

Praca Dyplomowa Inżynierska

Aleksandra Pastuszka
202102

Ocena zawartości frakcji lipidowej w wybranych makuchach oraz jej wpływ na aktywność hydrolityczną mikroorganizmów

Evaluation of the lipid fraction content in selected oilcake and its effect on the hydrolytic activity of microorganisms

Praca dyplomowa na kierunku:
Technologia żywności i żywienie człowieka

Praca wykonana pod kierunkiem
Dr inż. Jolanty Małajowicz
Instytut Nauk o Żywności
Katedra Chemii

Warszawa, 2023



SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Wydział Technologii
Żywności

Oświadczenie Promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia tej pracy w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis promotora

Oświadczenie autora pracy

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz.U. 2019 poz. 1231 z późn. zm.).

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z nadaniem dyplomu lub uzyskaniem tytułu zawodowego.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną. Przyjmuję do wiadomości, że praca dyplomowa poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data

Podpis autora pracy

Streszczenie

Ocena zawartości frakcji lipidowej w wybranych makuchach oraz jej wpływ na aktywność hydrolityczną mikroorganizmów

Makuchy to wyłoki będące produktem ubocznym tłoczenia oleju z nasion oleistych. Aktualnie oprócz klasycznych makuchów ze znanych nam olejów, takich jak makuch lniany czy rzepakowy, coraz częściej spotyka się mniej popularne makuchy z konopi, krokosza czy lnianki rydzowej.

Celem niniejszych badań była ocena jakościowa wybranych makuchów, w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w hodowlach mikrobiologicznych. Zakres badań obejmował ocenę jakościową makuchów, uwzględniając określenie suchej masy, zawartości tłuszczu i polifenoli, oznaczenie liczby kwasowej oraz profilu kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej, wyekstrahowanej z makuchów. Na bazie wyekstrahowanego oleju przeprowadzono hodowlę drożdży *Yarrowia lipolytica* weryfikując plon biomasy komórkowej i aktywność lipolityczną.

Spośród pięciu przeanalizowanych makuchów: z rzepaku, lnu, lnianki rydzowej, konopi i krokosza, w kontekście hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* i wykazywanej przez nie aktywności lipolitycznej najlepsze rezultaty osiągnęto w obecności oleju z krokosza barwierskiego. Aktywność lipaz wynosiła 0,68 U/ml i była ok. 2,5-krotnie wyższa w stosunku do maksymalnej aktywności lipaz na podłożu z dodatkiem oliwy z oliwek.

Słowa kluczowe – makuchy, waloryzacja odpadów, aktywność lipolityczna, *Yarrowia lipolytica*

Summary

Evaluation of the lipid fraction content in selected oilcake and its effect on the hydrolytic activity of microorganisms

Oilcakes are pomace that is a by-product of pressing oil from oilseeds. Currently, in addition to the classic oilseed cake, such as linseed or rapeseed cake, less common cake made from hemp, safflower or castor flax is becoming more common.

The purpose of the present study was to qualitatively evaluate selected oilcakes in the context of their potential use in microbial cultures. The scope of the study included qualitative evaluation of the oilcakes, taking into account the determination of dry matter, fat and polyphenol content, determination of the acid number and fatty acid profile of the lipid fraction extracted from the oilcakes. On the basis of the extracted oil, the yeast *Yarrowia lipolytica* was cultured, verifying the yield of cellular biomass and lipolytic activity.

Of the five analyzed oilcakes: rapeseed, flax, castor flax, hemp and safflower, in the context of the culture of *Yarrowia lipolytica* yeast and the lipolytic activity shown by it, the best results were achieved in the presence of safflower oil. The activity of lipases was 0.68 U/ml, which was about 2.5 times higher than the maximum lipase activity in the medium supplemented with olive oil.

Keywords – Oilcake, valorization of waste, hydrolytic activity, *Yarrowia lipolytica*

Spis treści

1. Wstęp z elementami przeglądu literatury	8
1.1. Charakterystyka wybranych surowców roślinnych, z których pozyskuje się makuchy	8
1.2. Powstawanie makuchów i ich dostępność rynkowa	10
1.3. Właściwości fizyko-chemiczne makuchów	13
1.4. Przykłady zastosowania/wykorzystania makuchów	14
1.5. Charakterystyka drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
1.6. Hydrolazy, ich synteza przez mikroorganizmy i właściwości katalityczne.....	17
2. Cel i zakres pracy	19
3. Opis założeń metodycznych	20
3.1. Materiał badawczy	20
3.2. Metodyka pracy.....	20
3.2.1. Oznaczanie suchej substancji.....	20
3.2.2. Oznaczanie zawartości tłuszczu.....	21
3.2.3. Oznaczanie liczby kwasowej	21
3.2.4. Oznaczanie profilu kwasów tłuszczowych	22
3.2.5. Oznaczenie zawartości polifenoli	23
3.2.6. Przygotowanie podłoża mikrobiologicznych	23
3.2.7. Właściwa hodowla wglębna drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
3.2.8. Oznaczenie plonu suchej masy komórek drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
3.2.9. Oznaczenie zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej.....	25
4. Omówienie wyników	26
4.1. Zawartość suchej masy oraz tłuszczu w analizowanych makuchach	26
4.2. Oznaczenie liczby kwasowej olejów wyekstrahowanych z wybranych makuchów	27
4.3. Ocena profilu kwasów tłuszczowych olejów wyekstrahowanych z wybranych makuchów	28
4.4. Zawartość polifenoli w analizowanych makuchach	32
4.5. Ocena możliwości wykorzystania makuchów jako źródła węgla w hodowlach wglębnych drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	34
4.6. Oznaczenie plonu suchej masy komórek drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	35
4.6. Oznaczenie zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	39
5. Wnioski.....	42
6. Spis literatury.....	43

1. Wstęp z elementami przeglądu literatury

1.1. Charakterystyka wybranych surowców roślinnych, z których pozyskuje się makuchy

Surowce roślinne, z których uzyskiwane są makuchy to głównie rośliny oleiste. Cechują się one zawartością od 20% do nawet 70% tłuszczu. Produkcja oleju na skalę światową bazuje zarówno na roślinach jednorocznych, jak i drzewiastych. Przy tłoczeniu nasion i owoców tych roślin, stosując metodę na zimno, powstają produkty uboczne – tzw. makuchy poekstrakcyjne [Michniewicz 2020]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę wybranych roślin oleistych, z których pozyskano makuchy do części badawczej niniejszej pracy.

Konopie siewne, czyli *Cannabis sativa L.* należące do roślin jednorocznych, uprawia się je w większości z myślą o cennych odżywczo nasionach. Są one bowiem dobrym źródłem białka, węglowodanów oraz tłuszczów. Zawierają również mikro i makroelementy w tym m.in.: cynk, fosfor, potas, magnez [Markowska i wsp. 2021]. Dodatkowo w ich składzie występują naturalne przeciwutleniacze, fitosterole, związki fenolowe czy tokoferole. W nasionach zidentyfikowano szeroki zakres polifenoli, wykazujących ciekawą i różnorodną aktywność biologiczną, między innymi właściwości przeciwzapalne czy owadobójcze. We frakcji oleju konopnego występują tokoferole, cechujące się zapobieganiem utlenianiu nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz działaniem przeciwzapalnym [Irakli i wsp. 2019]. Na skład jakościowy, chemiczny oraz wartość odżywczą nasion oleistych wpływ ma bardzo dużo czynników, wśród których wymienia się genotyp nasion, rodzaj gleby, obszar na jakim prowadzona była uprawa, rodzaj stosowanej praktyki rolniczej, klimat i warunki w jakich nasiona były przetwarzane [Garcia-Rebollar i wsp. 2016]. Ważnym aspektem są takie czynniki, które są zmiennymi środowiskowymi, do których zaliczane są: stres związany z zawartością wody i chorobami roślin. Dużą rolę odgrywa nawożenie azotem, które bezpośrednio wpływa na zawartość aminokwasów i białka [Arrutia 2020].

Rzepak inaczej *Brassica napus L.* uprawiany jest na świecie głównie z uwagi na dużą zawartość frakcji lipidowej i możliwość wykorzystania w produkcji oleju rzepakowego oraz uzyskiwania makuchów, które są używane w gospodarstwach jako pasza dla zwierząt. Uprawiany jest głównie w klimacie umiarkowanym. Występuję pod dwoma postaciami odmian: jarej i ozimej, z czego odmiany jare są coraz częściej wybieranym rodzajem hodowlanym z racji na ocieplenie klimatu oraz ilości

niewystracających opadów śniegu w okresie z temperaturami poniżej zera. Wszystkie gatunki rzepaku charakteryzują się wysoką zawartością oleju od 40 do 50%. Białko i węglowodany to około 25 - 30% [Brzóska i wsp. 2010, Arrutia 2020]. Szczególną cechą rzepaku jest wysoka zawartość związków fenolowych, która dochodzi do dziesięciokrotnie wyższych wartości niż w przypadku innych nasion oleistych. Należy mieć na względzie fakt, iż stężenie związków bioaktywnych w nasionach rzepaku uzależnione jest od warunków ich przechowywania [Sigera i wsp. 2017]. Oprócz walorów odżywczych, rzepak w ostatnich latach jest cenionym substratem w produkcji biopaliw. Powszechne uprawy rzepaku w Polsce wiążą się również z rolą, jaką pełni on w rolnictwie, w płodozmianie i zahamowaniu chorób roślin oraz poprawie jakości gleby [Pohl i wsp. 2019]. W ostatnich kilkunastu latach prowadzono wiele prac badawczych z udziałem rzepaku, których celem było podwyższenie plonu, obniżenie zawartość substancji antyodżywczych, takich jak kwas erukowy i glukozynolany, stworzenie odmian o pożądanym składzie i proporcji występujących w nim kwasów tłuszczowych czy większej ilości tokoferoli [Hernacki 2007].

Krokosz barwierski (*Carthamus tinctorius*) to roślina jednoroczna, silnie rozgałęziona. Pierwotnie hodowany ze względu na pomarańczowy pigment w kwiatach, który później wykorzystywano jako barwnik do żywności i tkanin. Aktualnie krokosz barwierski ceniony jest z uwagi na olej pozyskiwany z nasion. Frakcja lipidowa tej rośliny bogata jest w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwas oleinowy i linolowy, używany m.in. do produkcji margaryn miękkich oraz w celach kuchennych. Makuchy uzyskane po wytłoczeniu oleju z krokosza wykorzystywane są jako pasza dla zwierząt [Knowles 1980, Smith 1996].

Len (*Linum usitatissimum*) jest rośliną jednoroczną, zielną, należącą do najstarszych roślin uprawnych pod kątem tłoczenia oleju i pozyskiwania włókna. Występuje ona w licznych odmianach, uprawianych w zależności od zastosowania. Gatunek hodowany ze względu na nasiona i olej jest niskopienny, z dużą ilością gałęzi drugorzędnych oraz torebek nasiennych. Ma dobre zdolności adaptacyjne. Uprawiany w wielu krajach o zróżnicowanym klimacie. Jest cennym źródłem składników bioaktywnych w tym niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, mikroelementów oraz przeciwutleniaczy. W składzie frakcji lipidowej lnu dominuje trójnienasycony kwas α -linolenowy, który należy do grupy kwasów omega-3. Pomaga on w zachowaniu odpowiedniego stosunku kwasów n-3 do n-6, ograniczając ryzyko występowania chorób cywilizacyjnych. Makuchy, zmielone nasiona lnu oraz śruta

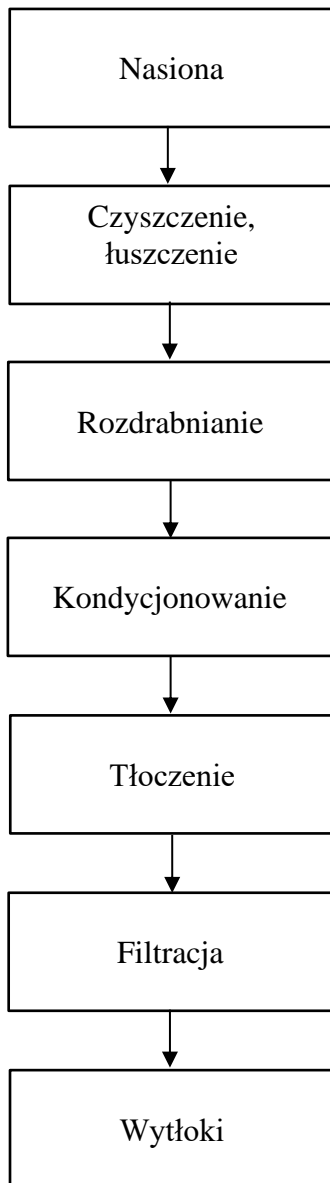
poekstrakcyjna wykorzystywana jest w żywieniu zwierząt, tak aby zwiększyć w paszach poziom NNKT, co wpływa na spadek cholesterolu w mięsie i nabiale [Hall 2010, Zajac i wsp. 2010, Silska 2016].

Lnianka siewna (*Camelina sativa L.*) występuje również pod nazwą lnianka rydzowa ze względu na charakterystyczny kolor nasion oraz wytłaczanego oleju. Jest typem rośliny oleistej zdolnej do wzrostu w niesprzyjających warunkach takich jak: temperatura poniżej zera, tereny o niskiej wilgotności i wymaganiach glebowych. Jednak zarówno susze, jak i słabsze gleby są czynnikami warunkującymi niższą zawartość tłuszczu w nasionach. Średnio odmiany jare posiadają około 33% tłuszczu, który jest bogaty w kwasy nienasycone, witaminy z grupy B, A oraz E, mikro- i makroelementy. Natomiast odmiana ozima zawiera więcej tłuszczów, bo ok. 40% oraz wykazuje wyższą tolerancję na mrozy. Olej uzyskany z nasion lnianki siewnej wyróżnia się dużą zawartością kwasu linolowego i linolenowego, tokoferoli, fitosteroli i związków fenolowych. Lnianka rydzowa jest też źródłem białka roślinnego. Makuchy, które są pozostałością po wytłoczeniu frakcji olejowej wykorzystywane są m.in. jako pasza dla drobiu. Według danych literaturowych skarmianie bydła makuchami lnianki wpływa na poprawę wydajności mlecznej i skład mleka [Frąckowiak i wsp. 2010, Jęczmionek 2010, Sazońska 2010, Ergonul i Ozbek 2020].

