

Dr inż. Agata FABISZEWSKA¹

Patrycja MAZURCZAK²

Agnieszka PIELIŃSKA²

Bartłomiej ZIENIUK²

Dr inż. Dorota NOWAK³,

Prof. dr hab. Ewa BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK¹

¹ Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności

² Biotechnologia, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

³ Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, Wydział Nauk o Żywności

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

PRÓBA ZASTOSOWANIA DROŻDŻY YARROWIA LIPOLYTICA KKP 379 W ZAGOSPODAROWANIU ODPADÓW PRZEMYSŁU RYBNEGO®

The attempt to apply *Yarrowia Lipolytica* KKP379 yeast in fishery
industry wastes management®

Słowa kluczowe: aktywność lipolityczna, odpady przemysłu rybnego, plon biomasy, *Y. lipolytica*.

Celem pracy przedstawionej w artykule była ocena możliwości zastosowania kilku produktów odpadowych pochodzących z przetwórci ryb (solanki, dwóch rodzajów odpadów po procesie wędzenia ryb oraz szlamu) jako źródła węgla do wzrostu dzikiego szczepu drożdży Y. lipolytica KKP 379. Najwyższy średni plon biomasy drożdży uzyskano w podłożu zawierającym szlam jako źródło węgla, natomiast najwyższą średnią aktywność lipolityczną oznaczono w płynie pochodzącym z podłoża zawierającego olej odpadowy po procesie wędzenia. Wprawdzie średnia zewnątrzkomórkowa aktywność lipolityczna drożdży była niższa w porównaniu z uzyskaną w podłożu z oliwą z oliwek (znanym aktywatorem syntezy lipaz), ale zaletą przedstawionego rozwiązania mogą być względy ekonomiczne i ekologiczne.

Key words: lipase activity, fishery industry wastes, biomass yield, *Y. lipolytica*.

The aim of the study presented in the paper was to evaluate the possibility of application some fishery wastes (oily wastes from fish smoking process, fish leach and sludge) as a carbon sources in the culture medium for wild strain of yeast Y. lipolytica KKP 379. The highest average yeast biomass yield was achieved in the presence of sludge, but the highest lipase activity was observed in the presence of oily wastes from fish smoking process. The extracellular lipase activity in the culture medium was lower than that obtained in the presence of oil olive (the common activator of lipase synthesis), however this approach may be recommended due to the economic and environmental reasons.

WSTĘP

Utylizacja odpadów i zarządzanie produktami ubocznymi powstającymi w procesie wytwarzania żywności stanowią istotny problem z punktu widzenia ochrony środowiska oraz zrównoważonego rozwoju. Odpady pochodzące z zakładów przemysłu rybnego są jednymi z bardziej uciążliwych ścieków, zarówno dla samych przetwórci jak i lokalnych oczyszczalni. Wyjątkowa trudność ich utylizacji wynika z dużej zawartości materii organicznej i wody, podatności na utlenianie oraz możliwości występowania patogennej mikroflory. Z drugiej strony jednak odpady przemysłu rybnego mogą być źródłem soli mineralnych, białka oraz tłuszczów, co stwarza możliwość ich wykorzystania w przetwarzaniu do bardziej wartościowych produktów, jak np. suplementów kwasów tłuszczowych, nawozów, mączki rybnej czy hydrolizatów białkowych [11, 17]. Mogą one także stanowić cenne źródło składników niezbędnych do wzrostu mikroorganizmów [15] i tym samym istnieje możliwość ich zastosowania w podłożach do hodowli drobnoustrojów w produkcji

różnorodnych metabolitów i/lub białek enzymatycznych, np. drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica*. Drożdże te są jednym z ważnych mikrobiologicznych producentów białka paszowego (tzw. SCP – ang. *single cell protein*), kwasu cytrynowego, związków zapachowych oraz enzymów, w tym proteaz i lipaz [2, 3]. Komórki drożdży *Y. lipolytica* mogą asymilować substraty hydrofobowe, dzięki złożonemu metabolizmowi obejmującemu kilka szlaków metabolicznych. Ekonomia procesu syntezy metabolitów drożdży jest w głównej mierze zależna od kosztów i dostępności odpowiedniego źródła węgla i azotu w podłożu hodowlanym, więc poszukiwanie nowych, tanich substratów, takich jak odpady przemysłu rybnego, staje się zasadnym i interesującym zagadnieniem badawczym [15].

Celem artykułu jest pokazanie możliwości zastosowania kilku produktów odpadowych pochodzących z zakładów przemysłu rybnego (solanki, dwóch rodzajów odpadu po wędzeniu ryb oraz szlamu) jako źródła węgla w procesach hodowli dzikiego szczepu drożdży Y. lipolytica KKP 379, jak również ocena wpływu tego podłoża

na zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną badanego szczepu.

