

Anna Maria Kot<sup>1\*</sup>, Stanisław Błażej<sup>1</sup>, Agnieszka Kurcz<sup>1</sup>, Iwona Gientka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Wpłynęło w lutym 2015 r.

1. Wstęp. 2. Mikroorganizmy olejogenne. 3. Enzymatyczne drogi syntezy tłuszczu w komórkach drożdży. 3.1. Biosynteza tłuszczu *de novo*. 3.2. Biosynteza tłuszczu *ex novo*. 4. Czynniki wpływające na proces biosyntezy tłuszczu. 5. Próby doskonalenia genetycznego drożdży olejogennych. 6. Ekstrakcja tłuszczu z komórek drożdży. 7. Możliwości przemysłowego zastosowania tłuszczu mikrobiologicznego. 8. Podsumowanie

#### Yeast as a potential source of microbial fat

**Abstract:** The yeast which can produce more than 20% lipids in their dry matter are called oleaginous and belong mainly to the genera *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Lipomyces*. The synthesis and storage of fat in yeast cells can be achieved via two pathways. In the first method – *de novo*, the acetyl-CoA and malonyl-CoA molecules are substrates of the lipid for the synthesis, while in the *ex novo* method, the hydrophobic compounds present in the environment are utilized. The process of lipid biosynthesis in yeast cells is affected by environmental factors such as carbon and nitrogen source in the medium, the C/N molar ratio, pH, temperature and the time of the cultivation. Microbial synthesis as the type of fat production process has many advantages, since it is insusceptible to weather conditions and the season of the year. Moreover, yeast show a rapid growth rate, which significantly shortens the production cycle. The main drawback of the industrial SCO production is low fat yield per unit of culture medium, which increases the total cost of the project. Microbiological fat synthesized by yeast might be used as a substitute for vegetable oils in human nutrition or as a substrate for the production of biodiesel.

1. Introduction. 2. Oleaginous microorganisms. 3. Enzymatic synthesis pathways of fat in yeast cells. 3.1. De novo lipid accumulation. 3.2. Ex novo lipid accumulation. 4. Factors affecting the biosynthesis of fat. 5. Attempts to genetically improve oleaginous yeast. 6. Extraction of fat from yeast cells. 7. Industrial applicability of microbial fat. 8. Conclusions

**Słowa kluczowe:** mikrobiologiczna synteza tłuszczu, mikroorganizmy olejogenne, SCO (Single Cell Oil)

**Keywords:** microbial synthesis of fat, oleaginous microorganisms, SCO (Single Cell Oil)

## 1. Wstęp

Pomysł wykorzystania drobnoustrojów do produkcji tłuszczu zrodził się w Niemczech w okresie międzywojennym. Naukowcy zaczęli prowadzić badania nad uzyskaniem zamienników tłuszczów roślinnych, których brakowało wówczas na rynku [9]. Jak podaje Ratledge pierwsze wzmianki w literaturze pochodzą z 1922 roku i dotyczyły produkcji tłuszczu mikrobiologicznego przez drożdże *Endomyces vernalis* [40]. Niestety badania te były skazane na porażkę, ze względu na brak sprzętu umożliwiającego prowadzenie procesu w urządzeniach na skalę przemysłową oraz niedostateczną wiedzę z zakresu modyfikacji genetycznych [9]. Zainteresowanie naukowców pozyskiwaniem tłuszczu mikrobiologicznego znacznie wzrosło w ciągu ostatnich 30 lat. Dokonano olbrzymich postępów w identyfikacji mikroorganizmów olejogennych oraz mechanizmów syntezy tłuszczu. Mikroorganizmy olejogenne definiowane są jako zdolne do wytwarzania i akumulacji powyżej 20% tłuszczu w suchej substancji komórkowej. W literaturze lipidy pochodzenia mikrobiologicznego

określane są skrótem SCO (Single Cell Oil). Termin ten został wprowadzony w 1974 roku przez Ratledge'a analogicznie do nazwy białka jednokomórkowców – SCP (Single Cell Protein) [9, 39].

## 2. Mikroorganizmy olejogenne

Wszystkie żywe organizmy wytwarzają substancje lipidowe, których zawartość w komórce nie przekracza zwykle 5% w suchej substancji. Związki te są niezbędne do budowy i prawidłowego funkcjonowania błon komórkowych [26]. Mikroorganizmy olejogenne, w specyficznych warunkach akumulują lipidy, które odkładane są w tzw. ciałkach lipidowych (ang. *lipid bodies* – LB) [21]. Tłuszcz występuje głównie w formie triacylogliceroli (ok. 80%) [38], a w mniejszych ilościach znajdują się także wolne kwasy tłuszczowe, monoacyloglicerole, diacyloglicerole, sterole, fosfolipidy i glikolipidy [35]. Budowa ciałek lipidowych jest taka sama u wszystkich organizmów eukariotycznych [18]. Hydrofobowy rdzeń otacza warstwa fosfolipi-