1.2. Powstawanie makuchów i ich dostępność rynkowa

Głównym produktem przetwarzania roślin oleistych jest olej, stosowany w przemyśle spożywczym oraz w wytwarzaniu mieszanek paszowych. Przy wytłaczaniu oleju powstają również produkty uboczne, takie jak makuchy oraz śruta poekstrakcyjna, które są umieszczone w Rejestrze Materiałów Paszowych Unii Europejskiej. Makuchy mają wysoką zawartość białka oraz posiadają około 10 - 15% tłuszczu [Brzóska i wsp. 2010]. Tradycyjnym sposobem wydobywania olejów jest metoda tłoczenia na zimno. Opierając się na Codex Alimentarius oleje pozyskane tą metodą należą do roślinnych tłuszczu jadalnych, wytworzonych z użyciem siły mechanicznej - procesu tłoczenia, bez działania wysokiej temperatury. Następnie oczyszczane przez wirowanie, płukanie wodą, sedymentację oraz filtrowanie. Duży wpływ na jakość tłoczonych produktów mają cechy surowców takie jak brak zanieczyszczeń, uszkodzeń, dojrzałość oraz to, jak przebiegały etapy występujące przed skierowaniem do tłoczenia: zbieranie, suszenie, przetrzymywanie w magazynie [Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak 2012]. Schemat

procesu, w którym pozyskuje się makuchy z nasion roślin oleistych, przedstawiono na Rysunku 1. Trzy główne części to przygotowanie nasion, następnie wydobycie oleju i jego obróbka przez oczyszczanie oraz uszlachetnianie.



Rys. 1 Schemat produkcji makuchów [Opracowanie własne na podstawie: Maszewska i Wroniak 2014]

Zakłada się m.in. w przypadku rzepaku, iż z 1000 ton nasion po wytłoczeniu oleju można otrzymać w przybliżeniu ok. 580-620 ton śruty poekstrakcyjnej (którą otrzymuje się przez ekstrakcję ciągłą rozpuszczalnikami organicznymi) albo ok. 630-700 ton makuchów [Brzóska i wsp. 2010].

Na podstawie danych FAO z 2020 r. światowa produkcja roślin oleistych wynosiła ponad 331 mln ha. Jeżeli chodzi o produkcję z uwzględnieniem ekwiwalentów makuchów przedstawia się ona następująco:

Tabela. 1. Dane dotyczące produkcji roślin oleistych pod względem ekwiwalentów makuchów:

Obszar	Rok	Produkcja [tys. ton]	Pozycja w rankingu pod względem wielkości produkcji
Świat	2018	410177,314	-
	2019	406973,561	
	2020	419711,345	
Stany Zjednoczone	2018	101324,357	1
	2019	82938,547	6
	2020	94836,335	4
Brazylia	2018	95358,566	3
	2019	93180,547	5
	2020	99175,573	2
Chiny	2018	35037,200	11
	2019	38497,230	10
	2020	42053,861	8
Unia Europejska	2018	16907,021	-
	2019	16742,375	
	2020	18258,679	
Polska	2018	1303,149	78
	2019	1398,257	73
	2020	1847,005	58

Źródło: [Internet 1: FAOSTAT 2022], obliczenia własne.

Kluczowym producentem roślin oleistych są Stany Zjednoczone oraz Brazylia, których udział procentowy w produkcji wynosi ponad 46%. Jeżeli chodzi o Azję, Chiny są w czołówce (ok. 10%) z produkcją wynoszącą około 42053 tys. ton. Plony pochodzące z Unii Europejskiej stanowią ponad 4%. Natomiast Polska plasuje się na 58 miejscu w rankingu (rok 2020) - to najwyższa pozycja w przeciągu 3 lat, z produkcją wynoszącą około 1847 tys. ton roślin oleistych [Internet 1, 2022].

Na rynku polskim średnie krajowe ceny zakupu nasion rzepaku netto oscylują w granicach około 3000 zł (dane ostatnich 12 miesięcy). W perspektywie roku, średnia

krajowa cena sprzedaży netto oleju rzepakowego rafinowanego wzrosła natomiast, z 5619 zł za tonę w grudniu 2021 roku do 7807 zł/tonę w grudniu 2022 roku. W tym samym czasie cena oleju surowego spadła z 7160 zł/tonę o około 9%. W przypadku śruty rzepakowej cena z 1270 zł za tonę wzrosła do 1461 zł za tonę. Makuchy rzepakowe biorąc pod uwagę średnie miesięczne ceny sprzedaży w zakładach tłuszczowych za rok 2019 z 1022 zł za tonę w styczniu i lutym 2022 taniały z miesiąca na miesiąc do ceny 858 zł w grudniu. W przeciwieństwie do roku 2018, kiedy w początkowych miesiącach cena ta wynosiła 845-865 zł za tonę, a pod koniec już ok. 1000 zł za tonę. Polski handel nasionami rzepaku pod względem eksportu porównując okres od stycznia do września roku 2021 i 2022, zwiększył się z 135 433 tys. EUR za wolumen 279 178 ton do 157 781 tys. EUR za 219 743 tony. W skali europejskiej najważniejszymi eksporterami w 2022 roku były Niemcy (197 059 ton), Czechy (10 079 ton) i Wielka Brytania (7 114 ton). Ogólny wzrost można odnotować w przypadku importu z 249 939 tys. EUR za 416 462 ton do 523 288 tys. EUR za 692 431 ton nasion. W roku 2022 głównymi importerami była Ukraina, Australia i Czechy [Chruśliński 2022].

1.3. Właściwości fizyko-chemiczne makuchów

Makuchy będące produktem ubocznym, powstałym w wyniku tłoczenia oleju z nasion roślin oleistych, w zależności od budowy pras, w tym sił ich zgniotu mogą wykazywać niewielkie różnice w składzie chemicznym. Bazując na makuchach rzepakowych wykazano, iż zawartość białka zawiera się średnio między 30 a 34%. Białko ogólne w makuchach jest na niższym poziomie w porównaniu do śruty poekstrakcyjnej. Makuchy wykazują pożądany skład aminokwasowy, występujące w nich aminokwasy w tym metionina, lizyna, arginina czy tyrozyna są cenione z uwagi na zapotrzebowanie na wysokobiałkowe pasze dla zwierząt [Brzóska i wsp. 2010]. Jeżeli chodzi o skład kwasów tłuszczowych, to w makuchach rodzimego surowca oleistego – rzepaku, bazując na badaniach Borys i Borys [2006], dominują kwasy jednonienasycone, w tym kwas oleinowy. Występują również kwasy nienasycone, tj. linolowy, α -linolenowy. Przy porównaniu metod tłoczenia makuchów na zimno oraz na gorąco, zauważalne są różnice w wydajności, jak i składzie kwasów tłuszczowych. Udział kwasów nasyconych był większy w przypadku tłoczenia na zimno. Uważa się, iż stosując metodę tłoczenia na zimno można otrzymać makuchy o wyższej zawartości tłuszczu około 13,9 g/100 g suchej masy, jednakże z niższą zawartością pozostałych składników. Niezależnie od stosowanej

metody tłoczenia makuchy cechuje korzystny stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych kwasów tłuszczowych.

1.4. Przykłady zastosowania/wykorzystania makuchów

Najbardziej rozpowszechnionym zastosowaniem makuchów jest przemysł paszowy. Po wprowadzeniu na terenie Unii Europejskiej zakazu używania mączek mięsno-kostnych, odpady przemysłu tłuszczowego są idealnym dodatkiem dostarczającym energii i białka. Makuchy rzepakowe pochodzące z polskiego rynku mogą zastąpić importowane wytłoki z soi, z uwagi na zbliżony poziom aminokwasowy i wartość energetyczną. Dotychczasowe badania wskazują, iż dodatek makuchów do pasz wpływa korzystnie na zmiany w składzie kwasów tłuszczowych mleka owiec i krów. Makuchy mogą być stosowane jako dodatek do kiszzonek, aby je wzbogacić w białko z przeznaczeniem dla wysokowydajnego bydła. Innym kierunkiem wykorzystania makuchów, z uwagi na obecność w ich składzie takich pierwiastków jak: magnez, wapń, fosfor, mangan czy żelazo są nawozy organiczne. Makuchy rzepakowe mogą być wykorzystane również przez przemysł energetyczny. W związku z prawem wprowadzonym w Unii, dotyczącym ograniczenia emisji gazów cieplarnianych, pojawiła się nowa możliwość wykorzystania makuchów w produkcji energii elektrycznej. Makuchy posiadają wysoką wartość opałową. W przypadku wytłoków z rzepaku ciepło spalania wynosi około $27 \text{ MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$, natomiast wartość opałowa ok. $26 \text{ MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$. Jest to zbliżony poziom do wartości odpowiadającej węglowi kamiennemu. Dzięki dobrym właściwościom organoleptycznym oraz pożądanym składnikom odżywczym, w tym m.in. zawartości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, przemysł spożywczy oraz sektor kulinarny są otwarte na zagospodarowanie makuchów. Istnieje zapotrzebowanie na rynku dla batonów, przekąsek słonych oraz słodkich wzbogacanych makuchami. Aktualnie m.in. makuchy z sezamu są przetwarzane w produkcji chałw [Kinal i wsp. 2003, Banaszkiwicz 2008, Brzóska i wsp. 2010, Kachel-Jakubowska i wsp. 2011, Koniec i Krzywonos 2018].

1.5. Charakterystyka drożdży *Yarrowia lipolytica*

Drożdże *Yarrowia lipolytica* należą do gatunku niekonwencjonalnych mikroorganizmów, biorąc pod uwagę ich wyróżniającą się strukturę genomu oraz daleką odległość filogenetyczną od pozostałych drożdży. Wcześniej przypisane były do rodziny

Dipodascacea, a formalnie nazywane *Candida*, *Endomycopsis* lub *Saccharomycopsis lipolytica*. Jeżeli chodzi o morfologię szczepu jest ona zależna od zmiennych warunków hodowli, w tym składu podłoża i może występować w postaci silnie poskręconych i matowych kolonii lub też gładkich, błyszczących, podłużnych komórek. Dymorfizm tych mikroorganizmów nie jest dokładnie poznany, ale obserwuje się powstawanie strzępek w środowisku, gdzie jest ograniczony dostęp do azotu lub wywołany jest stres w związku z temperaturą czy dostępem do tlenu. Drożdże te cechują się powinowactwem do tlenu, zdolne są do produkcji wielu metabolitów oraz mają wysoką zdolność sekrecyjną. Przeważająca część szczepów nie rośnie w temperaturze powyżej 32°C [Krzyczkowska i Fabiszewska 2014].

Yarrowia lipolytica może być izolowana z produktów mlecznych, mięsnych, gleby, ścieków i środowisk skażonych ropą. Jest w stanie rosnąć w podłożach zawierających frakcję lipidową, wykorzystując trójglicerydy jako źródło węgla. Hydrofobowe substraty indukują aktywność enzymów lipolitycznych, które hydrolizują trójglicerydy do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu [Thevenieau i wsp. 2009]. Na przydatność szczepu w przemyśle wpływ mają liczne cechy, w tym m.in. to czy jest on bezpieczny, stabilny pod względem genetycznym, łatwy do kontrolowania by zapewnić powtarzalność oraz jakość produktów. Warunki procesów przemysłowych są bardzo wymagające dla mikroorganizmów, gdyż narzucają określoną dostępność tlenu, kwasowość układu, temperaturę i wiele innych. Rozwój metod genetycznych i możliwość modyfikacji szczepów sprawiły, iż drożdże *Yarrowia lipolytica* cieszą się dużą popularnością, również na skalę przemysłową. Powszechnie znana jest możliwość syntezy cyklicznych estrów zwanych laktonami, w tym głównie gamma- dekalaktonu, znajdującego zastosowanie w przemyśle kosmetycznym i spożywczym. Mikroorganizmy wykorzystywane są również przemysłowo w procesie syntezy kwasów dikarboksylowych na potrzeby przemysłu chemicznego. W literaturze opisane są zdolności tych drożdży do rozdzielania mieszanin ketonów i alkoholi, na bazie biokonwersji jednej z grup i enancjoselektywności oraz ekspresji optycznie czynnych produktów. Wykazano również, że drożdże *Yarrowia* są zdolne do hydrolizy estrów, przy czym wydajność takiej reakcji zależy od rodzaju szczepu i użytych substratów. Zdolności hydrolityczne wynikają z aktywności proteolitycznej i lipolitycznej tych mikroorganizmów. Lipazy i proteazy mogą być wytwarzane wewnątrzkomórkowo i zewnątrzkomórkowo. Potwierdzeniem tego faktu są m.in. badania Szczepaniak i Wojtatowicz [2011], w których udowodniono, iż następstwem rozkładu tłuszczu za

pośrednictwem enzymów lipolitycznych i proteolitycznych jest aromat żółtego sera [Thevenieau i wsp. 2009]. Cechą charakterystyczną omawianego gatunku jest również zdolność do kumulacji lipidów, tzw. oleju mikrobiologicznego. W dotychczasowych publikacjach opisano gatunek zdolny do syntezy ok. 43% lipidów w odniesieniu do suchej masy. Zainteresowanie olejem mikrobiologicznym wynika m.in. z zawartości w nim frakcji długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Podkreśla się również pionierskie wykorzystanie *Yarrowia lipolytica* w produkcji białek heterologicznych [Arnesen i Borodina 2012, Nicaud 2012, Park i Ledesma-Amaro 2022].

Liczne badania z udziałem gatunku *Yarrowia*, w tym doświadczenia przeprowadzone przez Rymowicza i wsp. [1997] wskazują, iż mikroorganizmy te cechują się szybkim wzrostem na substratach tłuszczowych i wysoką wartością energetyczną, co umożliwia wykorzystanie ich jako drożdży paszowych, mogących ograniczyć stosowanie śruty sojowej. Przy zastosowaniu substratów lipidowych w podłożu, jako jedyne źródła węgla, odnotowywano w wyżej wspomnianych badaniach, nawet 2-krotnie większą wydajność. Kolejnym argumentem potwierdzającym korzyści z wykorzystania biomasy tych mikroorganizmów w produkcji pasz jest skład aminokwasowy komórek. W białku drożdżowym występuje wiele aminokwasów egzogennych, z podkreśleniem przykładu lizyny, co podnosi wartość odżywczą pokarmu dla zwierząt. Ponadto mikroorganizmy te są również w stanie wiązać metale, co pozwala na otrzymanie drożdży wzbogacanych pożądanymi pierwiastkami [Juszczak i wsp. 2015].

