

UTYLIZACJA ODPADÓW POCHODZĄCYCH Z ZAKŁADÓW PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO I PALIWOWEGO Z WYKORZYSTANIEM LIPOLITYCZNYCH DROŹDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA*

Patrycja Mazurczak¹, Bartłomiej Zieniuk¹, Agata Fabiszewska^{✉1}, Dorota Nowak¹, Małgorzata Wołoszynowska², Ewa Białecka-Florjańczyk¹

¹ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

² Instytut Przemysłu Organicznego

Streszczenie. Przemysł spożywczy i paliwowy wytwarzają znaczne ilości trudnych w utylizacji hydrofobowych odpadów, stąd istnieje potrzeba poszukiwania nowych metod ich zagospodarowania. Celem badań była ocena możliwości zastosowania wybranych hydrofobowych odpadów przemysłu spożywczego i paliwowego jako głównego źródła węgla oraz induktora syntezy enzymów lipolitycznych w hodowli szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* W29. Hodowle wstrząsane prowadzono przez 65 h w 28°C w zmodyfikowanym podłożu YPG, w którym glukoza została zastąpiona olejem po procesie wędzenia ryb, tłuszczem po procesie wędzenia wędlin wieprzowych, tłuszczem po pieczeniu kaczej tuszki, zjełczałym masłem klarowanym lub użytym olejem silnikowym. Stwierdzono, że odpady te mogą być wykorzystywane jako źródło węgla w hodowli drożdży *Y. lipolytica*. Produkcję enzymów lipolitycznych zaobserwowano w podłożach zawierających tłuszczowe substraty, a aktywność enzymów korelowano ze składem kwasów tłuszczowych. Wykazano, że istnieje możliwość utylizacji zastosowanych substratów odpadowych w procesach mikrobiologicznych do syntezy enzymów o aktywności lipolitycznej.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, lipaza, tłuszcz odpadowy, olej silnikowy

[✉]agata_fabiszewska@sggw.pl

WSTĘP

Wzrost populacji ludności oraz zwiększenie związanych z tym potrzeb żywieniowych i energetycznych doprowadziły do intensywnego rozwoju przemysłu spożywczego oraz paliwowego, ale jednocześnie przyczyniły się do produkcji ogromnych ilości odpadów, które stanowią istotny problem z punktu widzenia ich zagospodarowania. Niektóre odpady, głównie hydrofobowe (np. odpady przemysłu tłuszczowego), mogą być trudne w utylizacji ze względu na ograniczone możliwości technologiczne, a ich utylizacja oraz składowanie generują duże koszty. Nieutyliizowane odpady mogą stanowić siedlisko szkodliwej mikroflory, która po przedostaniu się na pola uprawne może pojawiać się wraz ze zbieraną żywnością na stołach konsumentów lub przedostając się do innych ekosystemów, wpływać na zasiedlającą je faunę i florę [Yano i in. 2008, Jayathilakan i in. 2012].

Obecnie poszukuje się tanich, a zarazem skutecznych metod utylizacji odpadów lub sposobów ich zagospodarowania. Odpady można utylizować w oczyszczalniach ścieków, co niestety związane jest często z dużymi kosztami. Odpady bogate w związki azotowe mogą być wykorzystane jako nawóz, inne zawierające węglowodany mogą być substratem do produkcji bioetanolu [Yano i in. 2008, Jayathilakan i in. 2012, Kawa-Rygielska i in. 2013]. Sposobem na zagospodarowanie niektórych odpadów jest dodawanie ich do produktów spożywczych lub pasz. W ten sposób wykorzystano m.in. serwatkę, która jest bogatym w łatwo przyswajalne białko produktem ubocznym uzyskiwanym przy produkcji białych serów [Siemianowski i Szpendowski 2015]. Odpady przemysłowe można również utylizować z wykorzystaniem mikroorganizmów, pozyskując jednocześnie cenne metabolity, czyli poddawać je tzw. waloryzacji [Błażejczak i in. 2014]. To ostatnie podejście zostało wykorzystane przez autorów pracy w odniesieniu do odpadów przemysłu rybnego w syntezie enzymów lipolitycznych przez drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica* [Fabiszewska i in. 2014].