\* Autor korespondencyjny: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159C; tel. (022) 59 37 663; e-mail: anna\_kot@sggw.pl

Tabela I  
Przykładowe zawartości tłuszczu w biomacie wybranych gatunków drożdży

Mikroorganizm	Źródło węgla w podłożu	Zawartość tłuszczu w suchej substancji komórkowej (% w/w)	Piśmiennictwo
<i>Cryptococcus albidus</i>	Glukoza	27,80	20
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicerol	25,00	33
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glukoza + ksyloza	61,40	58
<i>Pichia guilliermondii</i>	Hydrolizat inuliny	60,60	52
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glukoza	60,69	14
	Melasa	21,76	24
	Glicerol	60,70	44
<i>Rhodotorula gracilis</i>	Glicerol	25,57	10
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Skrobia z manioku	52,90	31
<i>Saccharomyces spencerorum</i>	Glicerol	37,40	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol	43,00	34
	Hydrolizat wytlóków trzciny cukrowej	58,50	50

dów związanych z białkami i w zależności od potrzeb komórki może ulegać degradacji przez specyficzne lipazy wewnątrzkomórkowe [1]. Wśród mikroorganizmów olejogennych znajdują się mikroalgi, bakterie, pleśnie oraz drożdże [35].

Bakterie rzadko zawierają więcej niż 10% tłuszczu w suchej substancji, nie wykazują również zdolności do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Intensyfikację procesu akumulacji lipidów można osiągnąć przez zastosowanie podłoża bogatych w węglowodany oraz silne napowietrzanie hodowli [30]. Do prokariotycznych organizmów olejeogennych zalicza się szereg gatunków z rodzajów *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* i *Nocardia* [2]. W warunkach niedoboru azotu *Rhodococcus* sp. i *Nocardia corallina* akumulują przede wszystkim triacyloglicerole, z niewielką ilością diacylogliceroli i estrów woskowych. Wykorzystując jako źródło węgla glukozę niektóre promieniowce mogą gromadzić nawet do 70% triacylogliceroli w suchej substancji komórkowej. Wytwarzanie i wewnątrzkomórkowa akumulacja lipidów w komórkach bakterii ma ścisły związek z fazą wzrostu i następuje po zaprzestaniu biosyntezy białka [47].

Mikroalgi są zdolne do syntezy dużych ilości lipidów, na co mają wpływ głównie intensywność światła, pH, stężenie rozpuszczonego tlenu i CO<sub>2</sub>, stężenie składników odżywczych takich jak azot, fosfor, krzem, żelazo oraz obecność organicznych źródeł węgla. We właściwie skomponowanym podłożu i przy odpowiednio dobranych parametrach hodowli uzyskano biomasę komórkową *Schizochytrium* sp. zawierającą 77 g tłuszczu/100 g<sub>s.s.</sub>, *Botryococcus braunii* (75 g tłuszczu/100 g<sub>s.s.</sub>) oraz *Nannochloropsis* sp. (68 g tłuszczu/100 g<sub>s.s.</sub>) [47].

Niektóre olejogenne pleśnie mają zdolność do gromadzenia aż do 85% tłuszczu w suchej substancji

komórkowej. Proces ich syntezy i akumulacji jest ściśle związany z wyczerpaniem składników odżywczych innych niż węgiel, co zapobiega proliferacji komórek, a nadal umożliwia przekształcenie substratu w lipidy [29]. Na szczególną uwagę zasługują pleśnie z rodzajów *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* i *Zygorhynchus*, które mają zdolność do syntezy dużych ilości cennych z żywieniowego punktu widzenia kwasów wielonienasyconych (PUFA) zwłaszcza kwasu  $\gamma$ -linolenowego (GLA) (C18:3n-6) oraz kwasu arachidonowego (ARA) (C20:4n-6) [27].

Najlepszymi producentami tłuszczu mikrobiologicznego są drożdże ze względu na ich wysoką zawartość w biomacie komórkowej. Organizmy te wykazują szybkie tempo wzrostu i niskie wymagania pokarmowe, a skład kwasów tłuszczowych można modyfikować przez zmianę warunków hodowli [1]. Szacuje się, że spośród 600 znanych gatunków drożdży mniej niż 30 zdolnych jest do syntezy powyżej 20% tłuszczu w suchej substancji komórkowej. Olejogenne drożdże należą głównie do rodzajów *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* oraz *Lipomyces* [9]. Przykładowe zawartości tłuszczu w suchej substancji komórkowej drożdży przedstawiono w tabeli I.