Warto podkreślić, iż *Yarrowia lipolytica* jest gatunkiem niepatogennym i w pełni bezpiecznym, posiada statut GRAS (Generally Recognized As Safe). W skali przemysłowej drożdże *Yarrowia* nabierają znaczenia również w kontekście produkcji bioemulgatora - Yansanu, który może być potencjalnie wykorzystany w przemyśle naftowym. w procesie oczyszczania tanków oraz obszarów zanieczyszczonych olejami. [Trindade J. i wsp. 2008]. W literaturze wspomina się również o możliwościach zastosowania *Yarrowia lipolytica* w produkcji terpenoidów, które wykorzystywane są na szeroką skalę w przemyśle farmaceutycznym, w biopaliwach, środkach nadających barwę czy smak, kosmetykach. Metody biotechnologicznej syntezy zyskują przewagę nad metodami chemicznymi, zarówno w aspekcie ekonomicznym, jak i ekologicznym. Dlatego też badania z udziałem mikroorganizmów są ciągle poszerzane, a niekonwencjonalne drożdże *Yarrowia* są coraz bardziej cenione, z uwagi na szeroki wachlarz wykorzystywanych substratów, możliwość sekwencjonowania genomu, a tym samym dogodne narzędzie inżynierii genetycznej oraz bezpieczeństwo w kontakcie

z żywnością [Arnesen i Borodina 2022]. W 2022 roku Park i Ledesma-Amaro przeprowadzili w środowisku przemysłowym ankietę dotyczącą roli drożdży *Yarrowia* w przemyśle. Członkowie branży zapytani o produkty docelowe z wykorzystaniem *Yarrowia lipolytica*, zwrócili uwagę na lipidy, terpenoidy oraz białka. Pozytywnie postrzegali szczepy, uzasadniając to dużą gęstością hodowli i odpornością na wahania parametrów fizykochemicznych. Mimo to, wciąż należy dążyć do pogłębienia wiedzy na temat zachowań mikroorganizmów w fermentacji i sposobu możliwych zastosowań w badaniach.

1.6. Hydrolazy, ich synteza przez mikroorganizmy i właściwości katalityczne

Enzymy to białka, które wykazują aktywność katalityczną, polegającą na zmniejszeniu energii aktywacji, nie wpływając tym samym na równowagę reakcji. Mechanizm reakcji katalitycznej polega na połączeniu substratu w miejscu aktywnym enzymu, skutkiem czego jest utworzenie kompleksu enzym-substrat, które kolejno przechodzi w kompleks enzym-produkt. Ostatnia faza procesu obejmuje uwolnienie enzymu i produktu do środowiska reakcji. Reakcje z udziałem enzymów mogą mieć różny przebieg, jednakże głównymi czynnikami warunkującymi jest rodzaj użytego rozpuszczalnika, w jakim pH oraz temperaturze odbywa się reakcja, obecność aktywatorów lub inhibitorów. Wyróżnia się kilka klas enzymów:

- Oksydoreduktazy
- Transferazy
- Hydrolazy
- Liazy
- Izomerazy
- Ligazy

Najpowszechniej wykorzystywanymi enzymami w skali przemysłowej (np. w przemyśle spożywczym) są hydrolazy, które przyspieszają rozpad wiązań w związkach chemicznych w obecności wody, bez użycia kofaktorów. W tej klasie występują następujące podklasy, które działają na wiązania:

- Glikozydowe
- Estrowe
- Peptydowe
- Wiązania bezwodników kwasowych

- Wiązania C-N inne niż peptydowe
- Wiązania -N -fosfoamidaza rozkładająca fosfokreatynę

Lipazy stanowią najliczniejszą grupę hydrolaz, katalizującą reakcję hydrolizy wiązań estrowych w estrach kwasów karboksylowych. Są wytwarzane przez rośliny, zwierzęta i mikroorganizmy. Pełnią funkcję w przetwarzaniu lipidów. Do pozytywnych aspektów działania lipaz należy szeroka specyficzność co do substratów, łatwa dostępność oraz stabilność. Najpopularniejszym przykładem jest lipaza trzustkowa. W określonych warunkach działania lipaz, ilość wody w mieszaninie determinuje kierunek reakcji, katalizowanej przez lipazę. Przy niewielkiej ilości wody lub jej braku zachodzi raczej reakcja estryfikacji i transestryfikacji (alkoholizy lub acydolizy). Nadmiar wody sprzyja hydrolizie. Właściwości i potencjał lipaz są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, chemicznym, przy produkcji leków, tekstyliów, kosmetyków i papieru. Drugą podklasą w grupie hydrolaz są hydrolazy glikozydowe, rozcinające wiązania glikozydowe glikozydów, wielocukrów. Działają one z szeroką swoistością. W odróżnieniu do lipaz są ściśle specyficzne względem substratów. Najpowszechniej występującym enzymem tej grupy jest amylaza, która odpowiada za hydrolizę m.in. skrobi. Hydrolazy peptydowe z kolei rozcinają wiązania peptydowe. Głównym przedstawicielem tej grupy są enzymy trawienne [Hibner i Ostaszewski 2011, Wilk 2021, Instrukcja 1].

2. Cel i zakres pracy

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie wybranych makuchów pozyskanych z prywatnej firmy Oleovita, pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako induktorów aktywności hydrolitycznej drożdży *Yarrowia lipolytica*.

Zakres pracy: Zakres pracy obejmował przeanalizowanie pięciu rodzajów makuchów: z konopi, rzepaku, krokosza, lnu i lnianki rydzowej, pod kątem zawartości i charakterystyki frakcji lipidowej. Praca badawcza podzielona została na dwa etapy. W pierwszym z nich makuchy poddano ogólnej charakterystyce, obejmującej m.in. oznaczenie suchej masy, zawartości tłuszczu, liczby kwasowej, profilu kwasów tłuszczowych czy zawartości polifenoli. W drugim etapie badań, z poszczególnych rodzajów makuchów wyekstrahowany został tłuszcz, który użyto jako substrat lipidowy w hodowli wgłębnej drożdży *Yarrowia lipolytica*. Na tym etapie badań oznaczono plon suchej masy komórkowej drożdży oraz ich zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną.

3. Opis założeń metodycznych

3.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy w niniejszej pracy stanowiło 5 rodzajów makuchów z roślin oleistych. Wśród nich były makuchy otrzymane po wytłoczeniu oleju z nasion konopi, rzepaku, krokosza, lnianki rydzowej oraz lnu, metodą na zimno w temperaturze nie przekraczającej 40°C. Makuchy zostały pozyskane z prywatnej firmy Oleovital w Grajowie (woj. małopolskie). Dostarczone w woreczkach strunowych, przechowywane w suchym i ciemnym miejscu. Zgodnie z informacją na stronie producenta w swoim składzie nie zawierały dodatków, barwników i konserwantów.



Rys. 2. Makuchy z roślin oleistych: konopi, lnu, krokosza, rzepaku, lnianki rydzowej [Fotografia własna]

3.2. Metodyka pracy

Pracę badawczą realizowano w dwóch etapach.

Etap 1.

W pierwszym z nich makuchy poddane zostały ogólnej charakterystyce, obejmującej: oznaczenie suchej substancji, pomiar zawartości tłuszczu, oznaczenie liczby kwasowej oraz profilu kwasów tłuszczowych, a także zawartości polifenoli.

3.2.1. Oznaczanie suchej substancji

Suchą substancję w badanych makuchach oznaczano metodą wagosuszkową. W tym celu na wadze RADWAG PS 3500.R2.M odważano w naczynkach wagowych, z dokładnością 0,001 g po 5 g poszczególnych makuchów, po czym suszono w suszarce KBC- 65 G w temperaturze 85°C przez minimum 24 godziny. Po wysuszeniu i ostudzeniu w eksykatorze, zawartość naczynek ponownie ważono i z ubytku masy obliczano

zawartość suchej substancji. Oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach.

3.2.2. Oznaczanie zawartości tłuszczu

Zawartość tłuszczu oznaczono według normy PN-EN ISO 659:2010. Odważano ok. 15 g poszczególnych makuchów (z dokładnością 0,001 g), które następnie rozdrabniano w moździerzu. Rozdrobniony surowiec przenoszono do gilzy i umieszczano w aparacie Soxhleta (rys. 3). Prowadzono ok. 1 godzinną ekstrakcję (10 cykli ekstrakcyjnych) porcją 150 ml dichlorometanu (Poch, Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice). Po ekstrakcji rozpuszczalnik odparowywano na wyparce (Buchi B-490 Heating Bath), kolby z wyekstrahowanym olejem ważono i wyliczano wydajność procesu ekstrakcji. Oznaczenie wykonywano w dwóch powtórzeniach.



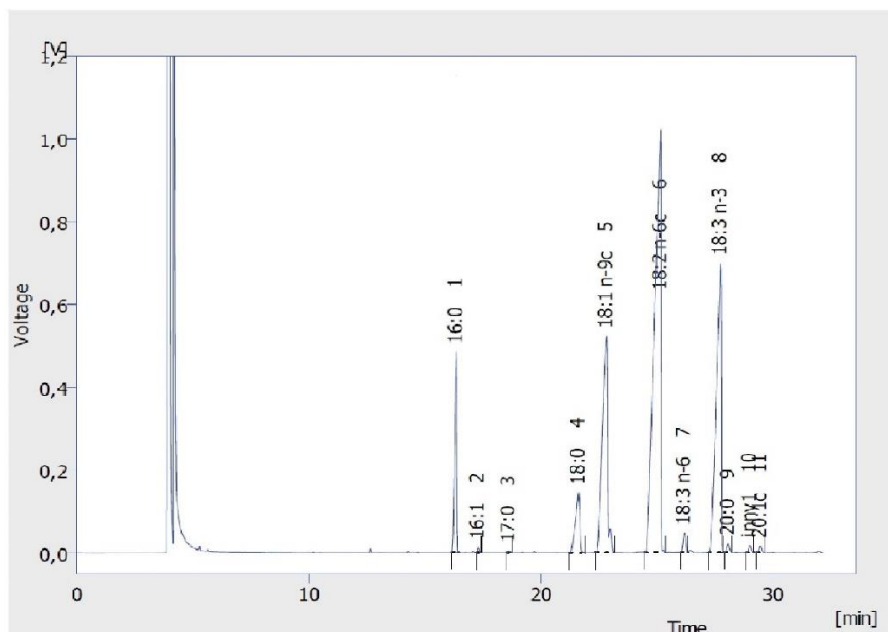
Rys. 3. Aparaty Soxhleta w czasie ekstrakcji tłuszczu [Fotografia własna].

3.2.3. Oznaczanie liczby kwasowej

Liczbę kwasową oznaczono w oparciu o miareczkowanie potencjometryczne, według normy PN-EN ISO 660:2010. Naważano około 1 g oleju wyekstrahowanego z poszczególnych makuchów, następnie rozpuszczano w 70 ml mieszaniny etanol – eter dietylowy 1:1 (v/v) i kolejno automatycznie miareczkowano za pomocą titratora-TitraLab AT1000 Series. Oznaczenie polegało na zobojętnieniu wolnych kwasów tłuszczowych obecnych w badanym oleju mianowanym 0,1 molowym roztworem wodorotlenku potasu wobec wskaźnika - fenoloftaleiny, do uzyskania jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się 30 sekund. Wynik wyrażono w mg KOH/g oleju. Oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach.

3.2.4. Oznaczanie profilu kwasów tłuszczowych

Badane próbki wyekstrahowanych olejów upochodniano do estrów metylowych kwasów tłuszczowych zgodnie z normą PN- EN ISO 12966-2: 2017. Analizę przeprowadzano w chromatografie gazowym YL6100, który jest wyposażony w detektor płomieniowo - jonizacyjny i kolumnę kapilarną BPX -70 o długości 60 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,25 μm . Analizowany materiał wstrzykiwano do dozownika, gdzie zmieniał stan skupienia na gazowy, kolejno transportowany był przez gaz nośny do kolumny i tam jego składniki ulegały rozdzielaniu i przekazane były do detektora. Początkowa temperatura analizy wynosiła 70°C i utrzymywana była przez 30 sekund, kolejno następował przyrost temperatury w tempie 15°C na minutę do 160°C, następnie przyrost o 1,1°C na minutę do 200°C i kolejny przyrost w tempie 30°C na minutę do osiągnięcia 225°C. W tej temperaturze następowało przetrzymanie przez 1 minutę. Injektor miał temperaturę 225°C, a detektor 250°C. Gazem nośnym w trakcie analiz był azot, o natężeniu przepływu 1 ml na minutę. Z uzyskanych chromatogramów, na podstawie pól powierzchni pików charakterystycznych dla konkretnych kwasów tłuszczowych (identyfikowanych za pośrednictwem standardów wewnętrznych) wykonano obliczenia, podając zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w procentach [Wirowska-Wojdyła i wsp. 2019]. Oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach.



Rys. 4. Przykładowy chromatogram z analizy chromatograficznej, przedstawiający profil kwasów tłuszczowych w oleju wyekstrahowanym z makuchu konopnego [Materiał własny].

3.2.5. Oznaczenie zawartości polifenoli

Oznaczenie zawartości polifenoli w wyekstrahowanym oleju wykonywano w oparciu o analizę spektrofotometryczną, metodą Folina-Ciocalteu. W celu przygotowania próbek do analizy, odważano ok. 5 g poszczególnych makuchów i zalewano je 30 ml metanolu, po czym mieszano w ciągu 2 minut na wortexie, homogenizowano w homogenizatorze IKA T25 digital ULTRA TURRAX przez 3 min (10 000 rpm) i finalnie odwirowywano w wirówce Centrifuge MPW- 352 przez 10 minut. Po odwirowaniu pobierano 0,18 ml klarownej frakcji i dodawano 4,92 ml wody. W przypadku makuchów z krokosza pobierano 0,09 ml roztworu i 5,01 ml wody. Do tak przygotowanych roztworów dodawano 0,3 ml odczynnika Folin & Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Merck Life Science, Poznań), odczekiwano 3 minuty po czym dodawano 0,6 ml węgla sodu (CHEMPUR, Piekary Śląskie). Próbkę przetrzymywano przez 1 godzinę bez dostępu światła, po czym mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 750$. Próbką referencyjną był metanol. Roztwór makuchów rzepakowych i lnianki rydzowej rozcieńczano 20- krotnie (pobierano 0,2 ml ekstraktu i 3,8 ml metanolu).

Zawartość polifenoli w próbkach obliczano w oparciu o krzywą wzorcową kwasu chlorogenowego. Metoda Folina-Ciocalteu pozwala na oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli. Związki fenolowe utleniają się, a związki z odczynnika ulegają redukcji w środowisku zasadowym i powstaje produkt o niebieskiej barwie. Mierzona absorbancja jest proporcjonalna do całkowitej zawartości związków fenolowych w próbce [Pieszko i Zaremba 2013].

Etap 2.