Drożdże *Y. lipolytica* występują powszechnie w środowisku naturalnym. Są zdolne do asymilacji różnego rodzaju źródeł węgla. Oprócz cukrów do rozwoju wykorzystują glicerol, tłuszcze, wolne kwasy tłuszczowe oraz węglowodory, dlatego powszechnie spotyka się je w środowiskach zanieczyszczonych odpadami tłuszczowymi lub ropopochodnymi [Zinjarde 2014]. Gatunek ten cieszy się dużym zainteresowaniem ze względu na dużą aktywność sekrecyjną, w tym produkcję enzymów hydrolitycznych, m.in. lipaz, esteraz czy proteaz [Barth 2013]. Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* produkują zarówno lipazy wewnątrzkomórkowe, jak i zewnątrzkomórkowe kodowane przez geny należące do rodziny genów *LIP*. Najlepiej poznaną lipazą jest białko Lip2p kodowane przez gen *LIP2*, odpowiedzialne za główną zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną komórek *Y. lipolytica* [Fickers i in. 2005].

Dotychczasowe badania prowadzone w Katedrze Chemii SGGW wskazały na możliwość hodowli drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 w celu utylizacji odpadów przemysłu rybnego [Fabiszewska i in. 2014]. Celem niniejszej pracy jest pokazanie perspektywy zastosowania wybranych hydrofobowych odpadów spożywczych (pochodzenia mięsnego i rybnego) oraz odpadów przemysłu paliwowego jako głównego źródła węgla oraz induktora syntezy enzymów lipolitycznych w hodowli szczepu drożdży *Y. lipolytica* W29.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu lipolitycznych drożdży *Y. lipolytica* W29 (ATCC[®] 20460[™]), otrzymanego w laboratorium GPMA na Uniwersytecie Burgundzkim w Dijon, we Francji. Podłożem wykorzystywanym do przeprowadzenia hodowli wstrząsanej było podłoże YP o składzie: ekstrakt drożdżowy $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (BTL, Łódź, Polska) oraz pepton $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (BTL, Łódź, Polska) z dodatkiem 2% wybranego odpadu przemysłowego. Odczyn podłoży ustalano na poziomie 5. Podłożem inokulacyjnym było płynne podłoże YPG, uzupełnione w stosunku do podłoża YP o dodatek 2% glukozy (Avantor, Gliwice, Polska). Jako podłoże kontrolne zastosowano podłoże YP. W doświadczeniach wykorzystano pięć rodzajów odpadów: zużyty olej silnikowy, olej powstały w wyniku wytopienia tłuszczu w procesie wędzenia rybich tusz (pochodzących z zakładu przetwórstwa rybnego Rekin sp.j. w Grajewie), masło klarowane zakupione w sprzedaży detalicznej i poddane procesowi jęlczenia, tłuszcz powstały w wyniku wytopienia tłuszczu w procesie wędzenia wędlin wieprzowych oraz tłuszcz odpadowy po procesie pieczenia kaczki. Dwa ostatnie odpady zostały wygenerowane w gospodarstwie domowym. Wybór odpadów dokonano według wykorzystanych w badaniach tłuszczów jak najbardziej zróżnicowanych pod kątem pochodzenia i składu kwasów tłuszczowych.