Profil kwasów tłuszczowych wytwarzanych przez drożdże zależy od gatunku, rodzaju zastosowanego podłoża, warunków hodowli, czasu jej trwania oraz temperatury [30]. Tłuszcze syntetyzowane przez olejogenne drożdże zawierają głównie kwasy: mirystynowy (C14:0), palmitynowy (C16:0), stearynowy (C18:0), oleinowy (C18:1), linolowy (C18:2) oraz linolenowy (C18:3) (tab. II) [32]. Kwas palmitynowy stanowi przeciętnie 15–25% (w/w) tłuszczu, natomiast kwas palmitoleinowy mniej niż 5% (w/w). Podobnie niski

Tabela II  
Wzory chemiczne wybranych kwasów tłuszczowych syntetyzowanych przez drożdże

Kwas tłuszczowy	Wzór chemiczny
Kwas mirystynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Kwas palmitynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Kwas stearynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Kwas oleinowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Kwas linolowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Kwas linolenowy	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

udział w całkowitej zawartości tłuszczu syntetyzowanego przez drożdże ma kwas stearynowy (5–8%). Głównym kwasem tłuszczowym występującym w lipidach drożdży jest kwas oleinowy, a jego udział może wynosić nawet powyżej 70% (w/w). Zawartość kwasu linolowego zależy od gatunku drożdży waha się w granicach 15–25% (w/w) [35].

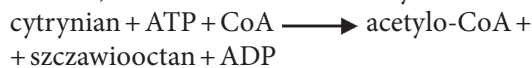
### 3. Enzymatyczne drogi syntezy tłuszczu w komórkach drożdży

W komórkach drożdży olejogennych synteza lipidów może przebiegać w dwojaki sposób: na drodze *de novo*, czyli z cząsteczek acetylo-CoA i malonylo-CoA (rys. 1) oraz na drodze *ex novo*, czyli z hydrofobowych substratów obecnych w środowisku (rys. 3) [9]. W metodzie *de novo* źródło węgla stanowią sacharydy takie jak glukoza, fruktoza, laktoza, sacharoza oraz cukrowe surowce odpadowe, np. melasa buraczana czy serwatka. W przypadku drugiego sposobu – *ex novo*, substratami są obecne w podłożu hodowlanym związki hydrofobowe, takie jak oleje roślinne, estry kwasów tłuszczowych, odpadowe tłuszcze pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, oleje rybne czy *n*-alkany [35].

#### 3.1. Biosynteza tłuszczu *de novo*

Proces syntezy tłuszczu na drodze *de novo* można podzielić na dwa zasadnicze etapy. Pierwszy z nich obejmuje reakcje prowadzące do wytworzenia acetylo-CoA, a drugi konwersję tego związku do lipidów [13]. Substraty cukrowe przekształcane są w procesie glikolizy do kwasu pirogronowego, który przechodzi przez błonę mitochondrialną do matrix mitochondrialnej, gdzie kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDC) katalizuje reakcję przekształcenia pirogronianu w acetylokoenzym A. W dalszej kolejności cząsteczka ta może być włączona do Cyklu Krebsa lub stać się substratem do wytwarzania kwasów tłuszczowych. W przypadku biosyntezy tłuszczu, acetylo-CoA musi zostać przetransportowany do cytozolu, a ponieważ wewnętrzna błona mitochondrialna jest dla niego nie-

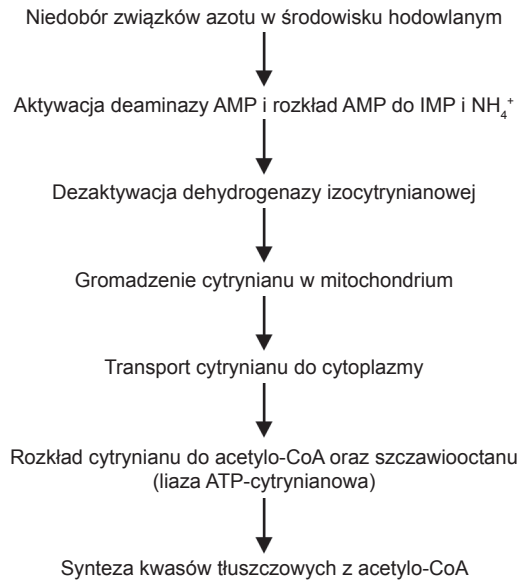
przepuszczalna, ulega kondensacji ze szczawiooctanem tworząc cytrynian [35]. W przypadku mikroorganizmów olejogennych nadprodukcja kwasu cytrynowego jest stymulowana przez niedobór związków azotowych. Na początku zostaje aktywowana deaminaza AMP (EC 3.5.4.6), katalizująca rozkład adenozynomonofosofanu (AMP) do inozynomonofosforanu (IMP) i jonów amonowych ( $\text{NH}_4^+$ ), które w warunkach niedoboru stanowią dodatkowe źródło azotu [13]. Ponieważ AMP jest aktywatorem allosterycznym dehydrogenazy izocytrynianowej (EC 1.1.1.42), zmniejszenie jego stężenia blokuje cykl Krebsa na poziomie izocytrynianu, pozostającego w równowadze z kwasem cytrynowym dzięki aktywności akonitazy (EC 4.2.1.3). Gdy stężenie cytrynianu w mitochondrium osiągnie pewną wartość krytyczną, zostaje on przetransportowany do cytoplazmy, gdzie jest rozszczepiany przez wiązkę ATP-cytrynianową (EC 2.3.3.8) do szczawiooctanu i acetylo-CoA:



