

**Marta Marcinkiewicz, Piotr Juszczak, Anita Rywińska,
Waldemar Rymowicz**

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
e-mail: Piotr.Juszczak@wnoz.up.wroc.pl

WPLYW WARUNKÓW HODOWLI DROŻDZY YARROWIA LIPOLYTICA NA WYDAJNOŚĆ SYNTEZY ERYTRYTOLU Z GLICEROLU*

Streszczenie: W hodowlach okresowych zbadano wpływ obrotów mieszadła w zakresie 400-1200 rpm na produkcję erytrytolu z glicerolu przez mutant octanowego *Y. lipolytica* Wratislavia K1. W badaniach wykorzystano glicerol odpadowy pochodzący z produkcji biodiesla. Wydajność procesu produkcji erytrytolu była na zbliżonym poziomie i wahała się od 0,46 (przy 1200 rpm) do 0,53 g/g (przy 800 rpm). Wyższą szybkość właściwą produkcji erytrytolu obserwowano przy szybkości obrotowej mieszadła w zakresie od 800 do 1200 rpm. W tych warunkach stopień nasycenia podłoża tlenem (pO_2) w fazie produkcji erytrytolu wynosił około 60%. W hodowli prowadzonej przy 800 rpm uzyskano najwyższe stężenie erytrytolu, 80 g/L, podobnie jak najwyższą objętościową i właściwą szybkość produkcji erytrytolu, odpowiednio 1,01 g/L/h i 0,068 g/g/h.

Słowa kluczowe: erytrytol, glicerol odpadowy, szybkość obrotów mieszadła, *Yarrowia lipolytica*.

1. Wstęp

Erytrytol jest alkoholem cukrowym należącym do grupy polioli. Składa się z czterech atomów węgla, z których każdy zawiera grupę hydroksylową. Związek ten jest niehigroskopijny, bardzo łatwo i szybko ulega krystalizacji. Jego bezwodne kryształy charakteryzują się słodkim smakiem bez żadnych obcych nieprzyjemnych posmaków. Forma krystaliczna odznacza się białym kolorem i wyglądem zbliżonym do kryształów sacharozy. Erytrytol to związek termostabilny, wykazujący odporność na środowisko o odczynie kwaśnym [Goossens, Gonze 1996]. Ze względu na wysoce ujemne ciepło rozpuszczania erytrytol przyczynia się do powstawania podczas spożycia produktów delikatnego odczucia chłodu [www.jungbunzlauer.com]. Erytrytol został uznany za zamiennik sacharozy czwartej generacji po sorbitolu (pierwszej ge-

* Badania realizowane w ramach projektu nr POIG.01.01.02-00-074/09; „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylogowych”.

neracji), izomalcie (drugiej generacji) i preparacie zawierającym ekstrakty roślinne o nazwie Alveosweet (trzeciej generacji) [Clarke 1995]. W stosunku do pozostałych polioli, stosowanych jako zamienniki cukru, ma najmniejszą masę cząsteczkową i dzięki temu charakteryzuje się wieloma interesującymi właściwościami, takimi jak wysoka aktywność wody i ciśnienie osmotyczne w roztworze.

Światowa Organizacja Zdrowia uznała erytrytol za całkowicie bezpieczny dodatek do żywności [WHO 1987]. W roku 1997 związek ten otrzymał status GRAS (Generally Recognized As Safe). W Polsce Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 18 września 2008 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych erytrytol (E968) został dopuszczony do stosowania jako dodatek do żywności zgodnie z Dyrektywą 2006/52/WE Parlamentu Europejskiego i Rady Europy z dnia 5 lipca 2006 r. w sprawie substancji słodzących używanych w środkach spożywczych.