Hodowlę wstrząsaną prowadzono w kolbach okrągłych-płaskodennych o objętości 500 cm^3 w 100 cm^3 sterylnego podłoża. Podłoża hodowlane zaszczipiano $0,1 \text{ cm}^3$ 24-godzinnej hodowli inokulacyjnej. Wszystkie hodowle prowadzono w temperaturze 28°C na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej Julabo SW22 przy $140 \text{ obr} \cdot \text{min}^{-1}$. Hodowlę właściwą przerywano po 65 h, kiedy komórki wychodziły z fazy wzrostu logarytmicznego i wchodziły w fazę wzrostu stacjonarnego, a aktywność lipaz zewnątrzkomórkowych była duża [Fabiszewska 2013]. Następnie oddzielano komórki drożdży od płynu hodowlanego w wirówce MPW-351R ($8000 \text{ obr} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4°C). Płyn hodowlany zachowano w celu oznaczenia aktywności lipolitycznej. Biomassę drożdży poddawano suszeniu w wagosuszarce Radwag MAC 50/NH w celu oznaczenia suchej biomasy drożdży metodą termogravimetryczną. Liczbę komórek drożdży w 1 cm^3 podłoża oznaczano metodą płytkową na podłożu YPG z dodatkiem 2% agaru (BTL, Łódź, Polska). Kolonie inkubowano przez 24 h w temperaturze 28°C . Zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną enzymów syntetyzowanych przez drożdże i wydzielanych do podłoża hodowlanego oznaczano metodą spektrofotometrycznego pomiaru postępu reakcji hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu [Krzyżkowska i in. 2009, Kapturowska i in. 2012]. Za jednostkę aktywności enzymatycznej lipaz 1 U przyjęto taką ilość enzymu, która jest w stanie uwolnić $1 \mu\text{mol}$ *p*-nitrofenolu w czasie 1 min w warunkach oznaczenia w temperaturze 37°C .

Skład kwasów tłuszczowych oznaczono metodą chromatografii gazowej z zastosowaniem kolumny kapilarnej i detektora płomieniowo-jonizacyjnego. Tłuszcz poddawano derywatacji do postaci estrów metylowych, przy użyciu 1 M metanolanu sodu oraz 10-procentowego BF_3 w metanolu w przypadku próbek oleju rybiego lub 14-procentowego BF_3 w metanolu w przypadku pozostałych próbek. Do analiz oleju rybiego zastosowano aparat firmy Agilent Technologies 68790 N GC, wyposażony w kolumnę kapilarną HP 5-MS o średnicy wewnętrznej $0,25 \text{ mm}$ i grubości filmu fazy stacjonarnej $0,25 \mu\text{m}$ oraz aparat firmy Varian CP3800, wyposażony w kolumnę kapilarną ZB-FFAP o długości 30 m , średnicy wewnętrznej $0,25 \text{ mm}$ i grubości filmu fazy stacjonarnej $0,25 \mu\text{m}$ do

analizy pozostałych próbek. Jako gaz nośny użyto helu. Przepływ gazu nośnego wyniósł $1,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Poszczególne kwasy tłuszczowe zidentyfikowano na podstawie czasów ich retencji, porównując je ze wzorcami.

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 12.0 zestaw plus (Statsoft, Polska). Wyniki plonu biomasy i zewnętrzno-komórkowej aktywności lipolitycznej analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji oraz przy zastosowaniu testu Scheffego. Założenie o normalności rozkładu sprawdzono na podstawie wyniku testu Shapiro-Wilka, zaś założenie o jednorodności wariancji testem Browna-Forsytha. Przyjęty poziom istotności wynosił $\alpha = 0,05$. Wszystkie eksperymenty wykonywano w co najmniej czterech powtórzeniach w odniesieniu do oznaczeń liczby komórek oraz plonu biomasy, a w trzech powtórzeniach w odniesieniu do aktywności lipolitycznej.

WYNIKI

Przed przystąpieniem do hodowli przeprowadzono analizę składu kwasów tłuszczowych zawartych w triacyloglicerolach w lipidowych odpadowych źródłach węgla (tab.), w celu określenia wpływu poszczególnych kwasów tłuszczowych na zewnętrzno-komórkową aktywność lipolityczną badanego mikroorganizmu. Analiza składów kwasów tłuszczowych (tab.) wykazała największą zawartość kwasu oleinowego w tłuszczu z kaczki (41,9%), nieco mniejszą w tłuszczu wieprzowym (37,8%), a najmniejszą w oleju rybim (17,3%). Jest to bardzo istotna informacja, ponieważ niektórzy autorzy uważają, że enzymy lipolityczne syntetyzowane przez drożdże *Y. lipolytica* wykazują specyficzność substratową w stosunku do tego kwasu [Fickers i in. 2011]. Ponadto w tłuszczu po wędzeniu rybich tusz wykazano obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zawierających powyżej 20 atomów węgla w łańcuchu (jak EPA czy DHA), a masło zawierało największą ilość nasyconych kwasów tłuszczowych (68,2%) w stosunku do pozostałych tłuszczów.