Liażę ATP-cytrynianową uznaje się za kluczowy enzym syntezy tłuszczu przez mikroorganizmy olejogenne, ponieważ w wyniku jego aktywności powstaje duża ilość acetylo-CoA [7]. Szczawiooctan w cytoplazmie zostaje przekształcony w jabłczan w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę jabłczanową (EC 1.1.1.37), który następnie ulega przemianie do pirogronianu:



Reakcję katalizuje tzw. enzym jabłczanowy (EC 1.1.1.38–40). Powstały pirogronian powraca do matrix mitochondrialnej. Podczas reakcji przekształcania jabłczanu wytworzona zostaje cząsteczka NADPH, niezbędna w procesie syntezy kwasów tłuszczowych. Chociaż szacuje się, że aktywność enzymu jabłczanowego pokrywa mniej niż 15% zapotrzebowania na NADPH (pozostała ilość pochodzi z reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową oraz dehydrogenazę 6-fosfoglukonianową) uważa się, że wytworzony w tej reakcji NADPH jest niezbędny w procesie syntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu [13]. Jak podają Ratledge i Wynn jeśli zahamowana



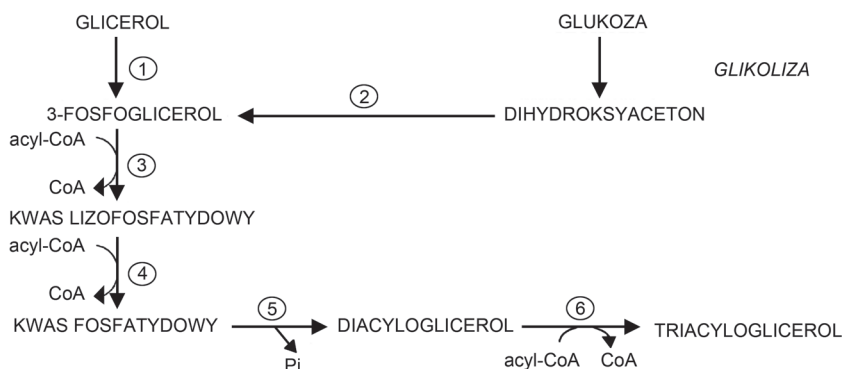
Rys. 1. Etapy prowadzące do biosyntezy tłuszczu w komórkach drożdży olejogennych na drodze *de novo* (opracowanie na podstawie [9, 33])

zostanie jego aktywność na skutek inhibicji lub mutacji, nastąpi zatrzymanie syntezy lipidów [42]. W przypadku organizmów nieolejogennych zgromadzony w cytoplazmie kwas cytrynowy może zostać wydzielony do podłoża hodowlanego lub wywołać inhibicję fosfofruktokinazy (EC 2.7.1.11), która prowadzi do wewnątrzkomórkowego gromadzenia polisacharydów [35], takich jak glikogen oraz glukany [9].

Synteza kwasów tłuszczowych rozpoczyna się od karboksylacji dwuwęglowego acetylo-CoA. Reakcję katalizuje karboksylaza acetylo-CoA (EC 6.4.1.2), zawierająca biotynę jako grupę prostetyczną. Produktem tego etapu jest trójwęglowa cząsteczka malonylo-CoA. Następnie cząsteczki acetylo-CoA i malonylo-CoA zostają przekształcone w ich ACP-pochodne, odpowiednio przez transacylazę acetylową (EC 2.3.1.38) oraz transacylazę malonylową (EC 2.3.1.39). W dalszym ciągu zachodzi etap elongacji kwasów tłuszczowych, obejmujący cztery reakcje. W pierwszym obrocie cyklu następuje konden-

sacja acetylo-ACP z malonylo-ACP do acetoacetylo-ACP, który jest redukowany do D-3-hydroksybutyrylo-ACP. Związek ten ulega odwodnieniu w wyniku czego powstaje krotonylo-ACP ulegający w dalszej kolejności redukcji do butyrylo-ACP. Reakcje katalizuje kompleks syntazy kwasów tłuszczowych (EC 2.3.1.86). Podczas kolejnych obrotów cyklu elongacji dochodzi do wydłużania łańcucha acylo-ACP, aż do powstania palmitoilo-ACP. Związek ten zawiera szesnaście atomów węgla i nie stanowi substratu dla enzymu kondensującego acetylomalonylo-ACP. W komórkach eukariotycznych, na powierzchni gładkiego retikulum endoplazmatycznego znajdują się specyficzne enzymy, katalizujące wydłużanie kwasów tłuszczowych dłuższych niż palmitynian [23].