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Badania prowadzono z udziałem szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379, pochodzącego z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie. Drożdże przechowywano na skosach na podłożu agarowym YPG w temperaturze 4°C.

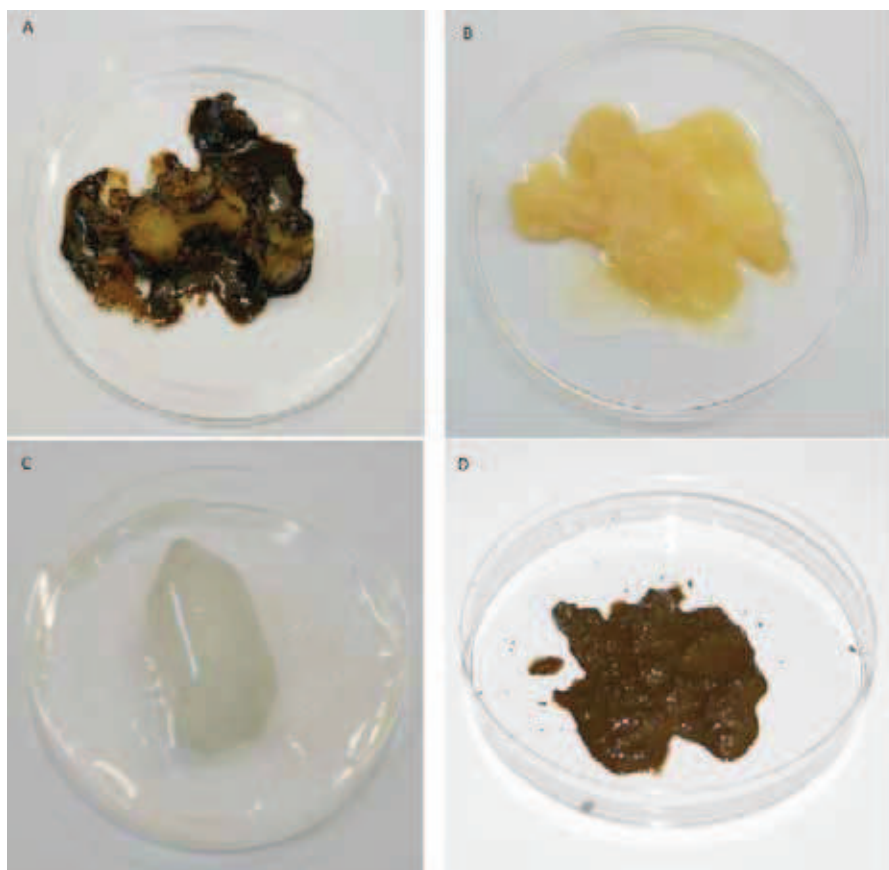
Wszystkie eksperymenty wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Hodowlę inokulacyjną prowadzono przez 24 h w temperaturze 28°C w 100 cm³ płynnego

podłoża YPG, szczepionego za pomocą ezy biomasą drożdży przechowywanych na skosach agarowych. Właściwe hodowle wstrząsane prowadzono w objętości 100 cm³ płynnego podłoża YP (zawierającego 1% ekstraktu drożdżowego i 2% peptonu), wzbogaconego o dodatek 2% oliwy z oliwek lub produktów odpadowych pochodzących z zakładów przemysłu rybnego (solanki, dwóch rodzajów olejów odpadowych po procesie wędzenia ryb lub szlamu – końcowego produktu odpadowego). Początkowe pH podłoża ustalono na poziomie 5,0. Objętość stosowanego inokulum wynosiła 0,1% v/v. Na rysunku nr 1 zaprezentowano fotografie próbek wszystkich czterech zastosowanych w podłożach odpadów poprodukcyjnych.

Hodowle właściwe prowadzono przez 65 h w temperaturze 28°C na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej IKA KS 4000 ic control przy 150 obrotach na minutę. Komórki drożdży oddzielano po hodowli od podłoża poprzez wirowanie przy 8000 rpm (6784 rcf) przez 10 minut w temperaturze 10°C przy użyciu wirówki MPW-351R. Plon biomasy określano na podstawie mokrej masy oraz suchej biomasy drożdży metodą termograwimetryczną, automatycznie w wagosuszarnie Radwag MAC 50/NH.

Zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną enzymów syntetyzowanych przez drożdże i wydzielanych do podłoża hodowlanego oznaczano metodą spektrofotometrycznego pomiaru postępu reakcji hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu (rys. 2) [12, 13]. Za jednostkę aktywności enzymatycznej lipaz 1 U przyjęto taką ilość enzymu, która jest w stanie uwolnić 1 μmol *p*-nitrofenolu w czasie 1 minuty w warunkach oznaczenia w temperaturze 37°C. Krzywą wzorcową dla stężenia *p*-nitrofenolu wyznaczono, sporządzając roztwory wzorcowe *p*-nitrofenolu w zakresie stężeń od $4,4 \times 10^{-6}$ M/cm³ do $3,7 \times 10^{-7}$ M/cm³. Do reakcji pobierano 15 cm³ płynu hodowlanego, w którym znajdowały się zewnątrzkomórkowe enzymy lipolityczne.

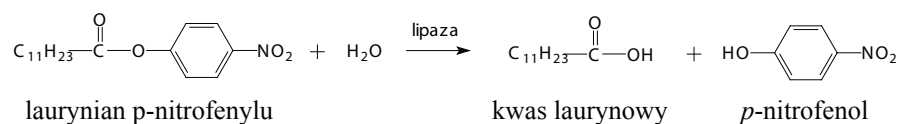
Analizę składu kwasów tłuszczowych (po derywatywacji do postaci estrów metylowych metodą PN-EN ISO 5509) wykonano z użyciem chromatografu gazowego z detektorem FID (Agilent Technologies GC 7890A). Zastosowano następujące warunki pracy chromatografu gazowego: kolumna kapilarna SUPELCOWAX 10 (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm), gaz nośny – hel, temperatura dozownika 250°C, temperatura początkowa kolumny 200°C, przyrost temperatury



Rys. 1. Fotografie próbek czterech zastosowanych w podłożach odpadów poprodukcyjnych przemysłu rybnego, w tym dwóch odpadów półpłynnych czyli olejów odpadowych po procesie wędzenia ryb (A – wędzarnia nr 1 i B – wędzarnia nr 2), jednego odpadu płynnego czyli solanki odpadowej (zaprezentowana w postaci zamrożonej, C) oraz odpad stały, czyli szlam (D).

Fig. 1. Pictures of fishery industry wastes used in culture media, including two waste slurries – oily wastes from fish smoking process (A and B), one liquid waste – fish leach waste (presented in frozen form, C) and solid waste – sludge (D).

Fot.: P. Mazurczak



Rys. 2. Hydroliza laurynianu *p*-nitrofenylu z udziałem lipaz *Y. lipolytica*.

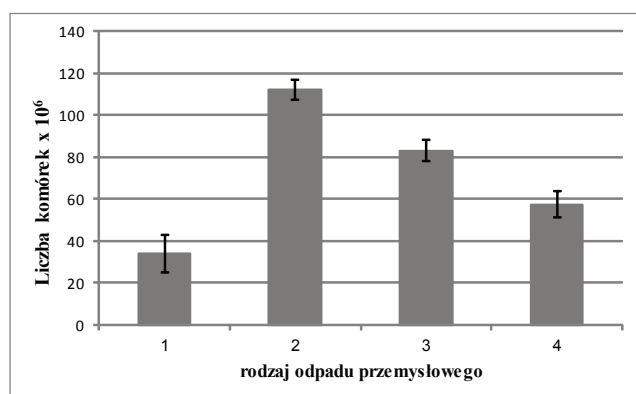
Fig. 2. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl laurate involving *Y. lipolytica* lipases.

Źródło: Badania własne

4°C/min do 260°C, izoterma 260°C przez 10 min, podział strumienia 50:1, nastrzyk autosamplerem 1 x 1 µl, temperatura detektora 260°C [7]. Dodatkowo w celu identyfikacji kwasów tłuszczowych zastosowano spektrometrię mas. Analizę wykonano w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego w Warszawie.

WYNIKI

W badaniach wstępnych drożdże *Y. lipolytica* KKP 379 hodowano w podłożach zawierających odpady przetwórstwa rybnego wprowadzone do sterylnej wody, ale nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów nawet po 96 h hodowli. Z tego względu podłoża hodowlane uzupełniono o dodatkowe składniki. Uzupełnienie składu podłoży dodatkiem peptonu oraz ekstraktu drożdżowego jako źródła azotu, mikro- i makroelementów skutkowało dobrym wzrostem badanego szczepu drożdży (rys. 3). Po 65 h hodowli najwyższą liczbę komórek drożdży *Y. lipolytica* – $1,12 \times 10^8$ komórek/cm³ zaobserwowano w podłożu z jednym z odpadowych olejów po procesie wędzenia (odpad nr 2, rys. 3); w podłożu z solanką (odpad nr 3) oraz w podłożu ze szlamem (odpad nr 4) stwierdzono nieco mniejsze (odpowiednio $8,32 \times 10^7$ i $5,75 \times 10^7$ komórek drożdży/cm³).