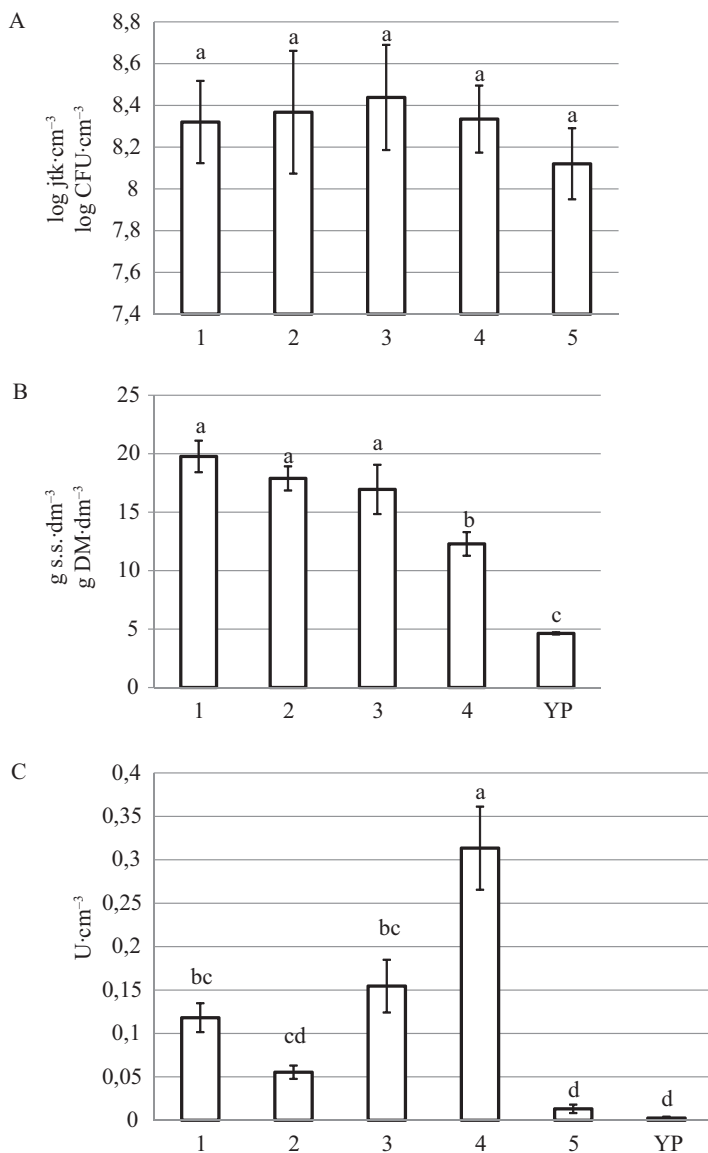
Właściwe doświadczenie obejmowało hodowle wstrząsane lipolitycznych drożdży *Y. lipolytica* W29 w podłożach zawierających cztery lipidowe odpady spożywcze i jeden odpad z przemysłu paliwowego. Dodatkowo założono hodowle kontrolne w podłożu YP. Oszacowano liczbę komórek drożdży, oceniono plon biomasy oraz aktywność zewnętrzno-komórkowych enzymów lipolitycznych. Wyniki oznaczeń zaprezentowano na rysunku.

Największy średni plon biomasy ($19,77 \text{ g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskano w hodowli prowadzonej w podłożu zawierającym tłuszcz po pieczeniu kaczki (rys. B). Porównywalnie duży plon biomasy otrzymano w podłożu zawierającym tłuszcz po procesie wędzenia wędlin oraz zjełczałe masło klarowane (odpowiednio $17,89$ i $16,95 \text{ g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$). Gorszy wynik uzyskano dla podłoża z odpadowym olejem rybim ($12,28 \text{ g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz najgorszy w podłożu kontrolnym YP, które nie zawierało dodatkowego źródła węgla. Uzyskane wyniki świadczą o zdolności badanego szczepu drożdży do asymilacji źródeł węgla o charakterze lipidowym. Oznacza to również, że związki powstałe z rozpadu tłuszczów w badanych odpadach zostały wykorzystane na potrzeby energetyczne oraz budowę i wzrost komórek drożdży. W podłożu z olejem silnikowym pomiar plonu biomasy nie był możliwy z uwagi na charakterystyczny rozwój komórek w postaci biofilmu. Oznaczono natomiast liczbę