Erytrytol można uzyskać różnymi metodami chemicznymi [Pat. DEU 734025, 1943; Pat. USA 2571967, 1951; Pat. USA 5756865, 1998; Pat. USA 2783283, 1957; Pfeifer i in. 1960], jednak produkcja chemiczna jest całkowicie nieopłacalna w procesie przemysłowym. Powodem są: wysokie koszty energii i substratów, problemy z rozdziałem dodatkowych produktów, a także obecność szkodliwych substancji powstających lub towarzyszących temu procesowi.

Erytrytol jako jedyny z wszystkich alkoholi wielowodorotlenowych jest produkowany na skalę przemysłową w procesach biotechnologicznych, w których wykorzystuje się zdolność niektórych grzybów do nadprodukcji tego związku. Takie predyspozycje zaobserwowano m.in. u osmofilnych drożdży należących do rodzajów *Pichia*, *Zygopichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Moniliella*, *Torula*, *Torulopsis*, *Trigonopsis*, *Trichosporon*, *Trichosporonoides*, *Pseudozyma* [Onishi 1960; Pat. JPN 026323, 1997; Pat. USA 5962287, 1997; Pat. USA 0034795 A1, 2002; Park i in. 2005; Jeya i in. 2009].

Głównymi substratami stosowanymi w procesie tworzenia erytrytolu przez drożdże są: glukoza, fruktoza, sacharoza czy hydrolizaty skrobiowe [Aoki i in. 1993; Yang i in. 1999; Yu i in. 2006]. Biosynteza erytrytolu z innych substratów, takich jak glicerol [Jeya i in. 2009] czy n-alkany [Hattori, Suzuki 1974], nie była tak korzystna jak w przypadku węglowodanów.

Erytrytol, początkowo jako produkt uboczny, został zidentyfikowany w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Dalsze badania pokazały, że w hodowli typu fed-batch i warunkach optymalnych dla tworzenia kwasu cytrynowego mutant octanowy Wratislavia K1 tworzył prawie tyle samo erytrytolu, co kwasu cytrynowego [Rymowicz i in. 2008]. Predyspozycje drożdży *Y. lipolytica* w zakresie jednoczesnej produkcji polioli i kwasu cytrynowego okazały się unikatowe, albowiem w opracowaniach naukowych innych ośrodków zajmujących się biosyntezą kwasu cytrynowego z glicerolu przy udziale tych mikroorganizmów nie wykazano obecności tych produktów ubocznych. Kolejne badania pokazały, iż w niskim pH podłoża hodowlanego produkcja kwasu cytrynowego zostaje zahamowana, natomiast drożdże produkują erytrytol z selektywnością procesu sięgającą nawet 80-90% [Rymowicz i in. 2009]. Ważnym aspektem związanym

z procesem biotechnologicznym jest dobór odpowiednich warunków prowadzenia hodowli, które pozwolą jednocześnie na maksymalizację wytwarzania pożądanego produktu i obniżenie kosztów produkcji.

Celem niniejszej pracy był dobór szybkości obrotów mieszadła bioreaktora do wydajnej produkcji erytrytolu z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał badawczy

Przedmiotem badań był mutant octanowy (oct) *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 o gładkim fenotypie kolonii. Szczep pochodzi z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

2.2. Podłoża hodowlane

W doświadczeniach stosowano podłoże inokulacyjne (g/L): glicerol – 50 lub glukoza – 50; ekstrakt drożdżowy – 3; ekstrakt słodowy – 3; bactopecton – 5; woda destylowana do 1 litra oraz podłoże produkcyjne (g/L): glicerol – 150; NH_4Cl – 2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; KH_2PO_4 – 0,25; ekstrakt drożdżowy – 1; woda wodociągowa – do 1 litra.

Surowiec: glicerol odpadowy pochodzący z produkcji biodiesla z rafinerii Trzebinia (grupa Lotos) o czystości 75% (v/w) zawierał 4% NaCl, 0,1% CH_3OH oraz makro- i mikroelementy: Ca, Mg, Zn, Fe i Cu w ilości, odpowiednio: 46; 6,7; 2,9; 0,92; 0,11 mg/kg.

Podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

2.3. Warunki prowadzenia hodowli

2.3.1. Hodowle inokulacyjne

Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH), w 0,3 L kolbach stożkowych zawierających 0,05 L podłoża inokulacyjnego przez 72 godz. w temperaturze 29,5°C, przy 140 rpm. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano 0,2 L zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

2.3.2. Hodowle produkcyjne bioreaktorowe

Proces biosyntezy erytrytolu prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B Plus (Sartorius, Niemcy) przy objętości roboczej 1,4 L. Szybkość napowietrzania wynosiła 0,48 L powietrza/1 L podłoża/1 minutę, szybkość obrotową mieszadła zmieniano co 200 rpm, w zakresie od 400 do 1200, temperatura 30°C. W czasie procesu kwasowość środowiska utrzymywano automatycznie za pomocą 20% roztworu NaOH na poziomie odpowiadającym pH 3.

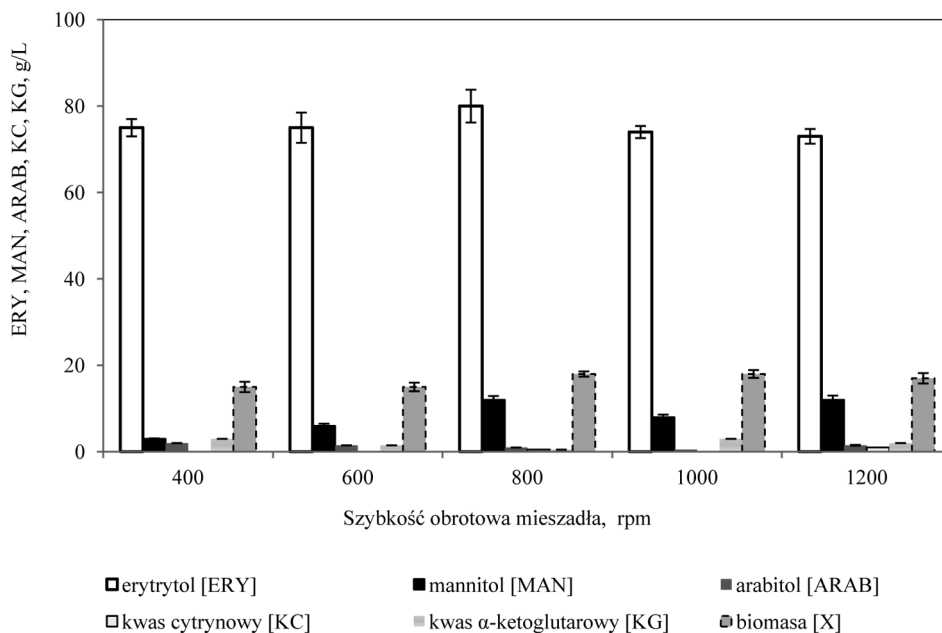
Dla każdego wariantu doświadczenia przeprowadzono trzy niezależne powtórzenia. Analiza statystyczna wyników obejmowała obliczenie: wartości średnich oraz odchyłeń standardowych.

2.4. Metody analityczne

Wydajność namnażania biomasy drożdży oznaczano metodą wagową. Stężenie glicerolu, erytrytolu, mannitolu, kwasu cytrynowego oraz kwasu α -ketoglutarynowego oznaczano metodą HPLC na kolumnie HyperRez XP carbohydrate H⁺ (Dionex, UltiMate 3000 Series) połączonej z detektorami UV ($\lambda = 210$ nm) i IR, w temperaturze 65°C. Szybkość przepływu fazy ciekłej (25 mM kwas trifluoroctowy; TFA) przez kolumnę wynosiła 0,6 cm³/min.