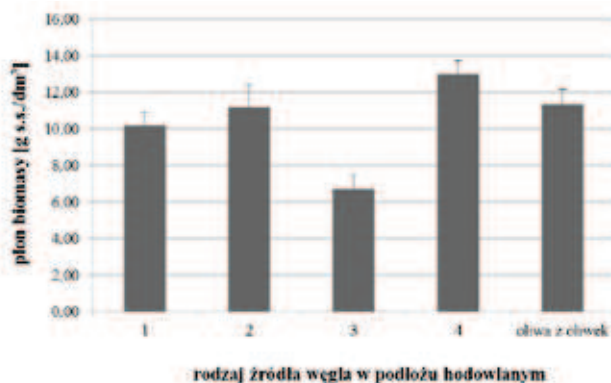


Rys. 3. Wpływ rodzaju odpadu z zakładu przemysłu rybnego na liczbę komórek szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 po 65 h hodowli. Zastosowany odpad przemysłowy w podłożu: 1 – odpadowy olej po procesie wędzenia (wędzarnia nr 1), 2 – odpadowy olej po procesie wędzenia (wędzarnia nr 2), 3 – solanka, 4 – szlam.

Fig. 3. The influence of fishery industry wastes on the number of *Y. lipolytica* KKP 379 cells after 65 h of shaking culture. Fishery industry wastes used in media: 1 – oily wastes from fish smoking process (no. 1), 2 – oily wastes from fish smoking process (no. 2), 3 – fish leach waste, 4 – sludge.

Źródło: Badania własne

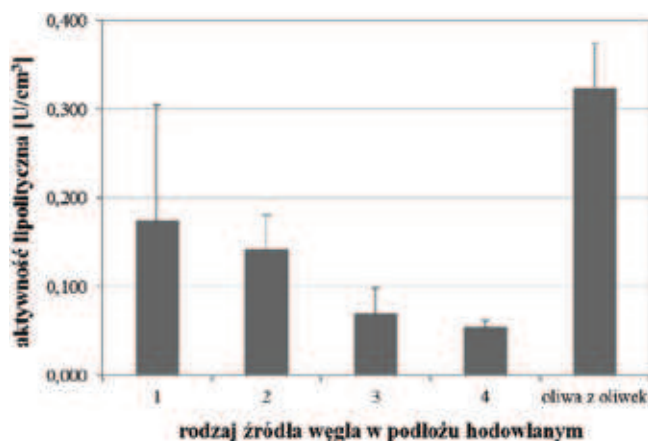
Oznaczono także plon biomasy drożdży (rys. 4) oraz aktywność lipolityczną płynu pohodowlanego (rys. 5) po 65 h hodowli wstrząsanej. Najwyższy średni plon biomasy ($13,02$ g s.s./dm³) uzyskano w podłożu, w którym zastosowano stały materiał odpadowy – szlam (rys. 4). Istotnie niższy plon biomasy otrzymano, stosując solankę odpadową – $6,75$ g s.s./dm³. Dla pozostałych dwóch odpadów przemysłu rybnego, czyli olejów odpadowych po wędzeniu, plon biomasy



Rys. 4. Wpływ dodatku odpadowych produktów przemysłu rybnego w podłożu hodowlanym na plon biomasy szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 po 65 h hodowli. Zastosowany odpad przemysłowy w podłożu: 1 – odpadowy olej po procesie wędzenia (wędzarnia nr 1), 2 – odpadowy olej po procesie wędzenia (wędzarnia nr 2), 3 – solanka, 4 – szlam.

Fig. 4. The influence of fishery industry wastes in culture medium on *Y. lipolytica* KKP 379 biomass yield after 65 h of shaking culture. Fishery industry wastes used in media: 1 – oily wastes from fish smoking process (no. 1), 2 – oily wastes from fish smoking process (no. 2), 3 – fish leach waste, 4 – sludge.

Źródło: Badania własne



Rys. 5. Wpływ dodatku odpadowych produktów przemysłu rybnego w podłożu hodowlanym na zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 po 65 h hodowli. Zastosowany odpad przemysłowy w podłożu: 1 – odpadowy olej po procesie wędzenia (wędzarnia nr 1), 2 – odpadowy olej po procesie wędzenia (wędzarnia nr 2), 3 – solanka, 4 – szlam.

Fig. 5. Influence of fishery industry wastes in culture medium on extracellular *Y. lipolytica* KKP 379 lipase activity after 65 h of shaking culture. Fishery industry wastes used in media: 1 – oily wastes from fish smoking process (no. 1), 2 – oily wastes from fish smoking process (no. 2), 3 – fish leach waste, 4 – sludge.

