

## **Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych**

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych. Wynalazek znajduje zastosowanie w przemyśle rolno-spożywczym i dotyczy solanek czyli roztworów chlorku sodu i niekiedy także innych soli nieorganicznych, wykorzystywanych w procesach technologicznych w szczególności w zakładach przetwórstwa ryb, zakładach mięsnych, mleczarskich i innych z branży spożywczej, w tym w sposób szczególny do otrzymywania produktów rybnych w czasie solankowania ryb.

Znany stan techniki stanowią dokumenty literaturowe przedstawione poniżej. Drożdże olejogenne wykazują zdolność do magazynowania tłuszczu w komórkach w postaci triacylogliceroli, która jest wtórną aktywnością anaboliczną komórek. Tłuszcze zapasowe w komórkach drobnoustrojów syntezowane w ilości minimum 20% suchej masy nazywamy olejem mikrobiologicznym. Biosynteza tłuszczów zachodzi, gdy w podłożu hodowlanym zostaną wyczerpane składniki odżywcze. Co istotne, istnieją doniesienia, że drobnoustroje olejogenne m.in. z rodzajów *Cryptococcus*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula* i *Yarrowia* są zdolne do kumulowania lipidów także w podłożach z odpadowymi źródłami węgla takimi jak glicerol, melasa, serwatka, oleje posmażalnicze i inne oleje odpadowe [European Journal of Lipid Science and Technology 2011, 113, 1031-1051]. Przykładowo, modelowy gatunek drożdży olejogennych - *Y. lipolytica* hodowano w podłożu zawierającym odpadowy olej po wędzeniu ryb jako źródło węgla, obserwując ich intensywny wzrost przy jednoczesnej kumulacji lipidów w ilości do 22,7% (m/m) [Foods 2021, 10(2), 436-451]. W publikacji Bioresource Technology, 207, 245, 274-282 opisano możliwość zastosowania odbiałzonej serwatki po procesie tworzenia skrzepu serowego w hodowli drożdży *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, łącznie z hydrolizatem moszczu otrzymanym z frakcjonowanego wina. Tak hodowane drożdże kumulowały 49,6% (m/m) oleju mikrobiologicznego. Z danych literaturowych można pozyskać wiele innych podobnych przykładów [British Biotechnology Journal 2014, 4(4), 418-481]. Proces syntezy metabolitów oraz ilość uzyskanej biomasy w hodowli drobnoustrojów zależy od rodzaju oraz dostępności źródła węgla oraz azotu w podłożu hodowlanym. W publikacji [Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego 2014, 2, 28-33] opisano doświadczenia, w których zastosowano produkty odpadowe z przemysłu rybnego w

ilości 2%, takie jak odpadowe oleje po wędzeniu ryb i szlam oraz solankę, jako źródło węgla i składników odżywczych w hodowli drożdży *Y. lipolytica*. Dodatkowo podłoża wzbogacane były ekstraktem drożdżowym oraz peptonem, które stanowiły źródło azotu, mikroelementów oraz makroelementów. Wykazano wzrost drożdży we wszystkich hodowlach, natomiast największą liczbą komórek charakteryzowały się podłoża z odpadowymi olejami po wędzeniu ryb. Najniższy plon uzyskano w hodowli z solanką 6,75 g s.s./dm<sup>3</sup>, co świadczy o tym, że solanka nie stanowi źródła węgla, a wzrost drożdży w tym podłożu był możliwy dzięki obecności peptonu oraz ekstraktu drożdżowego. Co ważne, niektóre mikroorganizmy, w tym bakterie halofilne czy np. drożdże z gatunku *Y. lipolytica* tolerują dość wysokie zasolenie w podłożu hodowlanym, wspomniany gatunek drożdży nawet do kilkunastu procent [Critical Reviews in Microbiology 2014, 40(3), 187-206]. Opisane zostały metody detoksykacji z fenolu płynnych odpadów przemysłu chemicznego przez bakterie halofilne, w których stężenie soli wynosiło 15% [Water Environmental Research 1994, 66, 230-235]. Odpadowa solanka pochodząca z przemysłu rybnego została zaproponowana jako wartościowy płynny nawóz dla roślin [Sustainability 2017, 9, 1062-1088]. W doniesieniu [Frontiers in Microbiology March 2019 v.10, art. 547, doi: 10.3389/fmicb.2019.00547] znajduje się opis eksperymentu, w którym uzyskano biomasę drożdży *Y. lipolytica* o zawartości 21% lipidów w suchej masie, którą hodowano w podłożu przygotowanym na bazie 3,6% roztworu chlorku sodu imitującego wodę morskiej. Opisano także możliwość wzrostu komórek z rodzaju *Yarrowia* w podłożu zawierającym wodę odpadową po myciu tusz tuńczyka przy jednoczesnej syntezie lipidów wewnątrzkomórkowych w ilości 300 mg/g s.s. [Environmental Science and Pollution Research 2020, 25, 1545–1554].