3. Wyniki i dyskusja

Zgodnie z założeniami przeprowadzono szereg hodowli okresowych drożdży, w których zmieniano szybkość obrotów mieszadła w bioreaktorze. Hodowle prowadzono do całkowitego wyczerpania glicerolu z podłoża produkcyjnego. Wyniki oznaczeń stężenia biomasy, erytrytolu i produktów ubocznych przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Wpływ szybkości obrotów mieszadła na produkcję erytrytolu, biomasy i produktów ubocznych z glicerolu przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1 (wartość średnia \pm odchylenie standardowe)

Źródło: opracowanie własne.

Hodowle prowadzone przy różnych szybkościach obrotowych odznaczały się zbliżonym stężeniem erytrytoli w pożywce w zakresie od 73 do 80 g/L (rys. 1). W hodowlach stwierdzono obecność niewielkich ilości produktów ubocznych, takich jak mannitol, arabitol, kwas cytrynowy oraz kwas α -ketoglutarynowy. Poziom zawartości mannitolu w podłożu produkcyjnym był zróżnicowany w zależności od szybkości obrotowej mieszadła, gdyż jego ilość wzrosła z 3 do 12 g/L wraz ze wzrostem szybkości obrotowej mieszadła z 400 do 1200 rpm (rys. 1). Stężenie pozostałych produktów ubocznych (arabitol, kwas cytrynowy i kwas α -ketoglutarynowy) w poszczególnych wariantach hodowli nie zależało od szybkości obrotowej mieszadła i nie przekroczyło 3 g/L. Końcowy plon biomasy był nieco niższy w hodowlach prowadzonych przy 400 i 600 rpm (15 g/L) w stosunku do pozostałych hodowli, w których wynosił 18 g/L (rys. 1).

Parametry charakteryzujące proces produkcji erytrytoli, takie jak wydajność oraz objętościowa i właściwa szybkość tworzenia erytrytoli, zostały zaprezentowane w tabeli 1.

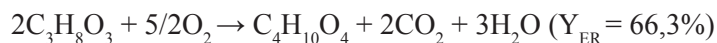
Tabela 1. Wpływ obrotów mieszadła na wydajność (Y_{ERY}) oraz objętościową (Q_{ERY}) i właściwą (q_{ERY}) szybkość produkcji erytrytoli z glicerolu przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1

Parametry kinetyczne	Obroty mieszadła, rpm				
	400	600	800	1000	1200
Y_{ERY} , g/g	0,48	0,47	0,53	0,48	0,46
Q_{ERY} , g/L/h	0,75	0,82	1,01	0,95	0,95
q_{ERY} , g/g/h	0,050	0,051	0,068	0,053	0,056

Źródło: opracowanie własne.

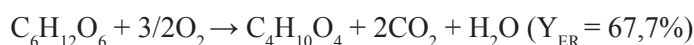
Wydajność produkcji erytrytoli była na podobnym poziomie przy różnych szybkościach obrotowych mieszadła, ale najwyższą wartość tego parametru, 0,53 g/g, stwierdzono przy 800 rpm (tab. 1).

Jak wynika ze stechiometrii reakcji, maksymalna teoretyczna wydajność produkcji erytrytoli z glicerolu wynosi 66,3% (0,66 g/g).



Sumaryczna reakcja otrzymywania erytrytoli z glicerolu.

Z bilansu reakcji otrzymywania erytrytoli z glukozy wynika, że wydajność produkcji erytrytoli z tego substratu może wynieść 67,7% (0,67 g/g).



Sumaryczna reakcja otrzymywania erytrytoli z glukozy.

Proces otrzymywania erytrytoli z wykorzystaniem glicerolu wymaga nieco większego nakładu energii. Biorąc jednak pod uwagę niską w ostatnich latach cenę