W drugim etapie badań, wyekstrahowana z makuchów frakcja lipidowa została wykorzystana jako źródło węgla w hodowlach węglnych drożdży *Yarrowia lipolytica*. W trakcie 72 godzinnej hodowli mikroorganizmów oznaczano plon suchej masy komórkowej drożdży (metodą wagosuszkową) oraz oceniano zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną drożdży (metodą spektrofotometryczną, na bazie hydrolizy laurynianu *p*- nitrofenylu jako substratu). Wyniki zestawiano z danymi z tradycyjnych hodowli na podłożu YPO i YPG.

3.2.6. Przygotowanie podłoży mikrobiologicznych

- a) Podłoże YPG, wykorzystywane do namnożenia komórek drożdży

Yarrowia lipolytica

Skład podłoża:

- Ekstrakt drożdżowy (10 g /l): BTL Spółka z.o.o. Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź
- Pepton (20 g/l): BTL Spółka z.o.o. Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź
- Glukoza (20 g/l): Chempur, Piekary Śląskie

b) Podłoża YPO i YPOM wykorzystywane w hodowlach właściwych drożdży *Yarrowia lipolytica*, z lipidowym źródłem węgla

Skład podłoża:

- Ekstrakt drożdżowy (10 g /l): BTL Spółka z.o.o. Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź
- Pepton (20 g/l): BTL Spółka z.o.o. Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź
- Oliwa z oliwek (10 g /l) (podłoże YPO) lub oleju z makuchów (10 g /l) (podłoże YPOM)

Podłoża przygotowywano na bazie każdego wytłoczonego oleju z makuchów.

3.2.7. Właściwa hodowla wglębna drożdży *Yarrowia lipolytica*

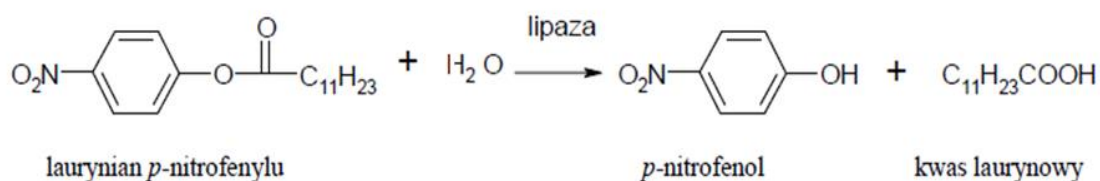
Hodowlę prowadzono w kolbach o pojemności 500 cm³. Kolby z podłożem, o objętości roboczej 100 cm³ zaszczepiono 1 cm³ matki drożdżowej namnożonej na płynnym podłożu YPG (czas namnażania 24 godziny, temperatura 28°C, wytrząsarka KS 4000 ic control przy obrotach 140 na minutę). Hodowlę właściwą prowadzono również w temp. 28°C, przez okres 72 godzin, pobierając w odstępach 24-godzinnych próbki do analiz.

3.2.8. Oznaczenie plonu suchej masy komórek drożdży *Yarrowia lipolytica*

W celu oznaczenia plonu suchej masy komórkowej drożdży, do uprzednio zważonych gilz o objętości 50 cm³ pobierano 20 cm³ płynnej hodowli na podłożach YPOM, YPO oraz YPG. Gilzy z zawartością odwirowywano w wirówce MPW-352 przez 5 minut (8000 rpm). Supernatant zlewano znad osadu, a biomasę drożdży suszono w suszarce KBC- 65 G w temperaturze 85°C do stałej masy. Po wysuszeniu gilzy ponownie ważono na wadze RADWAG PS 3500.R2.M, po czym z różnicy mas określono plon suchej masy drożdży, podając wynik w przeliczeniu na 1 dm³ podłoża (g s.s./dm³). Oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach.

3.2.9. Oznaczenie zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej

Oznaczenie zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej drożdży *Yarrowia lipolytica* namnażanych na podłożach ze zróżnicowanym substratem lipidowym (frakcja lipidowa z różnych makuchów) prowadzono w oparciu o reakcję hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu (rys. 5).



Rys. 5. Reakcja hydrolizy laurynianu *p*-nitrofenylu z udziałem lipaz [Opracowanie własne].

Substrat przygotowano przez rozpuszczenie 0,2 g laurynianu *p*-nitrofenylu (odczynnik syntezowany w laboratorium Katedry Chemii SGGW), w 4 ml heptanu (Poch, Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice). Oznaczenie polegało na pobraniu do probówki typu eppendorf po 100 μl płynu pochodowlanego i 25 μl roztworu substratu, wymieszaniu na vortexie i inkubowaniu przez 5 minut w cieplarni Memmert, w temperaturze około 35°C. Po tym czasie do kuwet wprowadzono 3 ml 0,1 molowego roztworu wodorotlenku sodu (Poch, Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice) oraz roztwór z eppendorfu, Po wymieszaniu reagentów dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego (spektrofotometr Ray Leigh UV-1601), przy długości fali $\lambda=410\text{ nm}$ – jest to analityczna długość fali dla *p*-nitrofenolu. Ocenę zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej prowadzono w dwóch powtórzeniach, przez 3 doby. Aktywność lipaz wyliczono z następującego wzoru (wyprowadzonego na podstawie krzywej wzorcowej):

$$\text{Aktywność lipaz} = 1,764 \times \frac{A}{t} \left[\frac{U}{\text{ml}} \right]$$

gdzie:

A- Absorbancja zmierzona przy długości fali 410 nm

t- czas reakcji [5 minut]

4. Omówienie wyników

Badania przeprowadzone w ramach niniejsze pracy miały na celu scharakteryzowanie frakcji lipidowej wybranych makuchów roślin oleistych, pod kątem potencjalnego ich wykorzystania jako źródła węgla w hodowlach mikrobiologicznych. W makuchach oznaczono suchą masę, która określa ilość związków nieorganicznych oraz materii organicznej, w składzie której wyróżnia się białko, tłuszcz czy włókno. Ponadto określono zawartość tłuszczu, liczbę kwasową, wskazującą na ilość wolnych kwasów tłuszczowych, co powiązane jest ze stopniem hydrolizy tłuszczu oraz ustalono profil kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej. W kontekście wykorzystania makuchów w hodowlach mikrobiologicznych oznaczono również zawartość polifenoli.

Drugi etap pracy koncentrował się na przeprowadzeniu hodowli mikrobiologicznej, bazującej na podłożu, w którym źródłem węgla był olej wyekstrahowany z makuchów. Namnażając drożdże *Yarrowia lipolytica* kontrolowano plon biomasy i zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną, porównując te parametry z hodowlami kontrolnymi, na standardowym podłożu: YPG oraz YPGO, zawierającym oliwę z oliwek, jako induktor lipaz.

4.1. Zawartość suchej masy oraz tłuszczu w analizowanych makuchach

Analiza zawartości suchej masy we wszystkich pięciu makuchach firmy Oleovita wykazała, iż zawierają one zbliżone ilości wody. Sucha substancja kształtowała się na poziomie ok. 85-89%. Zawartość tłuszczu w suchej masie wynosiła od 13% do 21%. Szczegółowe dane dotyczące procentowej zawartości suchej masy i tłuszczu zestawiono w tabeli nr 2.

Tabela 2. Zawartość suchej masy oraz tłuszczu w wybranych makuchach.

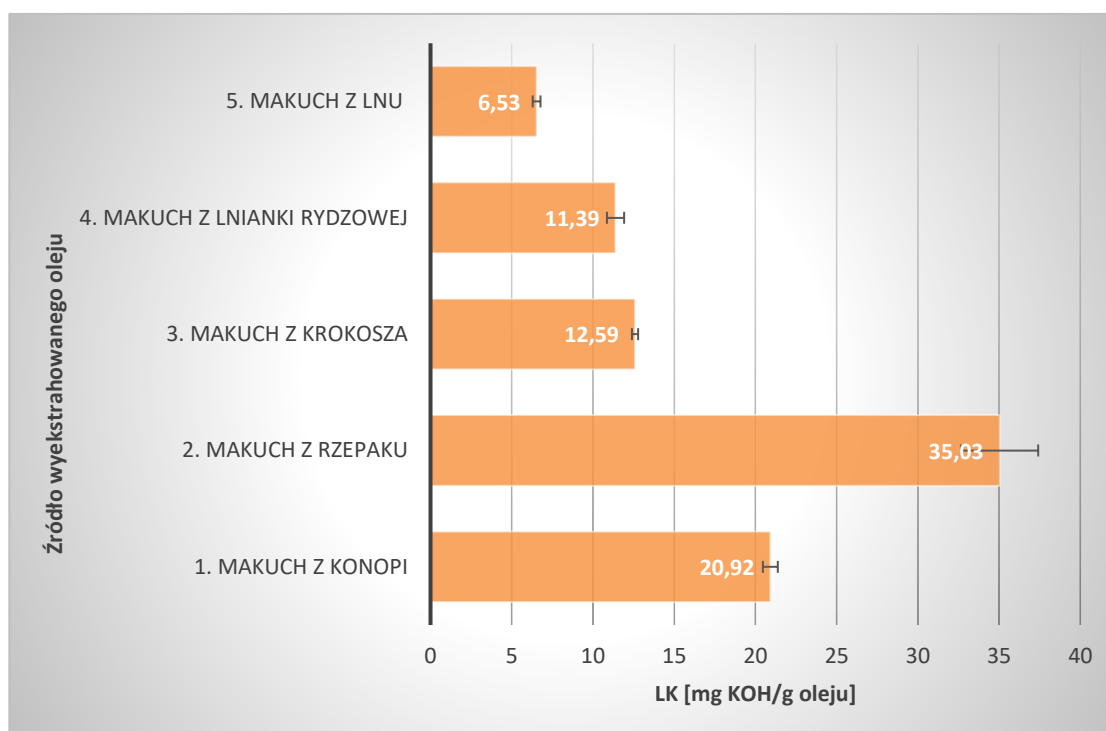
Rodzaj makuchów	Sucha masa [%]	Zawartość tłuszczu [%]
Makuchy z konopi siewnych	85,70 ± 2,12%	14,69 ± 2,17%
Makuchy rzepakowe	85,31 ± 0,12%	20,26 ± 1,99%
Makuchy z krokosza barwierskiego	88,02 ± 2,26%	13,82 ± 1,56%
Makuchy lniane	88,45 ± 0,03%	18,19 ± 1,65%
Makuchy z lnianki rydzowej	88,04 ± 0,27%	19,91 ± 0,11%

Analizując powyższe dane można zauważyć, iż najwyższą zawartością frakcji lipidowej charakteryzowały się makuchy rzepakowe i z lnianki rydzowej. Zawartość

tłuszczu w tych surowcach była o ok. 6-7% niższa w stosunku do makuchów z krokosza barwierskiego czy konopi siewnych. Zestawiając uzyskane wyniki z danymi literaturowymi można wnioskować, iż makuchy firmy Oleovita cechują się nieco niższą zawartością suchej masy, ale znacznie wyższą zawartością tłuszczu. Według badań przeprowadzonych przez Kinal i wsp. [2003], gdzie przebadane zostały makuchy rzepakowe i lniane, sucha substancja kształtowała się na poziomie około 96%, z czego 11% stanowiła frakcja lipidowa. Kalembasa i Adamiak [2010] prowadząc badania na makuchach rzepakowych, również wskazują na zawartość ok. 95,5% suchej masy. Autorzy zastrzegają, iż zawartość tłuszczu związana jest ściśle ze stopniem wyłoczenia oleju z surowców.

4.2. Oznaczenie liczby kwasowej olejów wyekstrahowanych z wybranych makuchów

Na kolejnym etapie badań, wyekstrahowany z makuchów metodą Soxhleta olej poddano oznaczeniu liczby kwasowej. Jest to parametr będący wskaźnikiem stopnia hydrolizy. Określając ilość wolnych kwasów tłuszczowych w wyekstrahowanych olejach, można było ocenić ich jakość. Średnie wyniki otrzymane z niniejszego oznaczenia zobrazowano na rysunku nr 6.



Rys. 6. Średnie wartości liczby kwasowej olejów wyekstrahowanych z badanych makuchów.

Określone w analizie potencjometrycznej wartości liczby kwasowej oleju pozyskanego z wybranych makuchów wahają się w zakresie od 6,53 mg KOH/g do 35,03 mg KOH/g oleju. Największą LK cechował się olej wyekstrahowany z makuchu rzepakowego – $35,03 \pm 2,38$ mg KOH/g, a najmniejszą olej z makuchu lnianego z wartością $6,53 \pm 2,38$ mg KOH/g. Zbliżone wartości liczby kwasowej miały: olej z makuchu z krokosza barwierskiego ($12,59 \pm 0,19$ mg KOH/g) oraz olej z lnianki rydzowej ($11,39 \pm 0,53$ mg KOH/g). Zestawiając uzyskane wartości LK z danymi Milczarek i Osek [2012] oraz Osek [2000], gdzie liczba kwasowa wyłoków rzepakowych oscylowała w granicach 11,01 mg KOH/g i była określana jako wysoka, można stwierdzić, iż oleje z makuchów rzepakowych czy konopnych charakteryzowały się obniżoną jakością. Być może wynika to z warunków i okresu przechowywania tych makuchów.

4.3. Ocena profilu kwasów tłuszczowych olejów wyekstrahowanych z wybranych makuchów

Celem pełnej charakterystyki olejów wyekstrahowanych z poszczególnych makuchów dokonano analizy profilu kwasów tłuszczowych. Wyniki z oznaczeń chromatograficznych (GC), przedstawiające procentowy udział poszczególnych kwasów zostały przedstawione w tabelach nr 3-7.

Tabela 3. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z makuchów konopnych.

Kwas tłuszczowy	Rodzina kwasów	Liczba wiązań nienasyconych	Średni procentowy udział kwasów tłuszczowych [%]
Kwas linolowy (LA)	ω -6	18:2	44,77
Kwas alfa-linolenowy (ALA)	ω -3	18:3	23,27
Kwas oleinowy	ω -9	18:1	18,86
Kwas palmitynowy		16:0	6,85
Kwas stearynowy		18:0	4,15
Kwas arachidowy		20:0	0,40
Kwas eikozenowy	ω -9	20:1	0,31
		pozostałe	1,39

Analizując dane z tabeli 3 można zaobserwować, iż w oleju z makuchów

konopnych przeważały kwasy wielonienasycone (sumarycznie ok. 68%), z czego ok. 45% stanowił kwas linolowy, pochodzący z rodziny omega-6, a ok. 24% kwas alfa-linolenowy, charakterystyczny dla rodziny omega 3. Kwas oleinowy (jednonienasycony) stanowił frakcję ok. 19%. W mniejszości występowały kwasy nasycone (ok. 11%): głównie palmitynowy i stearynowy. Wyniki niniejszej analizy są spójne z danymi publikowanymi przez zespół Irakli i wsp. [2019], który wykazał, iż w oleju wytłoczonym z nasion konopi przeważały kwasy: linolowy i alfa-linolenowy, stanowiąc odpowiednio ok. 53,4% i 12,1%. Wśród kwasów nasyconych identyfikowano kwas palmitynowy (w ilości od 7,1% do 9,1%), stearynowy (od 2,1% do 2,8%) i arachidowy. Autorzy podkreślali korzystny stosunek kwasów należących do rodziny omega- 6, których było prawie dwukrotnie więcej w stosunku do rodziny omega-3.