Zagospodarowanie i/lub utylizacja solanki odpadowej stanowi istotny problem w stanie techniki. Produkty uboczne przemysłu spożywczego, w tym przemysłu rybnego, w procesie technologicznym są odrzucane i nie są przeznaczone do spożycia, dlatego nie można nazywać ich żywnością. Resztki ryb jak skrawki skór, ości, głowy i ogony znajdują zastosowanie w produkcji m.in. pasz (kiszzonek i mączek rybnych) lub biogazu. Mimo to nadal znaczna część odpadów przemysłu rybnego nie jest wykorzystana w procesach przetwórczych, stanowiąc odpad konieczny do utylizacji [Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 2018, 1(114), 5-16]. Do uciążliwych odpadów zalicza się także solankę, dla której największym wyzwaniem w oczyszczaniu stanowią chlorki (m.in. NaCl), ponieważ ich usuwanie na drodze osmozy

lub odparowania jest nieekonomiczne [Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego 2010, 1, 9-11]. W dotychczasowym stanie techniki nieznane są doniesienia wskazujące na zastosowanie solanki z przemysłu spożywczego w przygotowaniu podłoży mikrobiologicznych dla hodowli, których celem miałyby być synteza tłuszczów zapasowych i w których udział solanki mógłby zastąpić w części strumień wody wodociągowej niezbędnej do przygotowania pożywki.

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie metody ponownego wykorzystania strumienia ścieków poprodukcyjnych w postaci odpadowej solanki, jak również zmniejszenia ilości zużywanej wody w innym procesie. Kolejnym celem według wynalazku było wytworzenie oleju mikrobiologicznego, który może znaleźć zastosowanie w żywieniu zwierząt, ludzi lub jako substrat w produkcji paliwa typu biodiesel. Utylizacja odpadów przemysłowych z użyciem mikroorganizmów jest obiecującą metodą, ponieważ oprócz zagospodarowania odpadów w hodowli drobnoustrojów pozyskuje się jednocześnie ich cenne metabolity, często wykorzystywane w przemyśle spożywczym m.in. enzymy, składniki odżywcze oraz dodatki funkcjonalne do żywności. Celem wynalazku było również zredukowanie wykorzystania wody wodociągowej w celach hodowlanych drożdży nawet do 70%.

Nieoczekiwanie wyżej wymienione problemy techniczne zostały rozwiązane dzięki niniejszemu wynalazkowi.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) przygotowuje się podłoże inokulacyjne zawierające glukozę, pepton i ekstrakt drożdżowy z gatunku *Y. lipolytica* i prowadzi się hodowlę wytrąsaną w czasie od 16 do 24 godzin,
- b) przygotowuje się podłoże właściwe zawierające solankę odpadową, lipidowe źródło węgla, nieorganiczne sole mineralne i emulgator,
- c) podłoże z etapu b) zaszczepia się hodowlą inokulacyjną z etapu a) w ilości 1,5 cm<sup>3</sup>, a następnie prowadzi się hodowlę właściwą w bioreaktorze w zakresie temperatur 26-30°C, a korzystnie w 28°C, mieszając zawartość bioreaktora, przy czym w trakcie mieszania hodowlę natlenia się sprężonym powietrzem z szybkością napowietrzania 1,0–2,0 dm<sup>3</sup>/min/dm<sup>3</sup>, przy czym natlenianie kontroluje się za pomocą elektrody tlenowej i reguluje się za pomocą zmiennych obrotów mieszadła w zakresie 200-600 rpm tak, aby

poziom nasycenia tlenem podłoża wynosił co najmniej 30% w stosunku do początkowego poziomu natlenienia,

d) hodowlę z etapu c) prowadzi w fazie stacjonarnej wzrostu, po czym biomasę drożdży oddziela się od płynu pohodowlanego poprzez odwirowanie,