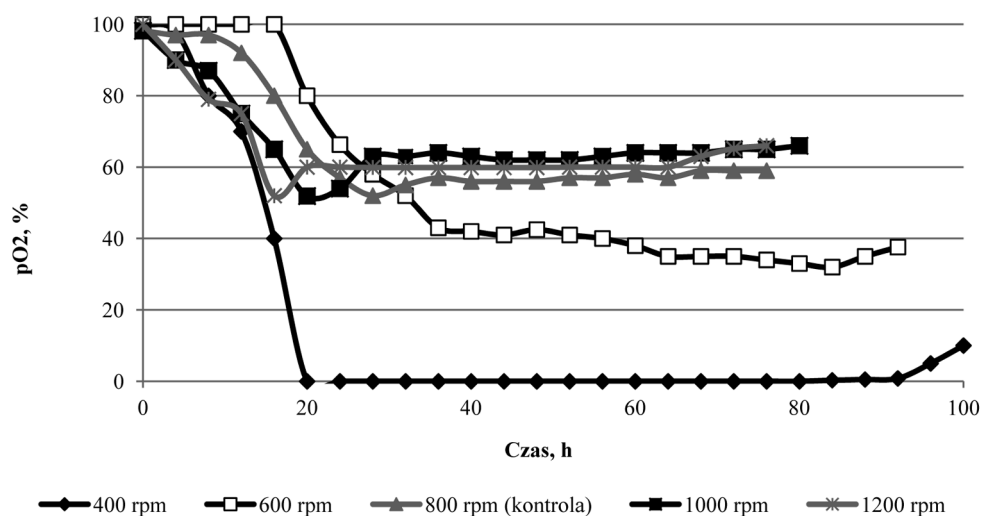
glicerolu, produkcja erytrytoli z tego surowca może okazać się w przyszłości konkurencyjna dla stosowanej dotychczas przemysłowej metody z wykorzystaniem surowców węglowodanowych.

Najwyższą, jak dotąd, wydajność syntezy erytrytoli z glukozy, 0,63 g/g, uzyskano w hodowli z udziałem szczepu *Moniliella* sp. 440 N61188-12 [Lin i in. 2010].

W niniejszej pracy zarówno objętościowa, jak i właściwa szybkość produkcji erytrytoli była wyższa przy szybkości obrotowej mieszadła w zakresie od 800-1200 rpm niż przy 400 i 600 rpm (tab. 1). Najlepsze parametry kinetyczne produkcji erytrytoli ($Q_{ERY} = 1,01$ g/L/h; $q_{ERY} = 0,068$ g/g/h) uzyskano w hodowli prowadzonej przy 800 rpm. Wpływ obrotów mieszadła na wydajność produkcji erytrytoli z dekstrozy przez *Moniliella tomentosa* var *pollinis* badali de Troostenbergh i Avalosse [PAT. EUROP. 0 136 802 A2, 1985]. Najwyższą wydajność produkcji erytrytoli 0,37 g/g autorzy ci uzyskali w hodowli prowadzonej przy 620 rpm, podczas gdy wyższe obroty (740 rpm) generowały tworzenie znacznych ilości produktów ubocznych – glicerolu i rybitoli. Również w świetle badań Savergave i in. [2011] szybkość obrotowa mieszadła miała zdecydowany wpływ na ilość tworzonych produktów ubocznych. Nie wykazano ich obecności w hodowli prowadzonej przy 450 rpm, która odznaczała się najlepszą wydajnością produkcji erytrytoli, równą 0,32 g/g, natomiast w hodowli prowadzonej przy 300 rpm powstało 21,6 g/L mannitolu, 38 g/L etanolu i zaledwie 29,4 g/L erytrytoli. Sawada i in. [2009] w hodowli *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42, prowadzonej w objętości roboczej 30 L przy obrotach mieszadła 280 rpm, osiągnęli najwyższą wydajność i szybkość właściwą produkcji erytrytoli – odpowiednio 0,49 g/g i 0,062 g/g/h.

Stopień nasycenia podłoża tlenem (%pO₂) zmieniał się w trakcie trwania każdej hodowli w wyniku różnych szybkości obrotowych mieszadła, a także różnego zapotrzebowania mikroorganizmów na tlen (rys. 2).