Odwrotne proporcje kwasów omega 6 i 3 uzyskano z analiz oleju z makuchów rzepakowych. Dane dotyczące profilu kwasów tłuszczowych frakcji lipidowej tego surowca przedstawiono w tabeli nr 4.

Tabela 4. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z makuchów rzepakowych.

Kwas tłuszczowy	Rodzina kwasów	Liczba wiązań nienasyconych	Średni procentowy udział kwasów tłuszczowych [%]
Kwas oleinowy	ω-9	18:1	62,48
Kwas linolowy (LA)	ω-6	18:2	20,18
Kwas alfa-linolenowy (ALA)	ω-3	18:3	6,93
Kwas palmitynowy		16:0	5,36
Kwas stearynowy		18:0	2,19
Kwas gadoleinowy	ω-9	20:1	1,47
Kwas arachidowy		20:0	0,81
		pozostałe	0,59

W składzie oleju wyekstrahowanego z makuchów rzepakowych dominował kwas oleinowy (jednonienasycony), był on na poziomie 62,48%. Kwasy PUFA (kwas linolowy i alfa-linolenowy) stanowiły łącznie ok. 27%. Kwasy nasycone to tylko kilka procent udziału w stosunku do wszystkich kwasów, z czego palmitynowy stanowił 5,36%, a stearynowy 2,19%. Prezentowane dane są zbliżone do wartości opublikowanych w literaturze. Odnosząc się do badań przeprowadzonych przez prof. Kondratowicz-Pietruszkę [2010] z UE w Krakowie, nad składem tłuszczowym oleju rzepakowego po

rafinacji, można zauważyć znaczące podobieństwa obu olejów. W oleju rzepakowym rafinowanym autorka deklarowała największy udział kwasu oleinowego (około 61,05%), podobnie jak w oleju wyekstrahowanym z makuchów. Zbliżone zawartości wykazano także dla kwasu linolowego (19,60%) oraz alfa-linolowego (8,47%). Wśród kwasów nasyconych, analogicznie, występował kwas palmitynowy 4,6% i stearynowy 2,00%. Kolejne analizowane oleje: z krokosza barwierskiego (tabela 5) i lnu (tabela 6), ogólnym profilem kwasów tłuszczowych były zbliżone do pierwszego omawianego oleju z makuchów konopnych.

Tabela 5. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z makuchów z krokosza barwierskiego.

Kwas tłuszczowy	Rodzina kwasów	Liczba wiązań nienasyconych	Średni procentowy [%] udział kwasów tłuszczowych
Kwas linolowy (LA)	ω -6	18:2	42,71
Kwas alfa-linolenowy (ALA)	ω -3	18:3	31,01
Kwas oleinowy	ω -9	18:1	15,29
Kwas palmitynowy		16:0	6,65
Kwas stearynowy		18:0	3,64
Kwas arachidowy		20:0	0,31
		pozostałe	0,39

Tabela 6. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z makuchów z lnu.

Kwas tłuszczowy	Rodzina kwasów	Liczba wiązań nienasyconych	Średni procentowy [%] udział kwasów tłuszczowych
Kwas linolowy (LA)	ω -6	18:2	43,07
Kwas alfa-linolenowy (ALA)	ω -3	18:3	24,11
Kwas oleinowy	ω -9	18:1	20,66
Kwas palmitynowy		16:0	6,97
Kwas stearynowy		18:0	4,53
Kwas arachidowy		20:0	0,22
Kwas eikozenowy	ω -9	20:1	0,18
		pozostałe	0,26

Tu również największy udział stanowiły kwasy wielonienasycone, sumarycznie ok. 74% w oleju z krokosza i ok. 77% w oleju z lnu. Z kwasów jednonienasyconych

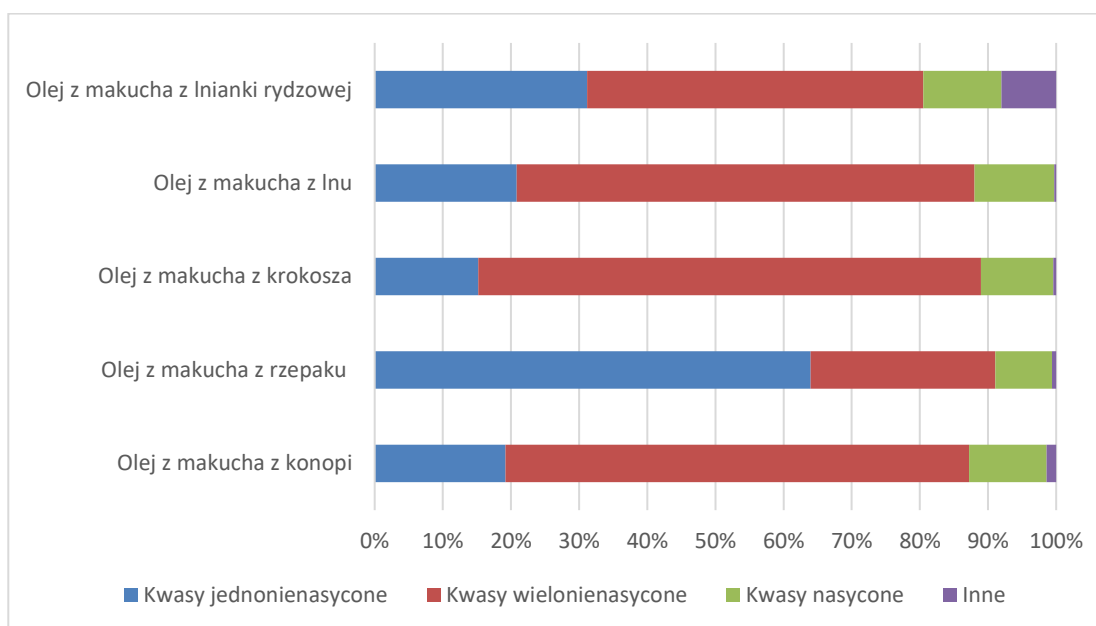
identyfikowano kwas oleinowy w stężeniu 15,29% i 20,66% (odpowiednio dla krokosza i lnu). W obu olejach blisko 10% frakcji lipidowej przypadało na kwasy nasycone: palmitynowy i stearynowy. Wyniki niniejszych analiz są spójne z danymi literaturowymi. Rutkowska i wsp. [2016] przeanalizowali profil kwasów tłuszczowych „nietypowych olejów”, w tym oleju krokoszowego. Ich badania wskazywały na zawartość ok. 78% kwasów wielonienasyconych i ok. 11,5% kwasu jednonienasyconego C18:1. W oleju lnianym analizowanym przez zespół, kwasy PUFA stanowiły nieco mniej, bo 63%, zaś kwas mononienasycony ok. 20%. Derwiaka i wsp. [2015] prowadząc badania sześciu rynkowo dostępnych olejów lnianych tłoczonych na zimno (Oleofarm, Złotopolskie, Zielony Nurt, Ol'Vita, Vis Natura, Bioflax) również potwierdzili, iż wszystkie cechowały się ponad 90% łączną zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych o osiemnastowęglowym łańcuchu węglowodorowym. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe w badanych olejach lnianych reprezentowane były przez kwasy tłuszczowe z rodziny n-6: kwas linolowy oraz n-3: kwas α -linolenowy. Średnio udział ww. kwasów wynosił około 64%. Spośród jednonienasyconych kwasów tłuszczowych największą zawartością w składzie badanych olejów wyróżniał się kwas oleinowy, w ilości średnio 24%. Również Masłowski i wsp. [2013], prowadząc badania nad olejem lnianym deklarowali udział kwasów wielonienasyconych na poziomie ok. 62%. Dominowały kwasy: linolenowy (45,01%) oraz linolowy (16,79%). Wśród kwasów jednonienasyconych autorzy wskazali kwas oleinowy - 26,76%. Podobnie, jak w przypadku wszystkich opisanych analiz frakcję nasyconą stanowił kwas stearynowy i palmitynowy, o sumarycznej zawartości ponad 10%.

Analizowany w niniejszej pracy jako ostatni olej z makuchów lnianki rydzowej (tabela 7) charakteryzował się większym, niż wcześniej omówione oleje, udziałem kwasów jednonienasyconych. Składowymi tej frakcji był kwas oleinowy (17,58%) i eikozenowy (13,18%), o sumarycznej zawartości ok. 31%. Frakcja PUFA nie przekraczała natomiast 50% - kwas alfa- linolenowy stanowił 29,22%, zaś linolowy 20,43%. W składzie kwasów nasyconych identyfikowano kwas palmitynowy (5,72%), stearynowy (3,00%) i arachidonowy (2,8%). Odwołując się do wyników przedstawionych przez Masłowskiego i wsp. [2013] udział kwasów tłuszczowych oleju lniankowego jest następujący: kwasy PUFA - kwas linolenowy (37,76%) i kwas linolowy (20,15%); kwasy MUFA - kwas oleinowy (18,64%) i eikozenowy (10,17%); kwasy SFA - kwas palmitynowy (5,17%) oraz stearynowy (2,39%). Na rysunku 7 przedstawiono zbiorczy wykres przedstawiający procentowy udział kwasów jednonienasyconych,

wielonienasyconych oraz nasyconych dla olejów wyekstrahowanych z pięciu przebadanych makuchów.

Tabela 7. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z makuchów z lnianki rydzowej.

Kwas tłuszczowy	Rodzina kwasów	Liczba wiązań nienasyconych	Średni procentowy udział kwasów tłuszczowych [%]
Kwas alfa-linolenowy (ALA)	ω -3	18:3	29,22
Kwas linolowy (LA)	ω -6	18:2	20,43
Kwas oleinowy	ω -9	18:1	17,58
Kwas eikozenowy	ω -9	20:1	13,18
Kwas palmitynowy		16:0	5,72
Kwas stearynowy		18:0	3,00
Kwas arachidonowy		20:4	2,80
		pozostałe	8,07



Rysunek 7. Zbiorny wykres przedstawiający procentowy udział kwasów jednonienasyconych, wielonienasyconych i nasyconych dla każdego oleju wyekstrahowanego z makuchów.

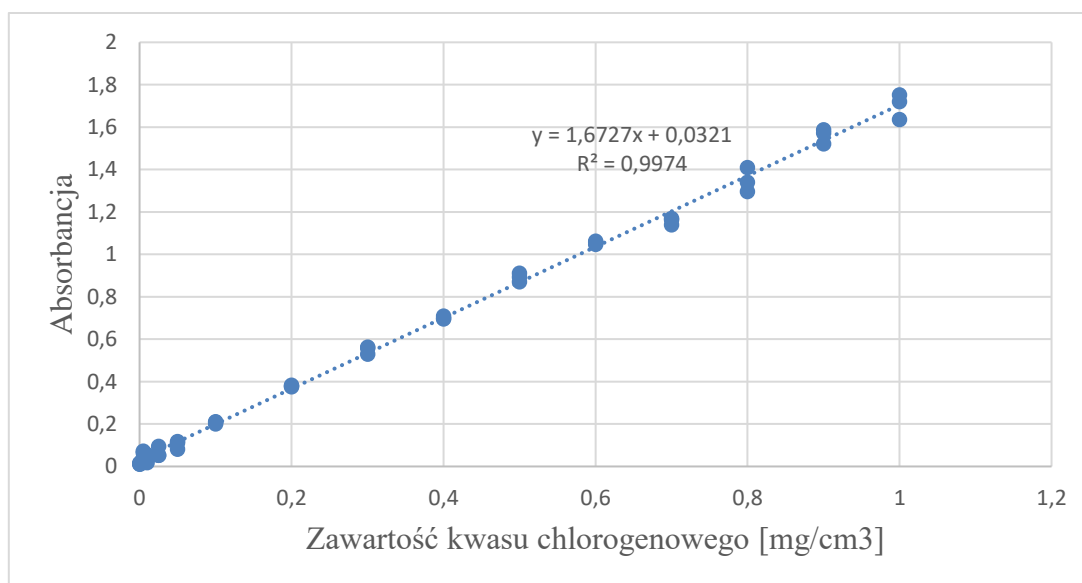
4.4. Zawartość polifenoli w analizowanych makuchach

Mając na celu potencjalne wykorzystanie makuchów jako źródła węgla we wglębnych hodowlach mikrobiologicznych, na ostatnim etapie charakterystyki

makuchów dokonano oznaczenia polifenoli.

Polifenole jako metabolity wtórne roślin stanowią podstawową barierę dla mikroflory uznanej za chorobotwórczą i patogenną (wirusy, grzyby, bakterie). Niektóre z nich mogą również hamować wzrost pożytecznych mikroorganizmów, między innymi bakterii kwasu mlekowego i szczepów probiotycznych. Jednak działanie bakteriostatyczne lub bakteriobójcze zależy zarówno od budowy polifenoli, jak i gatunku bakterii [Makarewicz i wsp. 2021].