Tabela. Skład kwasów tłuszczowych zawartych w lipidowych odpadach stosowanych w hodowli drożdży jako źródło węgla [% zawartość wszystkich kwasów tłuszczowych]

Table. Fatty acid composition of lipid waste substrates used in yeast growth as carbon sources [% total fatty acid content]

Zwyczajowa nazwa kwasu tłuszczowego Customary name of fatty acid	Symbol kwasu tłuszczowego Symbol of fatty acid	Olej po procesie wędzenia ryb Oily waste from fish smoking process	Tłuszcz po wędzeniu wędlin Oily waste from sausages smoking process	Zjełczałe masło klarowane Rancid ghee	Tłuszcz po pieczeniu kaczki Oily waste from duck roasting process
Laurynowy Lauric	C12:0	0,2	–	–	–
Mirystynowy Myristic	C14:0	8,1	4,2	16,2	10,4
Mirystooleinowy Myristoleic	C14:1	1,0	–	–	–
Palmitynowy Palmitic	C16:0	12,1	27,6	35,6	20,7
Palmitooleinowy Palmitoleic	C16:1	11,5	4,1	2,2	3,5
Stearynowy Stearic	C18:0	3,2	9,6	16,2	5,4
Oleinowy Oleic	C18:1	17,3	37,8	25,3	41,9
Linolowy Linoleic	C18:2	1,4	11,5	1,1	13,6
Linolenowy Linolenic	C18:3	4,6	2,3	1,2	0,4
Arachidowy Arachidonic	C20:0	–	0,4	0,2	0,1
Eikozaenowy Eicosenoic	C20:1	10,0	–	–	–
Eikozapentaenowy Eicosapentaenoic	C20:5 (EPA)	8,0	–	–	–
Behenowy Behenic	C22:0	–	0,5	–	–
Erukowy Erucic	C22:1	11,2	–	–	–
Dokozaheksaenowy Docosahexaenoic	C22:6 (DHA)	10,6	–	–	–
Lignocerynowy Lignoceric	C24:0	0,7	–	–	–
Pozostałe Other	–	0,3	2,0	2,0	4,0



Rysunek. Wpływ odpadowego źródła węgla na liczbę komórek drożdży (A), plon biomasy komórek (B) oraz zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną szczepu *Y. lipolytica* W29 po 65 h hodowli wstrząsanej (C). Zastosowany odpad w podłożu: 1 – tłuszcz po pieczeniu kaczki, 2 – tłuszcz po wędzeniu wędlin, 3 – zjełczałe masło klarowane, 4 – olej po procesie wędzenia ryb, 5 – zużyty olej silnikowy, YP – podłoże kontrolne. Grupy jednorodnie wyodrębnione na podstawie testu Scheffego oznaczono różnymi literami alfabetu

Figure. The influence of carbon source on the number of yeast cells (A), biomass yield (B), and extracellular lipolytic activity of *Y. lipolytica* W29 after 65 h of shaking culture (C). Wastes used in media: 1 – oily waste from duck roasting process, 2 – oily waste from sausages smoking process, 3 – rancid ghee, 4 – oily waste from fish smoking process, 5 – waste engine oil, YP – control medium. Means were separated into statistically different groups by Scheffe test and marked with different letters

komórek drożdży w 1 cm^3 podłoża, która okazała się porównywalna i statystycznie nieistotna dla wszystkich przeprowadzonych hodowli w podłożach z dodatkiem surowców odpadowych (rys. A).

Komórki drożdży w podłożach zawierających tłuszczowe substraty produkowały enzymy lipolityczne i największą zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną osiągnięto w podłożu zawierającym olej po procesie wędzenia ryb ($0,313 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$) – rysunek C. Statystycznie istotnie małą aktywność oznaczono w podłożu z tłuszczem po pieczeniu kaczki ($0,155 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$) oraz z masłem klarowanym ($0,118 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$). Nie zaobserwowano aktywności enzymatycznej w podłożu zawierającym zużyty olej silnikowy ($0,013 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$) oraz w podłożu kontrolnym YP ($0,003 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$).