Czynniki te miały wpływ na długość trwania procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu z udziałem badanego mikroorganizmu, który skrócił się ze 100 do 76 h po zwiększeniu szybkości obrotowej z 400 do 800 rpm. W pierwszej dobie trwania procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu z udziałem wybranego drobnoustroju %pO₂ uległ obniżeniu we wszystkich analizowanych hodowlach. Ze względu na niską szybkość obrotową mieszadła, równą 400 rpm, nastąpiło całkowite wyczerpanie tlenu ze środowiska (stopień nasycenia tlenem podłoża = 0%). W wariantach z pozostałymi badanymi szybkościami obrotowymi wartość tego parametru uległa redukcji ze 100% do 40-50%. Było to najprawdopodobniej spowodowane wysokim zapotrzebowaniem na tlen ze strony mikroorganizmów będących w fazie wzrostu, które nie zostało wystarczająco wygenerowane w przypadku zastosowania w hodowli obrotów 400 rpm, natomiast pozostałe szybkości obrotowe pokrywały te wymagania. W kolejnych godzinach hodowli, związanych z fazą produkcji erytrytoli, stopień nasycenia tlenem podłoża utrzymywał się na poziomie: 0% w hodowli prowadzonej przy 400 rpm, 40-60% w hodowlach prowadzonych przy szybkości obrotowej mieszadła w zakresie od 600 do 1200 rpm. Z danych zaprezentowanych



Rys. 2. Wpływ szybkości obrotów mieszadła na stopień nasycenia tlenem podłoża produkcyjnego w procesie biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia K1

Źródło: opracowanie własne.

na rysunku 2 wynika, że wraz ze wzrostem szybkości obrotowej mieszadła stopień nasycenia tlenem stabilizował się w krótszym czasie. Tym samym proces biosyntezy erytrytoli z glicerolu z udziałem badanego szczepu drożdży zależał od stopnia nasycenia tlenem podłoża zarówno podczas wzrostu badanego drobnoustroju, jak i w fazie produkcji erytrytoli. Dzięki odpowiedniemu natlenieniu podłoża hodowlanego możliwe było skrócenie czasu trwania biosyntezy erytrytoli z glicerolu oraz zwiększenie szybkości jego produkcji.

4. Podsumowanie

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że glicerol jest dobrym substratem do biosyntezy erytrytoli przez mutant octanowego *Y. lipolytica* Wratislavia K1. Możliwość wykorzystania w tym procesie produktu odpadowego, pochodzącego z produkcji biodiesla, ma niebagatelne znaczenie zarówno ekonomiczne, jak i ekologiczne. Wydajność, efektywność i selektywność procesu produkcji erytrytoli z glicerolu są porównywalne z cytowanymi w literaturze z tego zakresu. Szczep produkuje erytrytol z wysoką wydajnością w podłożu syntetycznym. Dodatkowo wydajna biosynteza tego związku ma miejsce w środowisku o niskim pH oraz w szerokim zakresie obrotów mieszadła, co ma istotne znaczenie w ciągłych systemach hodowlanych oraz podczas zwiększania skali produkcji.

