godziny. Jako ostatni etap ekstrakcji enzymu wewnątrzkomórkowego przeprowadza się wirowanie w celu klaryfikacji uzyskanego wyciągu komórkowego. Uzyskuje się w ten sposób 21700 U inwertazy oraz 3,8 g pozostałości stanowiącej suplement paszowy.

Wydajność produkcji z 1 g glicerolu wynosi: 0,6 g kwasu cytrynowego, 263 U inwertazy oraz 0,06 g biomasy.

Z 1 g wytworzonej biomasy drożdży uzyskuje się: 9,9 g kwasu cytrynowego, 4300 U inwertazy i 0,66 g suplementu paszowego.

Przykład 2.

Przygotowanie inokulum i proces hodowli drożdży prowadzi się tak jak w przykładzie 1, z tym że wystudzone kolby zawierające podłoże inokulacyjne zaszczepia się niewielką ilością biomasy szczepu *Yarrowia lipolytica* B60-4. Proces hodowlany prowadzi się przez 60 godzin. Po 60 godzinach uzyskuje się z 1 litra pożywki: 17 g kwasu cytrynowego, 2360 U inwertazy oraz 6,6 g biomasy. Biomasa tę poddaje się ekstrakcji 0,1 M roztworem sody oczyszczonej i uzyskuje się 9 000 U inwertazy oraz 4,8 g pozostałości stanowiącej suplement paszowy.

Wydajność produkcji z 1 g glicerolu wynosi: 0,2 g kwasu cytrynowego, 131 U inwertazy oraz 0,08 g biomasy.

Z 1 g wytworzonej biomasy drożdży uzyskuje się: 3,5 g kwasu cytrynowego, 470 U inwertazy oraz 0,73 g suplementu paszowego.

Przykład 3.

Przygotowanie inokulum i proces hodowli drożdży prowadzi się tak jak w przykładzie 1, z tym że wystudzone kolby zawierające podłoże inokulacyjne zaszczepia się niewielką ilością biomasy szczepu *Yarrowia lipolytica* K10. Po 72 godzinach uzyskuje się z 1 litra pożywki: 33 g kwasu cytrynowego, 1600 U inwertazy oraz 5,2 g biomasy. Biomasa tę poddaje się ekstrakcji 0,1 M roztworem sody oczyszczonej i uzyskuje się 2 200 U inwertazy oraz 3,8 g pozostałości stanowiącej suplement paszowy.

Wydajność produkcji z 1 g glicerolu wynosi: 0,39 g kwasu cytrynowego, 41 U inwertazy oraz 0,06 g biomasy.

Z 1 g wytworzonej biomasy drożdży uzyskuje się: 6,3 g kwasu cytrynowego, 680 U inwertazy oraz 0,73 g suplementu paszowego.

Przykład 4.

Przygotowanie inokulum i proces hodowli drożdży prowadzi się tak jak w przykładzie 1, z tym że jako źródło węgla stosuje się porafinacyjne kwasy tłuszczowe. Po 72 godzinach uzyskuje się z 1 litra pożywki: 25 g kwasu cytrynowego, 2600 U inwertazy oraz 23,8 g biomasy. Biomasa tę poddaje się ekstrakcji 0,1 M roztworem sody oczyszczonej i uzyskuje się 26 800 U inwertazy oraz 20,6 g pozostałości stanowiącej suplement paszowy.

Wydajność produkcji z 1 g glicerolu wynosi: 0,25 g kwasu cytrynowego, 294 U inwertazy oraz 0,24 g biomasy.

Z 1 g wytworzonej biomasy drożdży uzyskuje się: 1,1 g kwasu cytrynowego, 1235 U inwertazy oraz 0,87 g suplementu paszowego.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania bioproduktów z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* na drodze mikrobiologicznej biosyntezy, **znamienny tym**, że proces biosyntezy prowadzi się z użyciem szczepów o fenotypie  $\text{Suc}^+$  w podłożu zawierającym alkohole albo substraty tłuszczowe.

2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się szczep B56-5 albo B60-4, albo K10.

3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że alkoholem jest glicerol albo frakcja glicerynowa, będąca odpadem z biorafinerii.

4. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że substratami tłuszczowymi są oleje roślinne albo kwasy tłuszczowe, zwłaszcza porafinacyjne kwasy tłuszczowe, będące odpadem z przemysłu tłuszczowego.