DYSKUSJA

Znanych jest wiele sposobów zagospodarowania odpadów przemysłu mięsnego i rybnego. W zależności od regionu, kultury i preferencji żywieniowych produkty uboczne powstające przy rozbiórce mięsa i rybich tusz czy właściwej produkcji mięsnej oraz rybnej przeznaczane są do dalszej obróbki lub utylizacji [Jayathilakan i in. 2012]. Wykorzystanie odpadów jako składników podłoży hodowlanych jest metodą utylizacji odpadów obecnie prowadzoną wyłącznie w skali laboratoryjnej. Autorzy niniejszej pracy wykazali możliwość zastosowania odpadów przemysłu spożywczego i paliwowego w celu pozyskania biomasy komórek drożdży *Y. lipolytica*. Komórki tego gatunku mogą asymilować substraty hydrofobowe dzięki złożonemu metabolizmowi, zdolnościom adhezyjnym struktury ściany komórkowej oraz możliwościom modyfikacji hydrofobowych właściwości powierzchni komórki [Fickers i in. 2005].

Pomimo że rozwój drożdży obserwowano w każdym z badanych podłoży, aktywność lipolityczną enzymów wykazano wyłącznie w podłożach z lipidowymi odpadami przemysłu spożywczego. Do syntezy enzymów lipolitycznych przez drożdże *Y. lipolytica* niezbędny jest bowiem induktor w postaci kwasów tłuszczowych i ich pochodnych. W badaniach innych autorów dowiedziono, że węglowodory, które podobnie jak tłuszcze są hydrofobowe, nie wpływają znacząco na syntezę enzymów lipolitycznych. Warto natomiast przeprowadzić dalsze badania nad zdolnością tworzenia biofilmu przez komórki drożdży hodowane w podłożu z dodatkiem oleju silnikowego, które mogłyby w przyszłości przyczynić się do opracowania metody oczyszczania środowiska, w tym wód morskich, z zanieczyszczeń przemysłu paliwowego i naftowego [Zinjarde 2014]. Dotychczas tworzenie biofilmu było wykorzystywane w celu zwiększenia wydajności syntezy aromatów, np. γ -dekalaktonu [Braga i Belo 2013]. Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* wzrastały w postaci biofilmu na termoplastycznej matrycy polimerowej wykonanej z polimetakrylanu metylu (PMMA) w czasie inkubacji wstrząsanej przez 48 h w temperaturze 27°C [Braga i Belo 2013] i w czasie hodowli w bioreaktorze typu airlift [Escamilla-García i in. 2014] oraz na szklanych kuleczkach i płytach titracyjnych [Zinjarde 2014]. Adhezja komórek do powierzchni abiotycznych sprawia, że komórki obecne w biofilmie są chronione przez matrycę, na której się znajdują, mają lepsze możliwości adaptacyjne, zyskują odmienne właściwości fizjologiczne oraz są mniej narażone na czynniki stresowe środowiska [Escamilla-García i in. 2014, Zinjarde 2014].

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy to pierwsza tego typu próba zastosowania drożdży *Y. lipolytica* w biotechnologicznej metodzie syntezy lipaz z jednoczesną utylizacją tłuszczu odpadowych pochodzenia zwierzęcego (masło klarowane, tłuszcze po wędzeniu czy pieczeniu). Z kolei wykorzystanie odpadów przemysłu rybnego w produkcji enzymów lipolitycznych opisali m.in. Rebaha i Mileda [2013] w artykule przeglądowym. Autorzy przedstawili możliwości zastosowania różnych odpadów rybnych (głowy, skóry, ości) w mikrobiologicznej syntezie enzymów takich jak proteazy i lipazy przez szczepy bakterii *Pseudomonas aeruginosa* MN7, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Vibrio anguillarum* i *V. splendidus*. Podobny kierunek w badaniach nad utylizacją odpadów pochodzących z zakładów przemysłu rybnego, ale z wykorzystaniem drożdży, został przedstawiony we wcześniejszej pracy autorów artykułu [Fabiszewska i in. 2014].