5 e) biomasę drożdży z etapu d) przemywa się co najmniej dwukrotnie roztworem soli fizjologicznej o objętości równej połowie płynu pohodowlanego, a następnie odwirowuje się osad biomasy,

f) biomasę z etapu e) poddaje się procesowi suszenia w czasie 16-24 h,

10 g) suchą biomasę z etapu f) rozciera się z piaskiem, a następnie prowadzi się jej ekstrakcję rozpuszczalnikową z wykorzystaniem niepolarnego rozpuszczalnika, po czym oddestylowuje się rozpuszczalnik.

Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że podłoże inokulacyjne zawiera glukozę w ilości 20 g/dm<sup>3</sup>, pepton w ilości 20 g/dm<sup>3</sup> i ekstrakt drożdżowy z gatunku *Y. lipolytica* w ilości 10 g/dm<sup>3</sup>.

15 Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że lipidowe źródło węgla stanowi posmażalny olej rzepakowy w ilości 50 g/dm<sup>3</sup>.

Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że nieorganiczne sole mineralne stanowią (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w ilości 2,5 g/dm<sup>3</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> w ilości 7,0 g/dm<sup>3</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> w ilości 2,5 g/dm<sup>3</sup>, MgSO<sub>4</sub> w ilości 1,5 g/dm<sup>3</sup>, CaCl<sub>2</sub> w ilości 0,15 g/dm<sup>3</sup>, FeSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O w ilości 20 0,16 g/dm<sup>3</sup>, ZnSO<sub>4</sub> w ilości 0,02 g/dm<sup>3</sup> i MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O w ilości 0,08 g/dm<sup>3</sup>.

Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że emulgator stanowi Tween 80 w ilości 0,75 g/dm<sup>3</sup>.

Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że do hodowli mikroorganizmów olejogennych wykorzystuje się solankę odpadową o stężeniu chlorku sodu 2,5-35,0%.

25 Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że stężenie chlorku sodu w końcowym podłożu hodowlanym wynosi 0,1-20,0%.

Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że ekstrakcję prowadzi się w czasie nie krótszym niż 1,5 h.

30 Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że solanka odpadowa posiada pH w zakresie od 5,0 - 8,0.

Korzystnie, sposób charakteryzuje się tym, że solanka odpadowa posiada korzystnie pH 6,4.

Szczególnie korzystnym jest zastąpienie części wody niezbędnej do przygotowania podłoża hodowlanych solanką odpadową, która stanowi uciążliwe ścieki generowane przez zakład przemysłowy. Tym samym strumień ścieków może zostać zawrócony i ponownie wykorzystany w innym procesie – hodowli mikroorganizmów, podczas którego syntezowany jest wartościowy produkt - olej mikrobiologiczny. Rozwiązanie ogranicza zużycie wody, wpisując się jednocześnie w ideę gospodarki o obiegu zamkniętym (ang. circular economy).

#### Przykład 1

10 Hodowle prowadzono w bioreaktorze laboratoryjnym dzikich, niemodyfikowanych drożdży *Y. lipolytica* w podłożach, w których część wody niezbędnej do przygotowania podłoża zastąpiono solanką odpadową pochodzącą z zakładów przetwórstwa ryb.

15 Sposób produkcji biomasy drożdży olejogennych bogatej w tłuszcze wewnątrzkomórkowe:

Hodowlę inokulacyjną drożdży olejogennych z gatunku *Y. lipolytica*, tolerujących wysokie zasolenie podłoża, przygotowuje się w podłożu YPG (Y-ang. yeast extract (ekstrakt drożdżowy)/P-pepton/G-glukoza) zawierającym 20 g/dm<sup>3</sup> glukozy, 20 g/dm<sup>3</sup> peptonu i 10 g/dm<sup>3</sup> ekstraktu drożdżowego. Hodowlę prowadzi się w czasie 16-24 h jako hodowlę wytrąsaną.