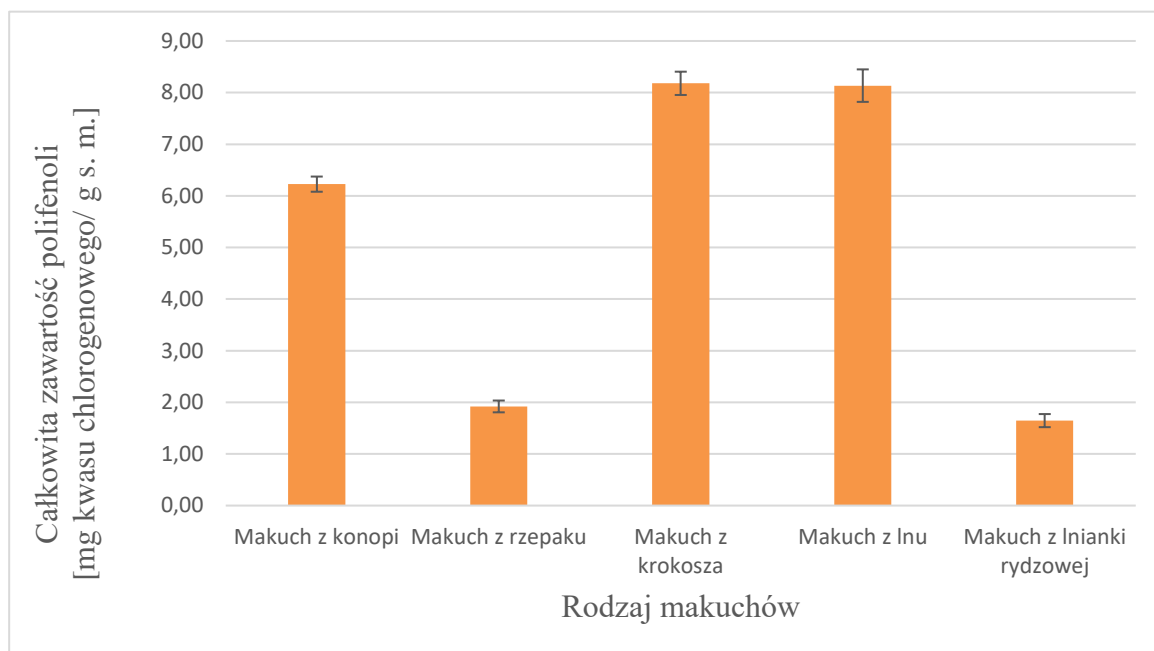
Na rysunku 8 przedstawiona została krzywa wzorcowa, na podstawie, której przeliczano zawartość polifenoli na zawartość kwasu chlorogenowego w g suchej masy.



Rys. 8. Krzywa wzorcowa kwasu chlorogenowego

Zawartość polifenoli w wybranych makuchach przedstawiono na rysunku nr 9. Zebrane dane pokazują, że ilość polifenoli zawierała się w przedziale od 1,65 do 8,18 mg kwasu chlorogenowego/g s.m., w zależności od surowca, z którego pochodził makuch. Najwyższą zawartością polifenoli charakteryzowały się makuchy z krokosza ($8,18 \pm 0,23$ mg kwasu chlorogenowego/g s.m.) i lnu ($8,13 \pm 0,31$ mg kwasu chlorogenowego/g s.m.). W makuchach konopnych zawartość polifenoli w przeliczeniu na kwas chlorogenowy była o ok. 24% niższa. Najmniejszą ilością związków fenolowych cechowały się makuchy z rzepaku- ($1,92 \pm 0,15$ mg kwasu chlorogenowego/ g s. m) oraz z lnianki rydzowej ($1,65 \pm 0,13$ mg kwasu chlorogenowego/g s.m.). Zawartość polifenoli w tych surowcach była o 77-80% mniejsza w stosunku do makuchów krokosza czy lnu. Ilość związków fenolowych w makuchach roślinnych, opisywana w literaturze jest różna i jak podają autorzy zależy od rodzaju rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji czy sposobu jej przeprowadzenia. Badania opublikowane przez Mińkowskiego i wsp. [2013] na temat

zawartości związków fenolowych w olejach tłoczonych ze zróżnicowanych surowców wykazały, iż największą ilością polifenoli cechował się olej konopny- 4,11 mg/100 g. Mniejsze ilości zawierał olej z lnianki (3,95 mg/100 g), zaś czterokrotnie mniejsze stężenie polifenoli oznaczano w oleju z lnu. Proporcje te nie były spójne z oznaczeniem związków fenolowych w makuchach badanych w ramach niniejszej pracy.



Rys. 9 Całkowita zawartość polifenoli w przeliczeniu na kwas chlorogenowy w wybranych makuchach

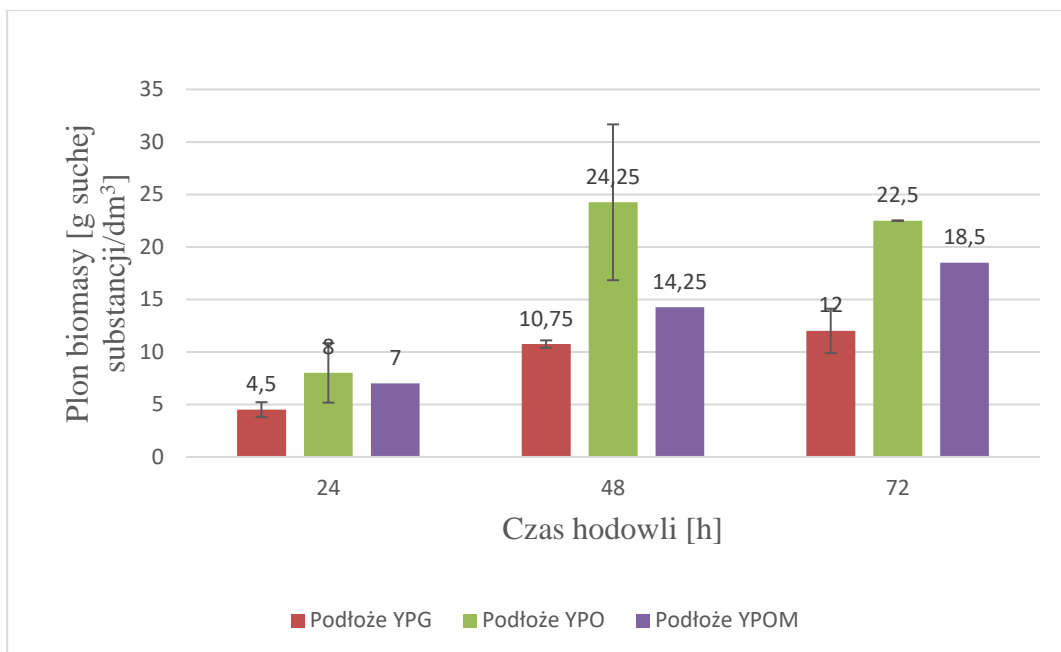
4.5. Ocena możliwości wykorzystania makuchów jako źródła węgla w hodowlach wglębnych drożdży *Yarrowia lipolytica*

Z uwagi na fakt, iż celem niniejszej pracy było określenie potencjalnych możliwości wykorzystania makuchów (jako źródła węgla) w hodowlach mikroorganizmów, po scharakteryzowaniu surowca rozpoczęto drugi etap badań. Polegał on na przeprowadzeniu hodowli wglębnej drożdży *Yarrowia lipolytica* z dodatkiem oleju wyekstrahowanego z poszczególnych makuchów i porównaniu wyników tej hodowli ze standardowymi podłożami YPG (ekstrakt, pepton, glukoza) oraz YPO (ekstrakt, pepton, oliwa z oliwek). W trakcie hodowli monitorowano dwa parametry – plon suchej masy drożdży oraz ich zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną.

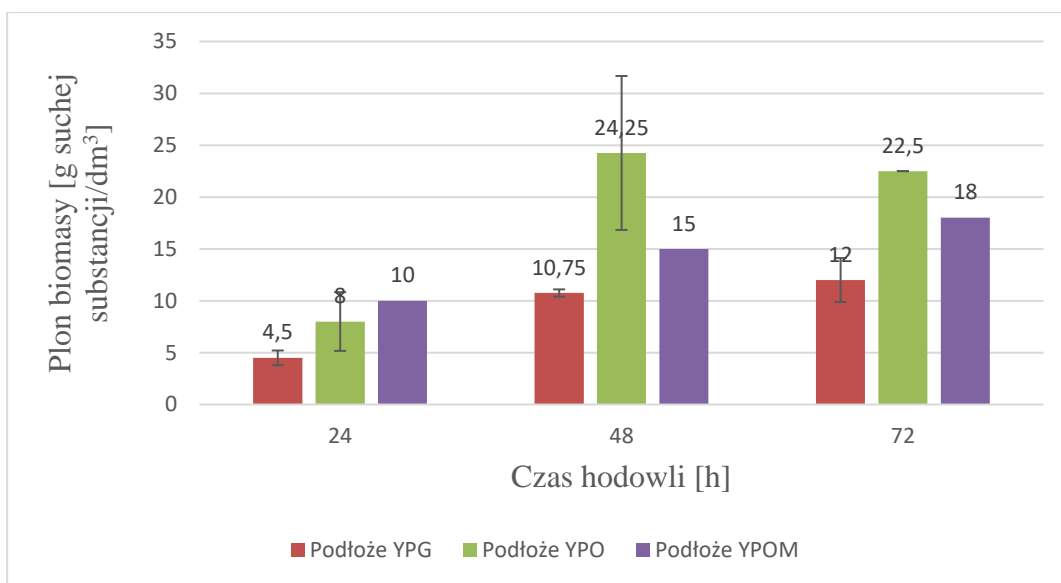
4.6. Oznaczenie plonu suchej masy komórek drożdży *Yarrowia lipolytica*

Jednym z parametrów wzrostu mikroorganizmów na danym podłożu jest poziom namnożenia komórek, przekładający się na plon biomasy. Wartość ta została oznaczona dla poszczególnych hodowli z zastosowaniem oleju wyekstrahowanego z makuchów i odniesiona do wyników uzyskiwanych na standardowym podłożu YPG (gdzie źródłem węgla była glukoza) oraz YPO (z oliwą z oliwek). W ciągu trzech dni podczas 72- godzinnej hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* pobierano próbki do oznaczeń, wykonując dwa powtórzenia. Wyniki niniejszych doświadczeń przedstawiono na wykresach 10-14, zestawiając za każdym razem plon biomasy z trzech hodowli przy zróżnicowanym źródle węgla.

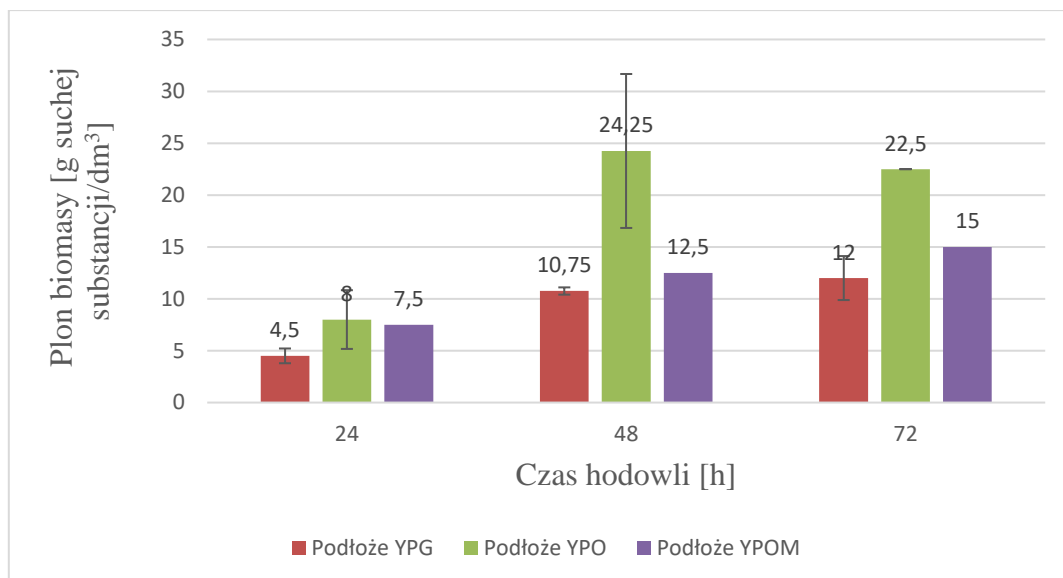
Na rysunku numer 10 przedstawiono dane dotyczące hodowli z dodatkiem oleju z makuchów konopi. Wyniki pokazują, iż olej z makuchów indukował wzrost komórek drożdży, bo w porównaniu ze standardowym podłożem YPG plon biomasy komórkowej, niezależnie od czasu hodowli był wyższy, średnio o $2,5 \text{ g/dm}^3$ (po pierwszej dobie hodowli) do $6,5 \text{ g/dm}^3$ (w trzeciej dobie hodowli). Dane plonu biomasy pokazują również, iż stosowanie cukrowego i lipidowego źródła węgla zmienia dynamikę wzrostu drożdży. O ile przy zastosowaniu glukozy w podłożu, faza wzrostu logarytmicznego trwa ok. 48 h, o tyle w przypadku podłoża z olejem z makuchów okres ten jest wydłużony, przyrost biomasy o ok. 4 g/dm^3 obserwowany jest jeszcze w 3 dobie hodowli. Porównując jednak dane z hodowli z dodatkiem oliwy z oliwek można zauważyć, iż olej makuchowy w znacznie mniejszym stopniu przyczynia się do przyrostu biomasy. Różnica w maksymalnym plonie biomasy komórkowej pomiędzy podłożem z oliwą z oliwek a olejem z makuchów konopnych wynosił ok. $5,75 \text{ g s.s./dm}^3$.



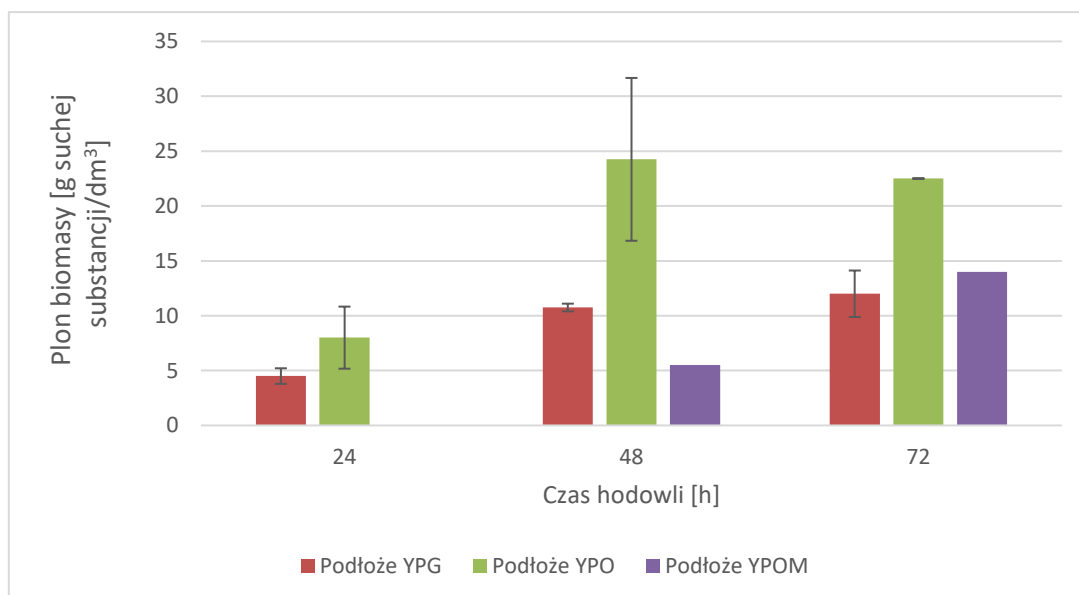
Rys. 10. Plon suchej masy komórkowej drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożu YPG, YPO oraz podłożu z olejem z makuchów konopnych.