Wytworzone kwasy tłuszczowe mogą być następnie włączone do trójglicerydów, które powstają z cząsteczek 3-fosfoglicerolu oraz acylo-CoA (cząsteczka kwasu tłuszczowego połączona z koenzymem A). W zależności od substratu oraz aparatu enzymatycznego mikroorganizmu, 3-fosfoglicerol może powstawać z fosfodihydroksyacetonu lub też bezpośrednio z glicerolu, w reakcji katalizowanej przez kinazę glicerolową. Enzymy uczestniczące w syntezie triacylogliceroli zlokalizowane są w ciałkach lipidowych oraz retikulum endoplazmatycznym (ER), natomiast acylotransferaza fosfoglicerolowa znajduje się głównie w mitochondrium. W wyniku jej aktywności 3-fosfoglicerol ulega acylacji tworząc kwas lizofosfatydowy. Z tego związku po przyłączeniu kolejnej cząsteczki acylo-CoA powstaje kwas fosfatydowy, którego defosforylacja doprowadza do wytworzenia diacyloglicerolu. Usunięcie reszty fosforanowej wymaga aktywności trzech form izomerycznych fosfatazy fosfatydowej. Jedna z nich występuje w błonie retikulum endoplazmatycznego, druga w mitochondrium, a trzecia znajduje się w cytoplazmie. Ostatni etap syntezy, czyli acylacja diacyloglicerolu, jest katalizowany przez acylotransferazę diacyloglicerolową, występującą w błonie ER [1]. Schemat syntezy triacylogliceroli przedstawiono na rys. 2.



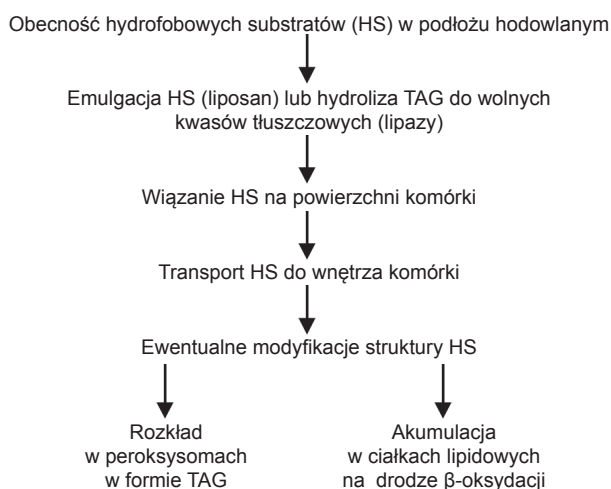
Rys. 2. Etapy syntezy triacylogliceroli (opracowanie na podstawie [1]). Enzymy katalizujące reakcje: 1) kinaza glicerolowa (EC 2.7.1.30); 2) dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (EC 1.1.1.8); 3) acylotransferaza fosfoglicerolowa (EC 2.3.1.15); 4) acylotransferaza lizofosfatydowa (EC 2.3.1.51); 5) fosfataza fosfatydowa (EC 3.1.3.4); 6) acylotransferaza diacyloglicerolowa (EC 2.3.1.20)

### 3.2. Biosynteza tłuszczu *ex novo*

Niektóre gatunki drożdży są zdolne do wzrostu w podłożach zawierających hydrofobowe związki stanowiące źródło węgla oraz jednoczesnej akumulacji dużych ilości tłuszczu. Drożdże te należą głównie do rodzajów *Torulopsis*, *Candida*, *Yarrowia*, *Trichosporon*, *Geotrichum* oraz *Pichia*. W metodzie *ex novo* obecne w środowisku związki hydrofobowe takie jak alkany, wolne kwasy tłuszczowe czy triacyloglicerole bezpośrednio lub po uprzedniej hydrolizie zostają przetransportowane do wnętrza komórki, gdzie mogą stanowić materiał energetyczny lub też zostać włączone do procesów biotransformacji [7, 35].

Najlepiej poznanym i opisanym w literaturze przykładem drożdży zdolnych do biosyntezy tłuszczu wewnątrzkomórkowego na drodze *ex novo* jest *Yarrowia lipolytica*. [7]. Stwierdzono, że transport hydrofobowych substratów do wnętrza komórki możliwy jest dzięki zdolności do wytwarzania liposanu, który umożliwia ich emulgację oraz dzięki możliwości wydzielania zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych hydrolizujących triacyloglicerole do wolnych kwasów tłuszczowych [35]. Alkany wnikają natomiast do komórki w formie niezmodyfikowanej [21]. Drożdże *Y. lipolytica* są także zdolne do modyfikacji struktury ściany komórkowej, co ułatwia przyleganie związków hydrofobowych do jej powierzchni [7]. Jak podają Beopoulos i Nicaud [9] mechanizmy transportu substratów hydrofobowych nie zostały jeszcze do końca poznane. Po przedostaniu się do wnętrza komórki związki te mogą ulegać różnym modyfikacjom enzymatycznym, rozkładowi w peroksysomach na drodze  $\beta$ -oksydacji oraz mogą być akumulowane w postaci materiału zapasowego w ciałkach lipidowych, co przedstawiono schematycznie na rys. 3.