Źródło: Badania własne

nie różnił się istotnie w porównaniu do tego osiągniętego w podłożu ze szlamem. Solanka odpadowa zawierała najprawdopodobniej mniej tłuszczu i białka, w związku z tym była najmniej wartościowym źródłem węgla dla badanego szczepu drożdży, a uzyskany plon biomasy po 65 h hodowli był najniższy. Dla porównania w przypadku zastosowania podłoża YPG plon biomasy wynosił 9,44 g s.s./dm³ [7].

Dużo większą różnorodność wśród wyników zaobserwowano badając zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną płynu pochodzącego (rys. 5). Najwyższą średnią aktywność lipaz oznaczono w płynie pochodzącym z podłoża zawierającego olej odpadowy z wędzarni nr 1 (0,175 U/cm³), niższą aktywnością lipolityczną odznaczały się drożdże hodowane w podłożu z olejem odpadowym z wędzarni nr 2 (0,143 U/cm³). Najniższą aktywność lipolityczną zaobserwowano w podłożu ze szlamem (0,055 U/cm³). Jednak w każdym przypadku była to aktywność wyższa w porównaniu z zaobserwowaną dla drożdży hodowanych jedynie na podłożu YPG (0,037 U/cm³ [7]). Należy zauważyć, że wzrost drożdży *Y. lipolytica* może być hamowany z powodu niedostatecznego dotlenienia komórek w hodowli wstrząsanej oraz na skutek obecności toksycznych związków znajdujących się w materiałach odpadowych. To

mogłoby wyjaśniać, dlaczego najniższą zewnątrzkomórkową aktywność lipaz stwierdzono w podłożu ze stałym odpadem przemysłu rybnego. Ten rodzaj odpadu nie jest wolny od wielu detergentów używanych w procesie mycia ryb, a jako końcowy odpad poprodukcyjny zawiera największą ilość zanieczyszczeń.

Co ciekawe, uzyskany plon biomasy w podłożach z odpadami przetwórstwa rybnego był porównywalny do plonu uzyskanego w podłożu z oliwą z oliwek (powszechnie stosowanym źródłem węgla w podłożach stymulujących aktywność lipolityczną drobnoustrojów), zaś średnia aktywność lipaz syntetyzowanych do podłoża hodowlanego zawierającego odpadowe oleje po wędzeniu, była zaledwie dwa razy niższa niż ta uzyskana w podłożu z oliwą z oliwek (rys.5).

Dodatkowo przeprowadzono analizę składu kwasów tłuszczowych znajdujących się w postaci acylogliceroli lub w postaci wolnych kwasów w obu olejach odpadowych po procesie wędzenia ryb, które stosowano w podłożach hodowlanych i otrzymane wyniki porównano z oznaczeniami dla oliwy z oliwek (tab. 1). Zaobserwowano istotne różnice, które mogły mieć bezpośredni wpływ na aktywność lipolityczną badanego szczepu drożdży, gdyż jak wiadomo komórki drożdży *Y. lipolytica* potrafią selektywnie

Tab. 1. Skład kwasów tłuszczowych zawartych w oliwie z oliwek oraz w badanych odpadowych olejach po procesie wędzenia ryb [zawartość procentowa wszystkich kwasów tłuszczowych]

Tab. 1. Fatty acid composition of olive oil and oily wastes from fish smoking process [% total fatty acid content in oil]

Kwas tłuszczowy			Oliwa z oliwek	Odpadowy olej po procesie wędzenia (nr 1)	Odpadowy olej po procesie wędzenia (nr 2)
Symbol	Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa			
C12:0	dodekanowy	laurynowy	0	0,05	0,05
C13:0	tridekanowy	-	0	0,04	0,04
C14:0	tetradekanowy	mirystynowy	0	6,09	5,97
-	trimetylotridekanowy	-	0	0,14	0,13
C14:1	tetradecenowy	mirystooleinowy	0	0,06	0,05
C15:0	pentadekanowy	-	0	0,72	0,71
-	metylotetradekanowy	-	0	0,08	0,07
C16:0	heksadekanowy	palmitynowy	10,27	13,37	13,13
C16:1	heksadecenowy	palmitooleinowy	0	4,72	4,29
C16:2	heksadekadienowy	-	0	0,27	0,24
-	metyloheksadecenowy	-	0	0,52	0
C16:4	heksadekatetraenowy	-	0	0,36	0,33
C17:0	heptadekanowy	margarynowy	0,07	0,35	0,34
C17:1	heptadecenowy	margaroleinowy	0,13	0,27	0,36
C18:0	oktadekanowy	stearynowy	3,15	2,28	2,21
C18:1	oktadecenowy	oleinowy	77,86	16,29	16,68
C18:2	oktadekadienowy	linolowy	6,17	1,81	1,94
C18:3	oktadekatrienowy	linolenowy	0,63	1,3	1,39
C18:4	oktadekatetraenowy	stearydonowy	0	3,85	4,11
C20:0	eikozanowy	arachidowy	0,41	0	0
C20:1	eikozenowy	-	0,29	9,63	9,22
C20:2	eikozadienowy	-	0	0	0,3
C20:3	eikozatrienowy	-	0	0	0,29
C20:4	eikozatetraenowy (ARA)	arachidonowy	0	1,36	1,37
C20:5	eikozapentaenowy (EPA)	-	0	7,51	7,62
C22:0	dokozaanowy	behenowy	0,11	0	0
C22:1	dokozenowy	erukowy	0	15,25	13,76
C22:5	dokozapentaenowy (DPA)	-	0	1,68	1,86
C22:6	dokozaheksaenowy (DHA)	-	0	11,67	12,33
C24:0	tetrakozanowy	lignocerynowy	0,05	0	0
C24:1	tetrakozenowy	nerwonowy	0	0	0