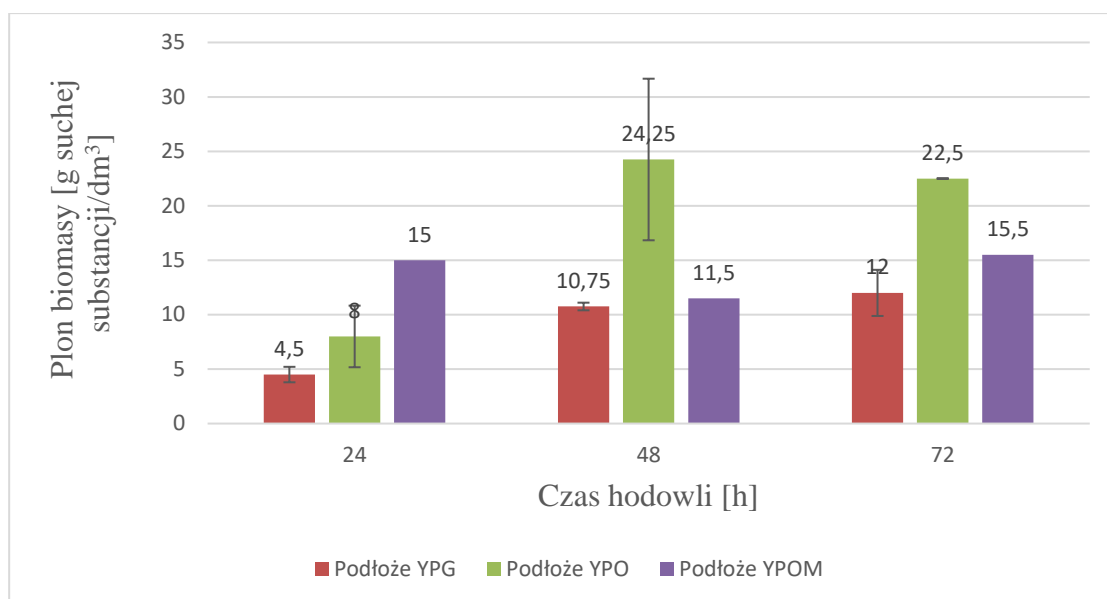
Rys. 11. Plon suchej masy komórkowej drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożu YPG, YPO oraz podłożu z olejem z makuchów rzepakowych.



Rys. 12. Plon suchej masy komórkowej drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożu YPG, YPO oraz podłożu z olejem z **makuchów z krokosza**.



Rys. 13. Plon suchej masy komórkowej drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożu YPG, YPO oraz podłożu z olejem z **makuchów z lnu**.

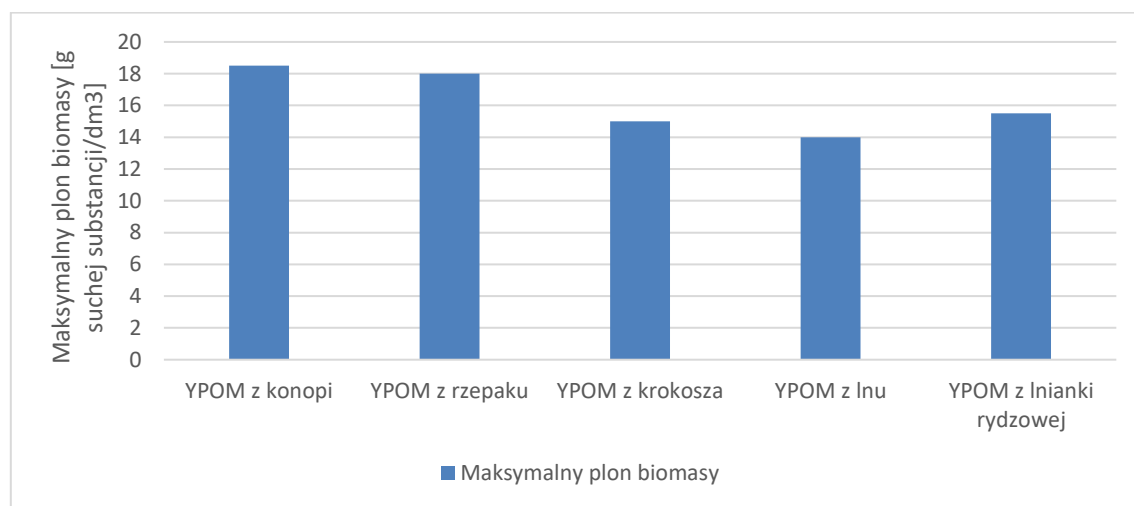


Rys. 14. Plon suchej masy komórkowej drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożu YPG, YPO oraz podłożu z olejem z makuchów z lnianki rydzowej.

Podobne tendencje i różnice w sposobie namnażania się komórek drożdży *Yarrowia* na trzech zróżnicowanych podłożach obserwowano również w przypadku pozostałych testowanych olejów z makuchów. Zarówno w hodowli z zastosowaniem oleju z rzepaku, krokosza jak i lnianki rydzowej jako lipidowego źródła węgla, plon suchej masy komórkowej był wyższy w porównaniu z cukrowym źródłem węgla (glukozą), od 25% do 38% (różnica dla maksymalnych wartości plonu biomasy, odpowiednio dla makuchów rzepakowych i z kokosza). W każdym jednak z analizowanych przypadków, oliwa z oliwek dawała najlepsze rezultaty. O oliwie z oliwek jako powszechnie stosowanym induktorze wzrostu mikroorganizmów i wykazywanej przez nie aktywności lipolitycznej pisze wielu autorów [Zarewúcka 2012]. Fabiszewska i wsp. [2015] na przykładzie modelowych badań wskazują, iż pochodzenie źródła węgla (cukry, lipidy) mają istotny wpływ na finalną wydajność plonu biomasy komórkowej mikroorganizmów.

Nieco odmienne wyniki obrazuje hodowla na bazie oleju ekstrahowanego z lnu. W porównaniu z pozostałymi olejami makuchowymi, maksymalny plon biomasy komórkowej w tej hodowli był najniższy, a kinetyka wzrostu komórek znacznie spowolniona. Po 48 h hodowli uzyskano plon na poziomie 5,5 g s.s./dm³ i był on niższy o ok. 52-62% w porównaniu z tym samym okresem hodowli na podłożach z olejem z pozostałych makuchów. Niezależnie jednak od rodzaju makuchów z których ekstrahowano olej, maksymalny plon biomasy komórkowej w każdej hodowli przypada

na 72 godzinę, w przeciwieństwie do oliwy z oliwek, dla której maksimum przypada na 48 h. Na rysunku 15, celem porównawczym, przedstawiono zbiorczo maksymalne plony suchej masy komórkowej drożdży *Yarrowia* po 72 h hodowli na podłożach wzbogacanych olejami ekstrahowanymi z pięciu testowanych makuchów. Wyniki pokazują, iż spośród przebadanych surowców, najlepsze rezultaty w kontekście ilości namnożonych komórek daje olej konopny i rzepakowy. W przypadku oleju z lnianki, lnu czy krokosza, ilość namnożonych komórek jest o ok. 3 g s.s./dm³ mniejsza.



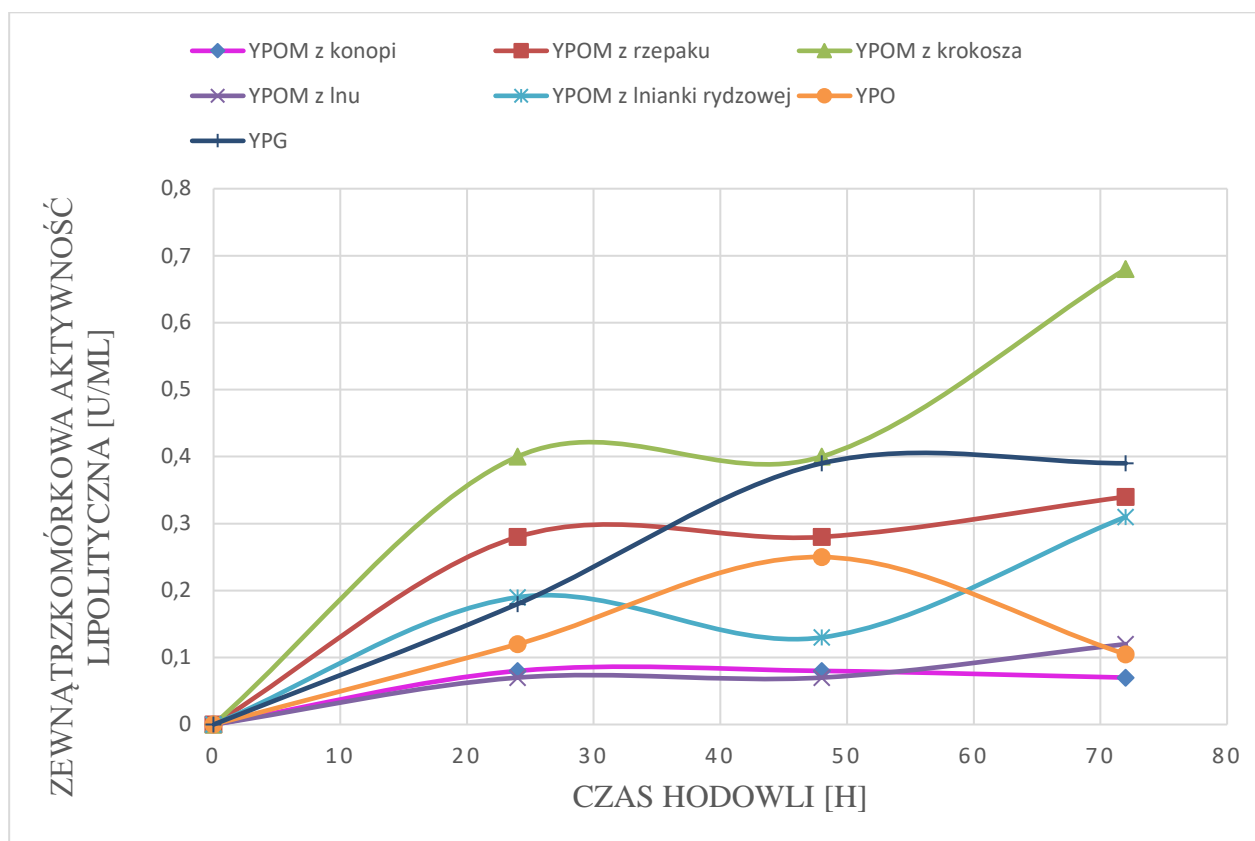
Rys. 15. Wykres maksymalnego plonu biomasy suchej substancji masy komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożach z dodatkiem olejów wyekstrahowanych z makuchów z roślin oleistych (konopie, rzepak, krokosz barwierski, lnu, lnianki rydzowej) po 72h hodowli

4.6. Oznaczenie zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej drożdży *Yarrowia lipolytica*

Potencjał drożdży *Yarrowia lipolytica* wiąże się z możliwością ich wykorzystania jako katalizatorów całokomórkowych w reakcjach biotransformacji i biosyntezy. Mając na względzie obniżanie kosztów procesu i coraz bardziej istotny aspekt ochrony środowiska, w ramach pracy zdecydowano się przeanalizować zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną drożdży, by wykazać czy zastosowany w podłożu olej z makuchów indukuje również sekrecję zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych.

W tym celu w ciągu trzydniowej hodowli w odstępach 24-godzinnych dokonywano pomiaru aktywności lipaz, bazując na spektrofotometrycznej metodzie pomiaru z zastosowaniem laurynianu p-nitrofenylu jako substratu. Aktywność katalityczną na podłożach z olejem makuchowym porównywano z aktywnością lipaz na standardowym podłożu YPG oraz YPO, z dodatkiem oliwy z oliwek.

Wyniki z wyżej wspomnianych doświadczeń zebrano na rysunku nr 16.



Rys. 16. Aktywność lipolityczna drożdży *Yarrowia lipolytica* na podłożach o zróżnicowanym źródle węgla (glukoza, oliwa z oliwek i oleje ekstrahowane z makuchów).

Powyższe dane pokazują, iż synteza zewnątrzkomórkowych lipaz istotnie zależy od rodzaju zastosowanego źródła węgla. Najwyższą aktywność lipolityczną, na poziomie ok. 0,68 U/mL, wykazywały drożdże rosnące na podłożu z dodatkiem oleju z krokosza (krzywa zielona). Wartość ta była 2,5-krotnie wyższa w stosunku do maksymalnej aktywności lipaz na podłożu YPO z dodatkiem oliwy z oliwek, uznawanej za jeden z najlepszych induktorów lipolitycznych [Stránský i wsp. 2007]. O blisko połowę niższą aktywnością w stosunku do oleju z krokosza cechowały się podłoża z olejem z makuchów rzepakowych i lnianki rydzowej. Maksymalna aktywność lipaz w tych podłożach wyniosła odpowiednio ok. 0,34 U/ml i 0,31 U/ml, w trzeciej dobie hodowli. Znikomą aktywność lipaz, niezależnie od czasu prowadzenia hodowli obserwowano w podłożach z olejem z makuchów konopnych i lnianych. W obu hodowlach aktywność enzymów była zbliżona i nie przekraczała 0,07 U/mL.

Zróżnicowany poziom aktywności lipaz na analizowanych podłożach z olejem

makuchowym może wynikać ze zróżnicowanego składu profilu kwasów tłuszczowych poszczególnych olejów (rysunek 7). Należy również pamiętać, iż sekrecja lipaz jest bezpośrednio związana z plonem biomasy komórkowej drożdży.

Analizując dane z rysunku 16 można wnioskować, iż synteza lipaz przez drożdże *Yarrowia lipolytica* może być indukowana przez wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Frakcja PUFA była bowiem największa i dominująca (ok. 74%) w oleju z krokosza. W olejach z lnianki rydzowej czy rzepaku znacznie więcej była frakcji MUFA (szczególnie w oleju rzepakowym, gdzie kwas oleinowy stanowił ok. 63%) i tu obserwowano blisko 2-krotnie niższą aktywność lipolityczną drożdży. Oleje z makuchów lnianych i konopnych miały zbliżony względem siebie skład profilu kwasów tłuszczowych, z przewagą frakcji PUFA, ale mimo to drożdże rosnące na podłożach z ich dodatkiem wykazywały znikomą aktywność lipolityczną. Być może związane jest to z zawartością polifenoli w tych makuchach. Ich poziom sięgał ok. 6-8 mg w przeliczeniu na kwas chlorogenowy w g s.m. W przypadku podłoża z olejem lnianki rydzowej wpływ na oznaczoną aktywność lipaz miał też niski plon biomasy komórkowej drożdży.