Wolne kwasy tłuszczowe są rozkładane w procesie  $\beta$ -oksydacji, w wyniku czego uwalniania jest energia



Rys. 3. Etapy prowadzące do biosyntezy tłuszczu w komórkach olejożennych drożdży *Yarrowia lipolytica* na drodze *ex novo* (opracowanie na podstawie [9])

niezbędna do wzrostu komórek oraz powstają metabolity pośrednie stanowiące prekursorzy syntezy materiałów komórkowych [35]. U drożdży enzymy uczestniczące w tym szlaku zlokalizowane są w peroksysomach [16]. Podczas jednego obrotu procesu  $\beta$ -oksydacji dochodzi do odłączenia jednostki dwuwęglowej (formie acetylo-S-CoA) od kwasu tłuszczowego związanego z koenzymem A [21]. Pierwszy etap katalizowany jest przez oksydazę (Aoxp) acylo-koenzymu A (EC 1.3.3.6) [16]. W komórkach drożdży *Y. lipolytica* zidentyfikowano 6 izoenzymów tej oksydazy (Aox1p, Aox2p, Aox3p, Aox4p, Aox5p oraz Aox6p), różniących się specyficznością substratową. Na przykład oksydaza Aox2p jest aktywna wobec długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, natomiast Aox3p w stosunku do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [7]. Oksydaza acylo-CoA katalizuje reakcję odwodorowania substratu. W następnych dwóch przemianach biorą udział kolejno hydratata 2-enoilo-CoA (EC 4.2.1.17) oraz dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA (EC 1.1.1.35). Ostatnią reakcją katalizuje tiolaza 3-ketoacylo-CoA (EC 2.3.1.16), w efekcie czego powstaje cząsteczka acetylo-CoA oraz cząsteczka kwasu tłuszczowego skróconego o dwie jednostki węglowe [21]. Podczas kolejnych obrotów procesu  $\beta$ -oksydacji dochodzi do odłączenia dwuwęglowych jednostek, aż do całkowitego rozkładu kwasu tłuszczowego. Jednakże w przypadku niektórych szczepów cząsteczka acylo-CoA, będąca produktem pośrednim cyklu może zostać z niego wyłączona, co wykorzystano w biotechnologicznej produkcji aromatów (cyklizacja kwasów tłuszczowych podczas ich rozpadu). Firma Safisis (Lesaffre, Francja) opracowała technologię otrzymywania  $\gamma$ -dekalaktonu, związku o zapachu brzoskwińowym, z kwasu rycynolowego. Pozyskiwany jest on na drodze „niepełnej”  $\beta$ -oksydacji w komórkach drożdży, podczas której uwalniany jest 10-cio węglowy hydroksylowany kwas tłuszczowy, ulegający następnie cyklizacji w warunkach wewnątrzkomórkowego pH [9].

Zasadnicza różnica między akumulacją lipidów na drodze *ex novo* a *de novo* związana jest z zawartością azotu w podłożu hodowlanym. Jak podają Papanikolaou i wsp. [35] jeśli w środowisku znajdują się hydrofobowe substraty stanowiące źródło węgla i energii, akumulacja wewnątrzkomórkowego tłuszczu następuje jednocześnie ze wzrostem komórki, w przeciwieństwie do syntezy lipidów na drodze *de novo* zachodzącej po wyczerpaniu azotu w podłożu hodowlanym.

### 4. Czynniki wpływające na proces biosyntezy tłuszczu

Na proces biosyntezy lipidów w komórkach drożdży mają wpływ takie czynniki jak źródło węgla i azotu w podłożu, stosunek molowy C/N, pH, zawartość

wybranych pierwiastków oraz witamin, temperatura oraz czas prowadzenia hodowli [51].

Jedną z najważniejszych czynności przy ustalaniu składu pożywki jest wytypowanie najkorzystniejszego źródła węgla dla danego mikroorganizmu. Jego preferowana forma oraz stężenie mogą się znacznie różnić nawet między gatunkami tego samego rodzaju drobnoustrojów olejogennych. Podczas wzrostu węgiel jest wykorzystywany przez mikroorganizmy jako źródło energii oraz w procesach anabolicznych, prowadzących do wytworzenia węglowodanów, tłuszczu, kwasów nukleinowych oraz białek [4]. Najczęściej wykorzystywanym w badaniach źródłem węgla jest glukoza. Maksymalna teoretyczna wydajność syntezy (obliczona jako gramy wytworzonego tłuszczu/gramy zużytego substratu węglowego) wynosi dla tego związku 33%, a dla glicerolu 30% [6, 41]. Szacuje się, że produkcja jednej tony tłuszczu mikrobiologicznego wymaga około 5 ton substratu węglowego, którego koszt znacząco decyduje o opłacalności ekonomicznej procesu [41, 51]. Dlatego w celu zastąpienia syntetycznych składników, jako źródło węgla wykorzystuje się coraz powszechniej produkty uboczne z różnych gałęzi przemysłu, takie jak melasa, serwatka, hydrolizaty skrobi, frakcja glicerynowa, odpady celulozowe oraz *n*-alakany [26, 30]. Easterling i wsp. [17] prowadzili hodowle drożdży *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091 w podłożach zróżnicowanych ze względu na rodzaj źródła węgla (glukoza, ksyloza, glicerol, glukoza + ksyloza, glukoza + glicerol, ksyloza + glicerol). Najwyższą zawartość wewnątrzkomórkowego tłuszczu (34% w suchej substancji komórkowej) uzyskano w podłożu zawierającym mieszaninę glukozy i glicerolu.