20 Podłoże właściwe do pozyskiwania biomasy drożdży przygotowuje się na bazie solanki odpadowej pochodzącej z zakładu produkcyjnego, którą miesza się z wodą najkorzystniej w stosunku objętościowym 7:3. Solanka odpadowa charakteryzuje się pH w zakresie od 5,0 - 8,0, niską zawartością tłuszczów (3,0 % m/o; %m/o – procent wagowo-objętościowy) oraz wysoką zawartością chlorku sodu (17,6 % m/o), przy czym solanka odpadowa może zawierać chlorek sodu o stężeniu 2,5-35,0%. Do rozcieńczonej solanki odpadowej w ilości 1 dm<sup>3</sup> dodaje się lipidowe źródło węgla w postaci posmażalniczego oleju rzepakowego w ilości 50 g/dm<sup>3</sup>, a następnie dodaje się nieorganiczne sole mineralne takie jak: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 g/dm<sup>3</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,0 g/dm<sup>3</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/dm<sup>3</sup>, MgSO<sub>4</sub> 1,5 g/dm<sup>3</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,15 g/dm<sup>3</sup>, FeSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0,16 g/dm<sup>3</sup>, ZnSO<sub>4</sub> 0,02 g/dm<sup>3</sup> i MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 0,08 g/dm<sup>3</sup>, a następnie dodaje się emulgator Tween 80 w ilości 0,75 g/dm<sup>3</sup>. Podłoże przygotowane z wykorzystaniem solanki o pH 6,4 cechowała zawartość chlorku sodu równa 5,7% m/o oraz pH 5,5, przy czym

stężenie chlorku sodu w końcowym podłożu hodowlanym może wynosić 0,1-20,0% w zależności od zawartości tej soli w wyjściowej solance.

Podłoże właściwe szczepi się roztworem hodowli inokulacyjnej w ilości 1,5 cm<sup>3</sup>. Hodowlę okresową prowadzi się w bioreaktorze w objętości roboczej podłoża 4 dm<sup>3</sup> w temperaturze 26-30°C, korzystnie w 28°C przy obrotach mieszadła promieniowego z 6 łopatkami. W trakcie mieszania hodowlę natlenia się sprężonym powietrzem, a szybkość napowietrzania podłoża wynosi 1,0–2,0 dm<sup>3</sup>/min/dm<sup>3</sup>. Natlenianie kontroluje się za pomocą elektrody tlenowej (pomiar odbywa się w czasie rzeczywistym w trakcie trwania całej hodowli) i reguluje się za pomocą zmiennych obrotów mieszadła w zakresie 200-600 rpm tak, aby poziom nasycenia tlenem podłoża nie spadł w czasie hodowli poniżej 30% w stosunku do początkowego poziomu natlenienia. W kolejnym etapie hodowlę przerywa się w fazie stacjonarnej wzrostu, najkorzystniej między 60 a 70 h hodowli, a biomasę drożdży oddziela się od płynu pohodowlanego w wirówce szybkoobrotowej w czasie 10 minut przy 8000 rpm.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki dotyczące zmian plonu biomasy w czasie hodowli oraz zawartości tłuszczów wewnątrzkomórkowych w odniesieniu do 1 grama suchej substancji. Najwyższy plon biomasy drożdży uzyskano w fazie wzrostu stacjonarnego po 48 h hodowli (13,44 g s.s./dm<sup>3</sup>), zaś najwyższą zawartością tłuszczów cechowała się biomasa pochodząca z 64 h hodowli (34% w suchej masie komórki). W wyniku hodowli zaoszczędzono 30% wody niezbędnej do przygotowania podłoża hodowlanego, zastępując ją odpadową solanką, uzyskując biomasę komórek drożdży o wysokiej zawartości oleju mikrobiologicznego.

Tabela 1. Plon biomasy drożdży z gatunku *Y. lipolytica* oraz zawartość tłuszczów wewnątrzkomórkowych w czasie hodowli okresowej w podłożu zawierającym 30% solanki odpadowej.