Źródło: Badania własne

wykorzystywać kwasy tłuszczowe, a preferencje te mogą być zależne nie tylko gatunkowo, ale i szczepowo [14].

Oliwa z oliwek, będąca olejem roślinnym, stanowiła bogate źródło kwasów tłuszczowych, takich jak kwas oleinowy (77,86%) oraz kwas linolowy (6,17%). Dla porównania, rybne oleje odpadowe zawierały około 16,5% kwasu oleinowego oraz mniej niż 2% kwasu linolowego. Wszystkie oleje zawierały dość znaczącą ilość kwasu palmitynowego, odpowiednio: 10,27% w oliwie z oliwek; 13,37 i 13,13% w olejach po wędzeniu ryb. Natomiast rybne oleje odpadowe (tab.1) były bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3, takie jak eikozapentaenowy (EPA, średnio 7,57%), dokozapentaenowy (DPA, średnio 1,77%) i dokozaheksaenowy (DHA, średnio 12%) oraz oktedekateetraenowy (średnio 3,98%). W porównaniu z oliwą z oliwek w ich składzie stwierdzono znacznie wyższe zawartości kwasu eikozenowego (odpowiednio 0,29% w oliwie z oliwek oraz 9,63 i 9,22% w olejach odpadowych), a także oznaczono kwasy tłuszczowe niezidentyfikowane w oliwie z oliwek, jak m.in. nasycony kwas mirystynowy (średnio 6,03%) oraz kwasy jednonienasycone: palmitooleinowy (średnio 4,51%) i erukowy (średnio 14,51%). Warto podkreślić, że oba oleje odpadowe posiadały zbliżony skład kwasów tłuszczowych.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Odpady poprodukcyjne stanowią doskonałe źródło składników do wzrostu mikroorganizmów i w związku z tym mogą być wykorzystane w mikrobiologicznej produkcji enzymów. Rebah i Miled [15] opublikowali ciekawy artykuł przeglądowy o zastosowaniu odpadów przetwórstwa rybnego w mikrobiologicznej syntezie takich białek enzymatycznych, jak proteazy, lipazy, enzymy chitynolityczne czy lignocelulityczne. Autorzy zaznaczają, że głównym czynnikiem determinującym wykorzystanie odpadów w syntezie lipaz jest obecność substratów lipidowych w podłożu, a ten warunek spełniają odpady przemysłu rybnego, z reguły zawierające znaczne ilości tłuszczów.

W przetwarzaniu materiałów odpadowych do produktów o wyższej wartości stosowano także szczepy drożdży *Y. lipolytica*. Okazało się, że hodowla tego gatunku w podłożach zawierających ścieki po produkcji oliwy z oliwek oraz oleju palmowego znacznie obniża chemiczne zapotrzebowanie na tlen – wskaźnik będący miarą zanieczyszczeń [2]. Podejmowano także pozytywne próby zastosowania szczepów *Y. lipolytica* w zagospodarowaniu takich materiałów odpadowych, jak otręby jęczmienne, odpady łojowe, odpady po produkcji przetworów ananasowych, warzywnych, odpady po produkcji oleju sojowego i oleju babassu. Jednocześnie w poszczególnych przypadkach odnotowano istotny przyrost biomasy drożdży lub produkcję takich metabolitów, jak m.in. lipazy, olej mikrobiologiczny, surfaktanty czy kwas cytrynowy [2, 16].