Kolejnym niezbędnym składnikiem odżywczym, który musi znaleźć się w środowisku jest azot. Podłoża hodowlane najczęściej suplementuje się w takie syntetyczne źródła tego pierwiastka jak siarczan amonu, chlorek amonu, asparaginan, glutaminian, winian amonu i ekstrakt drożdżowy. Coraz częściej w tym celu stosuje się także odpady przemysłu spożywczego, np. namok kukurydziany, odpadowe wody z produkcji glutamianu sodu oraz ziemniaczana woda sokowa powstająca podczas wytwarzania krochmalu [10, 26, 51, 54]. Rodzaj zastosowanego źródła azotu w podłożu hodowlanym ma wpływ na całkowitą zawartość tłuszczu w komórkach drożdży. Evans i Ratledge [19] zaobserwowali, że dla olejogennej szczepu drożdży *Rhodospiridium toruloides* CBS 14 zawartość wewnątrzkomórkowych lipidów wzrosła z 18 g/100 g<sub>s.s.</sub>, gdy zastosowano NH<sub>4</sub>Cl, do 50 g/100 g<sub>s.s.</sub>, gdy użyto kwasu glutaminowego w tym samym stężeniu jako źródła azotu.

W fazie logarytmicznego wzrostu azot wykorzystywany jest przez drobnoustroje do syntezy aminokwasów, białek oraz kwasów nukleinowych [6, 41] Wobec tego, gdy w środowisku zostanie wyczerpana pula

związków azotowych, zahamowana zostanie proliferacja komórek. W przypadku organizmów olejogennych deficyt ten prowadzi do ciągu reakcji biochemicznych (rozdz. 3.1), wynikiem których jest wzmożona synteza i akumulacja tłuszczu [35].

W celu zintensyfikowania wytwarzania tłuszczu przez olejogenne szczepy drożdży na drodze *de novo* należy ustalić odpowiedni stosunek molowy C/N w podłożu hodowlanym. Zwiększanie jego wartości do odpowiedniego poziomu, zależnego od szczepu powoduje wzrost zawartości lipidów w biomacie i jednocześnie skutkuje zmniejszeniem tempa wzrostu. Początkowy stosunek C/N nie powinien jednak przekroczyć wartości umożliwiającej wytworzenie znacznych ilości biomasy komórkowej w logarytmicznej fazie wzrostu [1]. Ogólnie uznaje się, że proces gromadzenia tłuszczu indukowany jest stosunkiem C/N wyższym niż 20. Jednak w przypadku niektórych mikroorganizmów może on wynosić nawet 70 i więcej [36]. Dla olejogennych drożdży *Lipomyces starkeyi*, hodowanych w podłożu syntetycznym zawierającym glukozę jako źródło węgla oraz siarczan amonu jako źródło azotu, najwyższą zawartość lipidów w biomacie wynosząca 68 g/100 g<sub>s.s.</sub>, uzyskano gdy początkowy stosunek C/N wynosił 150. Podczas hodowli tych samych drożdży w podłożu o C/N = 60 zawartość wewnątrzkomórkowego tłuszczu zmniejszyła się do 40 g/100 g<sub>s.s.</sub> [5].

Pierwiastkiem niezbędnym do wzrostu drożdży jest również fosfor. W większości przypadków jego stężenie nie wpływa znacząco na wytwarzanie tłuszczu przez drożdże, ale może mieć wpływ na strukturę kwasów tłuszczowych. Przykładowo lipidy wyekstrahowane z biomasy drożdży *Candida utilis* uzyskanej z podłoża o ograniczonej zawartości fosforanów, charakteryzowały się zmienionym składem. W tym przypadku komponenty fosfolipidowe w dużym stopniu zostały zastąpione przez reszty polarne, niezawierające fosforu. Drożdże wymagają do wzrostu również witamin takich jak kwas pantotenowy, biotyna czy witamina B<sub>6</sub>. Ich niedobór może prowadzić do zmian w ilości oraz składzie wytworzonych lipidów [43].

Na proces syntezy i akumulacji wewnątrzkomórkowych lipidów ma wpływ także obecność w podłożu takich kationów jak Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup>. Te mikroelementy są niezbędne dla właściwej aktywności liazy ATP-cytrynianowej, kluczowego enzymu syntezy kwasów tłuszczowych na drodze *de novo* [11].