Wartym skomentowania jest również fakt, iż w podłożach porównawczych (z glukozą lub oliwą z oliwek) zaznacza się wyraźny trend pokazujący, iż oliwa z oliwek stymuluje znacząco wzrost komórek drożdży *Yarrowia*, ale nie ma istotnego wpływu na sekrecję lipaz zewnątrzkomórkowych. Natomiast zastosowanie cukru prostego jako źródła węgla sprawia, że ilość namnożonych komórek jest niższa, ale wykazują one znacznie większą aktywność lipolityczną. W podłożu z oliwą z oliwek, w ciągu 72-godzinnej hodowli zaobserwowano, iż już po 48 h aktywność enzymatyczna malała, w przeciwieństwie do pozostałych podłoży, w których po osiągnięciu maksimum aktywność pozostawała na niezmiennym poziomie bądź nadal wzrastała.

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski i stwierdzenia:

1. Makuchy firmy Oleovita zawierają od 14% do 21% frakcji tłuszczowej, której profil kwasu tłuszczowych jest zbliżony do profilu olejów tłoczonych z roślin oleistych.
2. Ilość wolnych kwasów tłuszczowych w makuchach, określana liczbą kwasową jest znacznie wyższa w stosunku do olejów tłoczonych z tych samych surowców, co może wynikać m.in. z warunków ich przechowywania.
3. Spośród pięciu przeanalizowanych makuchów: z rzepaku, lnu, lnianki rydzowej, konopi i krokosza, w kontekście hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* i wykazywanej przez nie aktywności lipolitycznej najlepsze rezultaty osiągnęto w obecności oleju z krokosza barwierskiego.
4. Analiza profilu kwasów tłuszczowych olejów ekstrahowanych z poszczególnych makuchów, zestawiona z zewnątrzkomórkową aktywnością lipolityczną drożdży *Yarrowia lipolytica* wskazuje na fakt, iż induktorami sekrecji lipaz są głównie wielonienasycone kwasy tłuszczowe (kwasy PUFA).
5. Aktywność lipaz w podłożu z dodatkiem oleju z krokosza bawarskiego jest ok. 2,5-krotnie wyższa w stosunku do maksymalnej aktywności lipaz na podłożu z dodatkiem oliwy z oliwek, uznawanej za jeden z najlepszych induktorów lipolitycznych, co potwierdza, iż makuchy otrzymane w wyniku tłoczenia oleju z nasion oleistych mogą być cennym surowcem w hodowlach mikrobiologicznych.
6. Wykorzystanie makuchów jako źródła węgla w podłożach do hodowli drobnoustrojów wpisuje się w aktualny trend waloryzacji odpadów i ochrony środowiska.

Wniosek aplikacyjny

Badania niniejszej pracy wskazują, iż makuchy stanowiące surowiec odpadowy w procesie tłoczenia olejów z roślin oleistych można z powodzeniem zagospodarować w hodowlach mikrobiologicznych nakierowanych na sekrecję lipaz i uzysk biomasy komórkowej. Pozwoli to na zmniejszenie kosztów (zastąpienie składników podłoża, w tym źródła węgla i azotu) i przyczyni się do ochrony środowiska. Szczególnie ciekawym wydaje się wykorzystanie makuchów w produkcji drożdży paszowych.

6. Spis literatury

1. Arnesen J.A., Borodina I. 2022: Engineering of *Yarrowia lipolytica* for terpenoid production. *Metabolic Engineering Communications*, 15, 1-9
2. Arrutia F., Binner E., Williams P., Waldron W.K. 2020: Oilseeds beyond oil: press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 88-102
3. Banaszekiewicz T. 2008: Wpływ makuchu rzepakowego i dodatku preparatu enzymatycznego ksylanazy na odkładanie białka, fosforu i energii brutto w ciele kurcząt brojlerów. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 29, nr 1, 141-148
4. Biuletyn 2022: Chruśliński T. 2022: Rynek roślin oleistych. Notowania za okres: 28.11– 04.12.2022 r., 3-8
5. Borys B., Borys A. 2006: Skład chemiczny i profil kwasów tłuszczowych makuchu rzepakowego przy tłoczeniu oleju metodą „na zimno” i „na gorąco”. *Przegląd Hodowlany*, 74, nr 7, 19- 22
6. Brzóska F., Hanczakowska E., Koreleski J., Strzetelski J., Świątkiewicz S. 2010: Pasze rzepakowe w żywieniu zwierząt. *Polskie Stowarzyszenie Producentów Oleju*, 7-24
7. Derewiaka D., Oleksiak P., Ciecierska M., Majewska E., Kowalska J., Wołosiak R. 2015: Analiza składu i jakości olejów lnianych tłoczonych na zimno. *Bromatologii i Chemii Toksykologicznej*, nr 3, 294 – 299
8. Ergonul P.G., Ozbek Z.A. 2020: Cold pressed camelina (*Camelina sativa* L.) seed oil. In: *Cold Pressed Oils: Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality and Applications* (ed. M.F. Ramadan), Academic Press, Egypt, 255-266
9. Fabiszewska A.U., Kotyrba D., Nowak D. 2015: Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Annals of Microbiology*, 65, 1495-1503
10. Frąckowiak P., Adamczyk F., Spychała W., Wojtkowiak R. 2010: Analiza możliwości wytłaczania oleju z lnianki siewnej (*Camelina sativa* L.) prasą ślimakową. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 55, nr 3, 71-74
11. García-Rebollar P., Cámara L., Lázaro R.P., Dapoza C., Pérez-Maldonado R., Mateos G.G. 2016: Influence of the origin of the beans on the chemical

- composition and nutritive value of commercial soybean meals. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 245-261
12. Hernacki B. 2007: Rzepak żółtonasienny – aktualny stan badań w skali światowej, problemy i zagadnienia. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 33, 127-150
 13. Hibner H., Ostaszewski R. 2011: Zastosowania enzymów z tkanek zwierzęcych w syntezie organicznej i biokatalizie. Część I. Hydrolazy, *Wiadomości Chemiczne. Polskie Towarzystwo Chemiczne*, Wrocław, 557-583
 14. Instrukcja 1: Ćwiczenie 2 Hydrolazy. Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych. *Enzymologia*, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych
 15. Internet 1: FAOSTAT 2022: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, dostęp w dniu 07.12.2022
 16. Irakli M., Tsaliki E., Kalivas A., Kleisaris F., Sarrou E., Cook C. 2019: Effect of genotype and growing year on the nutritional, phytochemical and antioxidant properties of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Antioxidants*, 8, nr 10, 1-15
 17. Jęczmionek Ł. 2010: Olej z lnianki siewnej (*Camelina sativa*): szansa rozwoju biopaliw II generacji? *Nafta-Gaz*, 66, 841-848
 18. Jhala A.J., Hall L.M 2010: Flax (*Linum usitatissimum* L.): current uses and future applications. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, nr 9, 4304-4312
 19. Juszczak P., Smolczyk A., Gil Z., Rywinska A., Rymowicz W. 2015: Produkcja drożdży paszowych *Yarrowia lipolytica* wzbogaconych w aminokwasy selenowe i witaminę B₁₂. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 54, 165-166
 20. Kachel-Jakubowska M., Kraszkiewicz A., Szpryngiel M., Niedziółka I. 2011: Możliwości wykorzystania odpadów poprodukcyjnych z rzepakowego na cele energetyczne. *Inżynieria Rolnicza*, 15, 61-68
 21. Kalembasa S., Adamiak E. 2010: Określenie składu chemicznego makuchu rzepakowego. *Acta Agrophysica*, 15, nr 2, 323-332

22. Kinal S., Bodkowski R., Patkowska-Sokoła B., Słupczyńska M., Gołuch A. 2003: Wpływ stosowania makuchu rzepakowego i lnianego w żywieniu kóz na skład kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka. *Rośliny Oleiste-Oilseed Crops*, 24, nr 2, 555-565
23. Knowles P.F. 1980: Safflower. In: *Hybridization of Crop Plants* (ed. R.F. Walter, H.H. Hadley), American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Wisconsin, 535-548
24. Kondratowicz-Pietruszka E. 2010: Charakterystyka profilu kwasów tłuszczowych wybranych olejów roślinnych. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie*, 841, 49- 63
25. Koniec A., Krzywonos M. 2018: Możliwości wykorzystania produktów ubocznych przemysłu olejarskiego do produkcji batonów. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 542, 58-66
26. Krzyczkowska J., Fabiszewska A. 2014: *Yarrowia lipolytica* – niekonwencjonalne drożdże w biotechnologii. *Postępy Mikrobiologii*, 54, nr 1, 33-43
27. Makarewicz M., Drożdż I., Tarko T., Duda-Chodak A. 2021: The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. *Antioxidants (Basel)*, 10, nr 188, 1-70
28. Markowska J., Polak E., Drabent A., Żak A. 2021: Konopie siewne *Cannabis sativa* L. – odmiany, właściwości, zastosowanie. *Nauka Technologia Jakość*, 28, 90-105
29. Masłowski A., Andrejko D., Ślaska-Grzywna B., Sagan A., Szmigielski M., Mazur J., Rydzak L., Sobczak P. 2013: Wpływ temperatury i czasu przechowywania na wybrane cechy jakościowe oleju rzepakowego, lnianego i lniankowego. *Inżynieria Rolnicza*, 17, 115- 124
30. Maszewska M., Wroniak M. 2014: Oleje jadalne-część 1. W: *Wybrane zagadnienia z technologii żywności pochodzenia roślinnego* (red. M. Mitek, K. Leszczyński), Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 156-167
31. Michniewicz P. 2020: Tradycyjne gatunki roślin uprawnych wykorzystywane do produkcji olejów, *Warmińsko-Mazurski Ośrodek Doradztwa Rolniczego z siedzibą w Olsztynie, Olsztyn*, 4-8
32. Milczarek A., Osek M., 2012: Zmiany liczby kwasowej i nadtlenkowej tłuszczu produktów rzepakowych przechowywanych w różnych warunkach

- bez i z dodatkiem przeciwutleniacza. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 33, nr 2, 298- 305
33. Mińkowski K., Zawada K., Ptasznik S., Kalinowski A. 2013: Wpływ związków fenolowych nasion na stabilność oksydacyjną i aktywność antyrodnikową wyłoczonych z nich olejów bogatych w PUFA n-3. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 20, nr 4, 123-129
34. Nicaud J.M. 2012: *Yarrowia lipolytica*, John Wiley & Sons, 29, 409- 418
35. Niedbalska J., Szołtysik M., Dąbrowska A., Chrzanowska J., 2012: Drożdże *Yarrowia lipolytica* i ich uzdolnienia do syntezy enzymów hydrolitycznych, (red. E. Jaworska), Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, 11, nr 4, 27- 34
36. Obiedzińska A., Waszkiewicz-Robak B., 2012: Oleje tłoczone na zimno jako żywność funkcjonalna, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 19, nr 1, 28-29
37. Osek M. 2000: Wpływ czasu i warunków przechowywania na zmiany zachodzące we frakcji lipidowej wybranych produktów rzepakowych. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 21, nr 1, 147-155
38. Park Y.K., Ledesma-Amaro R., 2022: What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends in Biotechnology*, 1-12
39. Pieszko C., Zaremba A. 2013: Zawartość związków fenolowych w ekstraktach z próbek materiału roślinnego, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 4, 434-439
40. Pohl M., Saanchez-Saanchez M., Mumme J. 2019: Anaerobic digestion of wheat straw and rape oil cake in a two-stage solid-state system. *Renewable Energy*, 141, 359- 367
41. Rutkowska J., Antoniewska A., Baranowski D., Rasińska E. 2016: Analiza profilu kwasów tłuszczowych wybranych olejów „nietypowych”. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 49, nr 3, 385 – 389
42. Rymowicz W., Kinal S. Wojtatowicz M., Musiał I., Bodarski R. 1997: Charakterystyka biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* wyprodukowanej na substratach tłuszczowych. *Biotechnologia*, 38, nr 3, 70-77
43. Sazońska B., 2010: Uprawa wybranych starych gatunków roślin uprawnych. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Radomiu, Radom, 9-11

44. Siger, A., Józefiak, M., Górnaś, P. 2017: Cold-pressed and hot-pressed rapeseed oil: the effects of roasting and seed moisture on the antioxidant activity, canolol, and tocopherol level. *Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria*, 16, nr 1, 69- 81
45. Silska G. 2016: Polska kolekcja lnu – źródłem nasion o terapeutycznym działaniu. W: *Zagadnienia Doradztwa Rolniczego* (red. Wiatrak A.P.), Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Poznaniu & Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, Poznań, 4, 73- 81
46. Smith J.R. 1996: *Safflower*. AOCS Publishing, Champaign, 1-15
47. Stránský K., Zarevúcka M., Kejík Z., Wimmer Z., Macková M., Demnerová K. 2007: Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp... *Biochemical Engineering Journal*, 34, 209-216
48. Szczepaniak G., Wojtatowicz M. 2011: Dobór szczepów *Yarrowia lipolytica* i *Debaryomyces hansenii* do szczepionki wspomagającej proces dojrzewania sera. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 18, nr 6, 192-203
49. Thevenieau, F., Nicaud, J.M., Gaillardin, C. 2009: Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. In: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (ed. T. Satyanarayana, G. Kunze), Springer, Dordrecht, 589-613
50. Trindade J.R., Freire M.G., Amaral P.F.F., Coelho M.A.Z., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M. 2008: Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 324, nr 1-3, 149-154
51. Wilk M. 2021: Badania nad zastosowaniem nowych właściwości katalitycznych wybranych hydrolaz (rozprawa doktorska). Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, 25- 30
52. Wirkowska-Wojdyła M., Bryś J., Ostrowska-Ligęza E., Górská A., Chmiel M., Słowiński M., Piekarska J. 2019: Quality and oxidative stability of model meat batters as affected by interesterified fat. *International Journal of Food Properties*, 22, nr 1, 607-617
53. Zając T., Oleksy A., Kulig B., Klimek A. 2010: Uwarunkowania plonowania formy oleistej lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) oraz jej znaczenie

żywnościowe i lecznicze. *Acta Scientiarum Polonorum - Agricultura*, 9, nr 2, 47-63

54. Zarevúcka M. 2012: Olive oil as inductor of microbial lipase. In: *Olive oil- Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions* (ed. D. Boskou), InTech Europe, Rijeka, 457-471

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW w tym w Archiwum Prac Dyplomowych SGGW

.....
(czytelny podpis autora pracy)