Goncalves i inni [2009] przeprowadzili badania nad zastosowaniem odpadowej wody po procesie tłoczenia oliwy z oliwek w hodowli drożdży *Candida rugosa* PYCC 3238, *C. rugosa* CBS 2275, *C. cylindracea* CBS 7869 oraz *Yarrowia lipolytica* W29, *Y. lipolytica* CBS 2073 i *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, wykazując zróżnicowaną aktywność lipolityczną badanych mikroorganizmów. Z kolei Saygün i inni [2014] przedstawili w swoich badaniach wpływ różnych olejów oraz odpadów przemysłu olejowego na produkcję lipaz przez drożdże *Y. lipolytica* YB 423-12. Badano makucho (wytłoki) orzechowe, makucho słonecznikowe, wytłoki z oliwek oraz oleje pochodzące odpowiednio ze żmijowca zwyczajnego, siemienia lnianego, ogórecznika, rzepaku, sezamu i pszczoły. Największą aktywność obserwowano w podłożach z olejem orzechowym, co autorzy wyjaśnili dużą zawartością kwasu oleinowego w tym oleju [Saygün i in. 2014]. W badaniach własnych nie potwierdzono natomiast związku między zawartością tego kwasu a aktywnością lipolityczną komórek. Wyniki aktywności lipaz uzyskane w podłożu z odpadowym olejem rybim mogłyby sugerować istotną rolę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w stymulacji syntezy enzymów lipolitycznych. Można także stwierdzić, że drożdże *Y. lipolytica* wykazują większą aktywność lipolityczną w podłożach zawierających triacyloglicerole składające się z większej ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń sformułowano następujące wnioski i spostrzeżenia:

1. Hydrofobowe odpady przemysłu spożywczego i paliwowego mogą być wykorzystywane jako źródło węgla w hodowli drożdży *Y. lipolytica* W29 w celu ich zagospodarowania. We wszystkich badanych podłożach hodowlanych zawierających 2% odpadów tłuszczowych spożywczych lub odpadowego oleju silnikowego obserwowano rozwój drożdży na poziomie 10^8 jtk·cm⁻³, uzyskując plon biomasy drożdży od 19,77 g s.s.·dm⁻³ dla podłoża z tłuszczem po pieczeniu kaczki do 12,28 g s.s.·dm⁻³ w odniesieniu do podłoża z odpadowym olejem rybim.

2. Odpady przemysłu paliwowego typu węglowodory (jak zastosowany w badaniach olej silnikowy) nie stymulują aktywności lipolitycznej drożdży *Y. lipolytica*, ale indukują charakterystyczny rozwój z wytworzeniem biofilmu.

3. Lipidowe odpady przemysłu spożywczego indukują syntezę zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych przez drożdże *Y. lipolytica*. Największą aktywność lipaz w prezentowanych badaniach uzyskano w podłożu z 2-procentowym dodatkiem oleju odpadowego po procesie wędzenia ryb ($0,313 \text{ U} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Przeprowadzone badania dotyczą skali laboratoryjnej. Autorzy pracy planują zwiększyć skalę hodowli w dalszych pracach w celu oceny potencjału aplikacyjnego zaprezentowanego sposobu utylizacji odpadów przemysłowych typu tłuszczce.