Yano i in. (2008) badali zdolność szczepu drożdży *Y. lipolytica* NR BC-10073 do hydrolizy lipidów zawartych w stałych odpadach przemysłu rybnego, które stanowiły rozdrobione kawałki ryb i wykazali jego skuteczność w zmniejszeniu zawartości składników lipidowych w odpadach w wyniku fermentacji prowadzonej w fazie stałej. Jednocześnie autorzy ocenili, że drożdże wykorzystywały mniej niż 1% białka

zawartego w odpadach rybnych, chociaż gatunek *Y. lipolytica* znany jest ze swoich silnych właściwości proteolitycznych. Autorzy, jako jedną z przyczyn zaobserwowanych prawidłowości, uznali niedostateczne natlenienie hodowli [17]. Kwasy tłuszczowe pochodzące z hydrolizy tłuszczów są metabolizowane w komórkach drożdży w procesie β -oksydacji – wymagającym dużej dostępności tlenu [8], co powinno zostać uwzględnione w badaniach nad metodą biotechnologicznego wykorzystania drożdży w utylizacji odpadów poprodukcyjnych przemysłu rybnego.

Akpinar i Uçar (2013) ocenili z kolei zdolność trzech różnych szczepów *Y. lipolytica* do produkcji lipaz podczas wzrostu w podłożach z trzema różnymi lipidowymi źródłami węgla (tributyryną, oliwą z oliwek i olejem rybnym). Wszystkie substraty stymulowały syntezę enzymów lipolitycznych, w tym 1% dodatek oleju rybnego okazał się być silniejszym induktorem aktywności lipaz, niż pozostałe dwa źródła węgla [1]. Stosowany przez cytowanych autorów olej był oczyszczonym produktem wysokiej jakości. Jak dotąd brak jest doniesień dotyczących produkcji lipaz w podłożach z nieoczyszczonymi lub odpadowymi olejami rybnymi. Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy to pierwsza tego typu próba zastosowania drożdży *Y. lipolytica* w biotechnologicznej metodzie syntezy lipaz, przy jednoczesnym zagospodarowaniu odpadów przemysłu rybnego.

Zewnątrzkomórkowa aktywność lipolityczna szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 hodowanego w podłożu zawierającym olej odpadowy po procesie wędzenia była niższa w porównaniu z aktywnością uzyskaną w podłożu z oliwą z oliwek, która jest znanym aktywatorem syntezy lipaz [4, 5, 7]. Większość autorów uważa, że aktywujący wpływ oliwy z oliwek na syntezę lipaz zewnątrzkomórkowych wynika z wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 55 do 83%), który najprawdopodobniej jest induktorem promotora genu LIP2, odpowiadającego za zewnątrzkomórkową aktywność *Y. lipolytica* [9]. Warto jednak podkreślić, że nie wszystkie lipazy zewnątrzkomórkowe są w równym stopniu aktywowane przez obecność w podłożu oliwy z oliwek, dlatego w mikrobiologicznej produkcji lipaz zastosowanie znajdują też inne oleje pochodzenia roślinnego [6, 7]. Podobne zastosowanie mają także różne substraty hydrofobowe, jak omawiane w niniejszej pracy odpady przetwórstwa rybnego o zdecydowanym charakterze lipidowym; dla kontynuacji badań w tym kierunku decydujące znaczenie mają względy ekonomiczne i ekologiczne.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń sformułowano następujące wnioski i spostrzeżenia:

1. We wszystkich badanych podłożach hodowlanych zawierających 2% odpadów poprodukcyjnych przemysłu rybnego zaobserwowano wzrost drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 na poziomie od ok 3×10^7 do $1,1 \times 10^8$ komórek/cm³ po 65 h hodowli wstrząsanej oraz dowiedziono, że istnieje potencjał zastosowania drożdży *Y. lipolytica* w zagospodarowaniu tego materiału odpadowego i jednoczesnej produkcji enzymów lipolitycznych.
2. Najwyższy średni plon biomasy drożdży uzyskano w podłożu zawierającym szlam (stały odpad poprodukcyjny)

jako źródło węgla, natomiast najwyższą średnią aktywność lipolityczną oznaczono w płynie pohodowlanym z podłoża zawierającego olej odpadowy po procesie wędzenia.

- Średnia zewnątrzkomórkowa aktywność lipolityczna szczepu drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 hodowanego w podłożu zawierającym olej odpadowy po procesie wędzenia była niższa w porównaniu z uzyskaną w podłożu z oliwą z oliwek (znanym aktywatorem syntezy lipaz), ale zaletą przedstawionego rozwiązania mogą być względy ekonomiczne i ekologiczne.