Literatura

- Aoki M.A.Y., Pastore G.M., Park Y.K., *Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol*, Biotechnology Letters 1993, 14, s. 38.
- Clarke J., *Bulk sweeteners-multiple choice and the multi-sweetener concept*, Food Technology Europe 1995, 5, s. 185.
- Goossens J., Gonze M., *Nutritional properties and applications of erythritol: a unique combination?* [w:] *Advances in Sweeteners*, ed. T.H. Grenby, Blackie A&P, Glasgow 1996.
- Hattori K., Suzuki T., *Production of erythritol by n-alkane grown yeasts*, Agricultural and Biological Chemistry 1974, 38, s. 581-586.
- Jeya M., K.M. Lee, Tiwari M.K., Kim J.S., Gunasekaran P., Kim S.Y., I.W. Kim I.W., Lee J.K., *Isolation of a novel high erythritol-producing Pseudozyma tsukubaensis and scale-up of erythritol fermentation to industrial level*, Applied Microbiology And Biotechnology 2009, 83(2), s. 225.
- Lin S.-J., Wen C.-Y., Wang P.-M., Huang J.-C., Wei C.-L., Chang J.-W., Chu W.-S., *High-level production of erythritol by mutants of osmophilic Moniliella sp.*, Process Biochemistry 2010, 45(6), s. 973.
- Onishi H., *Studies on osmophilic yeasts. Part XII. Polyalcohol production by various genera and species of yeasts*, Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 1960, 24(2), s. 131.
- Park Y.C., Lee D.Y., Lee D.H., Kim H.J., Ryu Y.W., Seo J.H., *Proteomics and physiology of erythritol-producing strains*, Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 2005, 815, s. 251.
- Pat USA 5962287 (1997).
- Pat. DEU 734025 (1943).
- PAT. EUROP. 0 136 802 A2 (1985).
- Pat. JPN 026323 (1997).
- Pat. USA 0034795 A1 (2002).
- Pat. USA 2571967 (1951).
- Pat. USA 2783283 (1957).
- Pat. USA 5756865 (1998).
- Pfeifer V.F., Sohns V.E., Conway H.F., Lancaster E.B., Dabic S., Griffin E.L., *Two-stage process for dialdehyde starch using electrolytic regeneration of periodic acid*, Industrial and Engineering Chemistry 1960, 52(3), s. 201.
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., *Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by Yarrowia lipolytica Wratislavia K1*, Chemical Papers 2008, 62, s. 239.
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., *High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of Yarrowia lipolytica*, Biotechnology Letters 2009, 31, s. 377.
- Rywińska A., Skrzypińska A., Juszczyk P., Boruczowski T., Rymowicz W., *Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego i polioli z glicerolu i glukozy przez drożdże Yarrowia lipolytica*, Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia 2008, 7(1), s. 27-38.
- Savergave L.S., Gadre R.V., Vaidya B.K., Narayanan K., *Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from Candida magnoliae mutant R23*, Biochemical Engineering Journal 2011, 55, s. 92.
- Sawada K., Taki A., Yamakawa T., Seki M., *Key role for transketolase activity in erythritol production by Trichosporonoides megachiliensis SN-G42*, Journal of Bioscience and Bioengineering 2009, 108, s. 385.
- WHO Setting ADI. In Principles for the Safety Assessment of Food Additives and Contaminants in Foods, 1987.
- www.jungbunzlauer.com

- Yang S.W., Park J.B., Han N.S., Ryu Y.W., Seo J.H., *Production of erythritol from glucose by an osmophilic mutant of Candida magnolia*, Biotechnology Letters 1999, 21(10), s. 887-890.
- Yu J.H., Lee D.H., Oh Y.J., Han K.C., Ryu Y.W., Seo J.H., *Selective utilisation fructose to glucose by Candida magnoliae, an erythritol producer*, Applied Biochemistry and Biotechnology 2006, 131, s. 129-132.

THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON ERYTHRITOL SYNTHESIS YIELD BY *YARROWIA LIPOLYTICA* FROM GLYCEROL

Abstract: The aim of the present study was to determine agitation rate for synthesis of erythritol from glycerol by acetate negative mutant Wratislavia K1 of *Y. lipolytica* strain. The effects of agitation rates from 400 to 1200 rpm on erythritol production from crude glycerol derived from biodiesel production in batch culture were studied. The yield of erythritol production was similar and ranged from 0.46 to 0.53 g/g. Higher value of volumetric and specific erythritol production rate were achieved at agitation rate in the range of 800 – 1200 rpm. In these conditions, dissolved oxygen concentration in erythritol production phase was maintained at the level about 60%. The highest erythritol concentration (80.0 g/L) was obtained at 800 rpm and in this culture the volumetric erythritol and specific erythritol production rate were also the highest, 1.01 g/L/h and 0.068 g/g/h, respectively.

Keywords: erythritol, crude glycerol, agitation rate, *Yarrowia lipolytica*.