<b>Faza wzrostu komórek drożdży</b>	<b>Godzina hodowli [h]</b>	<b>Plon biomasy drożdży [g s.s./dm<sup>3</sup>]</b>	<b>Zawartość tłuszczów wewnątrzkomórkowych [g / g s.s.]</b>
<b>Faza wzrostu logarytmicznego</b>	16	1,89	n.a.
	20	1,89	n.a.
	24	4,44	n.a.
<b>Faza stacjonarna wzrostu</b>	40	8,33	0.26
	48	13,44	0.24
	64	11,56	0.34

n.a. – nie analizowano

## Przykład 2

Otrzymywanie oleju mikrobiologicznego z namnożonej biomasy:

5 Biomasa otrzymaną według sposobu opisanego w przykładzie 1 przemywa się dwukrotnie roztworem soli fizjologicznej w objętości równej połowie płynu  
pohodowlanego i ponownie wiruje w czasie 10 minut przy 10 000 rpm. Tak otrzymaną  
biomasę poddaje się procesowi suszenia w temperaturze 90°C w czasie 16-24 h do  
10 momentu osiągnięcia suchej masy, a następnie suchą biomasę komórek w ilości od  
10 do 50 g rozciera się z piaskiem i umieszcza w gilzie z bibuły filtracyjnej. Olej  
ekstrahuje się metodą ługowania w aparacie Soxhleta, przy czym jako rozpuszczalnik  
stosuje się heksan, przy czym na jednorazową porcję o masie 35-40 g mokrej biomasy  
wykorzystuje się rozpuszczalnik w ilości 150 cm<sup>3</sup>. Proces ekstrakcji prowadzi się  
przynajmniej 1,5 h. Po etapie ekstrakcji olej mikrobiologiczny oddziela się od  
15 rozpuszczalnika metodą destylacji pod obniżonym ciśnieniem w wyparce próżniowej.  
W kolejnym etapie otrzymane lipidy poddawane są hydrolizie, a uwolnione wolne  
kwasy tłuszczowe poddaje się derywatywacji do estrów metylowych przy użyciu 1 M  
metanolanu sodu oraz 14-procentowego BF<sub>3</sub> w metanolu i analizuje się techniką  
20 chromatografii gazowej. Stosowana jest kolumna kapilarna o długości 30 m, średnicy  
wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu fazy stacjonarnej 0,25 μm. Jako gaz nośny  
stosowany jest hel. Przepływ gazu nośnego wynosi 1,2 cm<sup>3</sup>/min. Poszczególne kwasy  
tłuszczowe identyfikuje się na podstawie czasów retencji, porównując je z kwasami  
wzorcowymi.

W tabeli 2 przedstawiono skład kwasów tłuszczowych lipidów  
25 wewnątrzkomórkowych wyekstrahowanych z komórek drożdży *Y. lipolytica*  
namnażanych w sposób opisany w przykładzie 1 w podłożu, w którym 30% wody  
zastąpiono solanką odpadową. Olej mikrobiologiczny był bogaty w jednonienasycony  
kwas oleinowy (58,13%), zawierał także wielonienasycone kwasy linolowy i linolenowy  
(sumarycznie 16,25%).

30

Tabela 2. Skład kwasów tłuszczowych zawartych w oleju mikrobiologicznym  
ekstrahowanym z komórek drożdży *Y. lipolytica* namnożonych w podłożu z odpadową  
solanką [zawartość procentowa w stosunku do zawartości wszystkich kwasów  
tłuszczowych, %].

Kwas tłuszczowy			Zawartość kwasów w oleju mikrobiologicznym pozyskanym w podłożu z odpadową solanką
Symbol	Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	
C14:0	tetradekanowy	mirystynowy	0,41
C16:0	heksadekanowy	palmitynowy	4,51
C18:0	oktadekanowy	stearynowy	8,74
C18:1	oktadecenowy	oleinowy	58,13
C18:2	oktadekadienowy	linolowy	12,31
C18:3	oktadekatrienowy	linolenowy	3,94
C20:0	eikozanowy	arachidowy	2,76
C22:0	dokozanowy	behenowy	2,76
Pozostałe			6,44
MUFA (ang. monounsaturated fatty acids, jednonienasycone kwasy tłuszczowe)			58,13
PUFA (ang. polyunsaturated fatty acids, wielonienasycone kwasy tłuszczowe)			16,25