Wyniki zaprezentowane w pracy mają charakter badań wstępnych; zdecydowanie wskazują jednak na to, że drożdże z gatunku *Y. lipolytica* mogą znaleźć zastosowanie w zagospodarowaniu uciążliwych odpadów pochodzących z zakładów przemysłu rybnego, które stanowią poważne obciążenie dla środowiska. Stosowane w opisanych doświadczeniach podłoża zawierały bogate źródło azotu oraz składników mineralnych w postaci peptonu i ekstraktu drożdżowego, a zatem obniżenie kosztów można by dodatkowo osiągnąć poprzez próbę minimalizacji zawartości tych składników w podłożu. Warto także podkreślić, że uzyskane w prezentowanej pracy wyniki z pewnością nie są optymalnymi rezultatami, jakie można by osiągnąć dla badanych odpadów przemysłu rybnego. Wynika to z ograniczenia dostępności tlenu w hodowli wstrząsanej w porównaniu z hodowlą napowietrzaną w bioreaktorze laboratoryjnym, a także z obecności toksycznych składników w ściekach poprodukcyjnych, jak np. katecholu, który silnie hamuje procesy oddechowe drożdży z gatunku *Y. lipolytica* [10]. W kolejnych etapach badań należy podjąć próby dokładnej analizy składu poszczególnych typów odpadów przetwórstwa rybnego, w tym zawartości białka i tłuszczów oraz rozpocząć prace nad optymalizacją doboru szczepów drożdży, składu podłoża hodowlanego, sposobem wstępnej obróbki odpadów (termicznej, chemicznej czy enzymatycznej) oraz warunków hodowli tych mikroorganizmów. Optymalizacja badanego procesu może stanowić interesującą ofertę wdrożeniową dla przemysłu spożywczego.

LITERATURA

- AKPINAR O., UÇAR F.B. 2013. *Molecular characterization of Yarrowia lipolytica strains isolated from different environments and lipase profiling*. Turkish Journal of Biology 37, 249-258.
- BANKAR A.V., KUMAR A. R., ZINJARDE S.S. 2009. *Environmental and industrial applications of Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology 84 (5), 847-865.
- BARTH G., GAILLARDIN C. 1997. *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews 19 (4), 219-237.
- CIAFARDINI G., ZULLO B. A., IRIDE A. 2006. *Lipase production by yeast from extra virgin olive oil*. Food Microbiology 23 (1), 60-67.
- DARVISHI F., NAHVI I., ZARKESH-ESFAHANI H., MOMENBEIK F. 2009. *Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in Yarrowia lipolytica yeast*. Journal of Biomedicine and Biotechnology 1-7.
- DOMÍNGUEZ A., DEIVE F.J., SANROMÁN A., LONGO M.A. 2003. *Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by Yarrowia lipolytica*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 78 (11), 1166-1170.
- FABISZEWSKA A. 2013. *Badania nad właściwościami katalitycznymi drożdży Yarrowia lipolytica w reakcjach biotransformacji*. Rozprawa doktorska. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
- FICKERS P., BENETHI P. H., WACHÉ Y., MARTY A., MAUERSBERGER S., SMIT M. S., NICAUD J.-M. 2005. *Hydrophobic substrate utilization by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications*. FEMS Yeast Research 5, 527-543.
- FICKERS P., MARTY A., NICAUD J.-M. 2011. *The lipases from Yarrowia lipolytica: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications*. Biotechnology Advances 29 (6), 632-644.
- GONÇALVES C., LOPES M., FERREIRA J.P., BELO I. 2009. *Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts*. Bioresource Technology 100, 3759-3763.
- JAYATHILAKAN K., SULTANA K., RADHAKRISHNA K., BAWA A.S. 2012. *Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review*. Journal of Food Science and Technology 49 (3), 278-293.
- KAPTUROWSKA A., STOLARZEWICZ I., KRZYCZKOWSKA J., BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK E. 2012. *Studies on lipolytic activity of sonicated enzymes from Yarrowia lipolytica*. Ultrasonics Sonochemistry 19, 86-191.
- KRZYCZKOWSKA J., STOLARZEWICZ I., BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK E. 2009. *Spektrofotometryczna metoda pomiaru aktywności lipaz w reakcji hydrolizy laurynianu p-nitrofenylu*. Monografia: Wielokierunkowość Badań w Rolnictwie i Leśnictwie 2, 665-671.
- PAPANIKOLAOU S., AGGELIS G. 2003. *Selective uptake of fatty acids by the yeast Yarrowia lipolytica*. European Journal of Lipid Science and Technology 105 (11), 651-655.
- REBAH F.B., MILED N. 2013. *Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review*. 3 Biotech 3, 255-265.
- WU L., GANG G.E., WAN J. 2009. *Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized Yarrowia lipolytica W29*. Journal of Environmental Sciences 21, 237-242.
- YANO Y., OIKAWA H., SATOMI M. 2008. *Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast Yarrowia lipolytica*. International Journal of Food Microbiology 121, 302-307.