LITERATURA

- Barth G. (red.), 2013. *Yarrowia lipolytica*: biotechnological applications. Microbiology Monographs. Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Błazejak S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Różańska 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.
- Braga A., Belo I., 2013. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* for aroma production from castor oil. Appl. Biochem. Biotechnol. 169, 2202–2211.
- Escamilla-Garcia E., O’Riordana S., Gomes N., Aguedo M., Belo I., Teixeira J., Marc Belina J., Waché Y., 2014. An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem. 49, 1377–1382.
- Fabiszewska A., 2013. Badania nad właściwościami katalitycznymi drożdży *Yarrowia lipolytica* w reakcjach biotransformacji. Rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa [manuskrypt].
- Fabiszewska A., Mazurczak P., Pelińska A., Zieniuk B., Nowak D., Białecka-Florjańczyk E., 2014. Próba zastosowania drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP379 w zagospodarowaniu odpadów przemysłu rybnego. PTPS 2, 28–33.
- Fickers P., Fudalej F., Nicaud J.M., Destain J., Thonart P., 2005. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Biotechnol. 115, 379–386.
- Goncalves 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. J. Food Sci. Technol. 49(3), 278–293.
- Kapturowska A., Stolarzewicz I., Krzyżkowska J., Białecka-Florjańczyk E., 2012. Studies on lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. Ultrason Sonochem. 19, 86–191.
- Kawa-Rygielska J., Czubaszek A., Pietrzak W., 2013. Some aspects of baking industry wastes utilization in bioethanol production. ZPPNR 575, 71–77.
- Krzyżkowska J., Stolarzewicz I., Białecka-Florjańczyk E., 2009. Spektrofotometryczna metoda pomiaru aktywności lipaz w reakcji hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu. W: Wielokierunkowość badań w rolnictwie i leśnictwie 2, 665–671.
- Rebah F.B., Miled N., 2013. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. Biotech. 3, 255–265.
- Saygün A., Sahin-Yesilcubuk N., Aran N., 2014. Effects of different oil sources and residues on biomass and metabolite production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. J. Am. Oil Chem. Soc. 91, 1521–1530.

- Siemianowski K., Szpendowski J., 2015. Metody włączania białek serwatkowych w technologii niedojrzewających kwasowych serów twarogowych. *ŻNTJ* 5, 23–32.
- Yano Y., Oikawa H., Satomi M., 2008. Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 302–307.
- Zinjarde S., Apte M., Mohite P., Kumar A.R., 2014. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnol. Adv.* 32(5), 920–933.

UTILIZATION OF WASTE FROM FOOD AND FUEL INDUSTRIES BY LIPOLYTIC YEAST OF *YARROWIA LIPOLYTICA*

Summary. Waste disposal and by-product management in many branches of industry pose problems in the areas of environmental protection and sustainability. Hydrophobic waste substrates of food and fuel origin stands for one of the continuously gaining ground for waste management fields. The aim of the study was to evaluate the possibility to use food origin wastes and fuel industry waste as a carbon sources in the culture medium for *Y. lipolytica* W29 with their simultaneous valorization. Culture media contained 2% of waste substrates. In the study there were evaluated yeast biomass yield, number of yeast cells in 1 cm³ of medium and extracellular lipase activity after 65 h of yeast growth on a rotary shaker at 28°C. Five wastes were estimated: oily waste from duck roasting process, oily waste from sausages smoking process, rancid ghee, oily waste from fish smoking process and waste engine oil. Additionally fatty acid composition of lipid waste was analyzed using gas chromatography. It was shown the possibility of using these wastes in cultivation of yeast with their simultaneous valorization by obtaining valuable products, e.g. enzymes such as extracellular lipases as well as biomass intended for feed. Yeast biomass yielded from 19.77 g DM·dm⁻³ for oily waste from duck roasting process to 12.28 g DM·dm⁻³ for oily waste from fish smoking process. It has been found that waste substrates stimulate the synthesis of extracellular lipases with different efficiency. The highest activity was obtained in medium containing smoked fish oil (0.313 U·cm⁻³). Furthermore, in waste engine oil medium no lipase activity of *Y. lipolytica* yeast was observed, but cells did grow and formed a biofilm. The analysis of fatty acid compositions showed the highest oleic acid content in oily waste from duck roasting process (41.9%), slightly lower waste from sausages smoking process (37.8%) and two-fold lower in fish oil (17.3%). This is very important information, because some authors believe that lipolytic enzymes synthesized by the yeast *Y. lipolytica* show substrate specificity as compared to that oil. Furthermore, the waste oil from fish smoking process was characterized by the presence of polyunsaturated fatty acids containing more than 20 carbons in chain length (EPA and DHA). There was no correlation between lipolytic activity and oleic acid content in waste fat used as the carbon source in medium, but it can be concluded that *Y. lipolytica* yeast preferred unsaturated rather than saturated fatty acids in extracellular lipase production.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, lipase, waste fat, engine oil