W celu zintensyfikowania biosyntezy tłuszczu, oprócz ustalenia optymalnego składu podłoża ważne jest także określenie odpowiedniej temperatury prowadzenia hodowli, pH środowiska oraz stopnia aeracji. Drożdże olejogenne wykazują najwyższą produktywność w temperaturze nieco niższej od optymalnej. W tych warunkach obserwuje się także wzrost zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych [51]. Przyjmuje się,

że temperatura prowadzenia hodowli powinna wynosić 25–30°C [1]. Amaretti i wsp. [4] prowadzili hodowlę psychrofilnych drożdży *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 stosując różne temperatury wzrostu: –3, 0, 5, 10, 15 oraz 20°C. Najwyższą zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) charakteryzował się tłuszcz wyekstrahowany z biomasy drożdży hodowanych w temperaturze 0°C, a ich udział wynosił 55,4% (w/w). Wraz ze wzrostem temperatury prowadzenia hodowli zawartość PUFA zmniejszała się do 40,6% (w/w), natomiast zwiększał się procentowy udział kwasów nasyconych, z 18,6 do 36,9 % (w/w).

Optymalna wartość pH podłoża hodowlanego mieści się w przedziale 4–8 i zależy od rodzaju mikroorganizmu oraz zastosowanego źródła węgla [18]. Johnson i wsp. [25] badali wpływ początkowej kwasowości czynnej podłoża na wydajność syntezy lipidów przez olejogonne drożdże *R. glutinis* IIP-30. Najwyższą zawartość tłuszczu, wynoszącą 66% w przeliczeniu na suchą substancję, uzyskano w podłożu o pH 4,0, natomiast przy pH 3,0, 5,0 i 6,0 wynosiła ona odpowiednio 12, 48 oraz 44%. Nie stwierdzono znaczących zmian w składzie kwasów tłuszczowych w zakresie badanych wartości kwasowości czynnych.

Stopień napowietrzania hodowli jest również ważnym czynnikiem, warunkującym zarówno wzrost drożdży jak również całkowitą zawartość tłuszczu w komórkach oraz jego skład. W warunkach ograniczonego dostępu tlenu wzrasta ilość nasyconych kwasów tłuszczowych, zmniejsza się natomiast zawartość kwasów nienasyconych, fosfolipidów i steroli [51]. Prowadzenie hodowli drożdży olejogennych wymaga również ustalenia optymalnego czasu jej trwania. Odkładanie tłuszczu w ciałkach lipidowych rozpoczyna się pod koniec wykładniczej fazy wzrostu i przebiega najintensywniej w fazie stacjonarnej [18].

## 5. Próby doskonalenia genetycznego drożdży olejogennych

Zwiększenie wydajności biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu oraz zmiana jego składu jakościowego jest możliwa nie tylko na drodze optymalizacji składu podłoża oraz warunków hodowli, a także poprzez zastosowanie najnowszych technik inżynierii genetycznej [9]. Ykema i wsp. [55, 56] na drodze mutagenizacji za pomocą promieniowania UV otrzymali sześć aukso-troficznymi mutantów drożdży *Apiotrichum curvatum*. Analiza jakościowa tłuszczu wyizolowanego z biomasy mutantów wykazała, że różnił się on zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych (27 do 86% SFA) w stosunku do szczepu dzikiego (44% SFA). W toku dalszych badań wybrano jednego mutantu zdolnego do biosyntezy tłuszczu o składzie zbliżonym do masła kakaowego.

Beopoulos i wsp. [8] prowadzili badania nad zwiększeniem biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu w komórkach drożdży *Y. lipolytica* przez inaktywację genu *GUT2* kodującego wytwarzanie dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej, katalizującej przemianę 3-fosfoglicerolu do fosfodihydroksyacetonu. Mutant charakteryzował się trzykrotnie większą zawartością tłuszczu w biomacie w porównaniu ze szczepem rodzicielskim, jednak od końca logarytmicznej fazy wzrostu odnotowano zmniejszenie jego zawartości spowodowane postępującym procesem  $\beta$ -oksydacji. Dlatego też dokonano dodatkowo delecji genów *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* oraz *POX6* (kodujących wytwarzanie izoenzymów oksydazy acylo-koenzymu A, katalizujących pierwszy etap  $\beta$ -oksydacji) co doprowadziło do 4-krotnego wzrostu zawartości wewnątrzkomórkowego tłuszczu (41,9 g/100 g<sub>s.s.</sub>) w porównaniu do szczepu dzikiego po 24 godzinach hodowli (12,8 g/100 g<sub>s.s.</sub>).

Inne badania [57] prowadzone z użyciem drożdży *Y. lipolytica* dotyczyły wprowadzenia do komórek genu kodującego wytwarzanie liazy ATP-cytrynianowej (ACL), kluczowego enzymu syntezy kwasów tłuszczowych metodą *de novo* (rozdział 3.1). Aby zwiększyć ilość acetylo-CoA do komórek drożdży wprowadzono na wektorze gen syntezy ACL pochodzący z *Mus musculus*. Zawartość tłuszczu zwiększyła się z 7,3 g/100 g<sub>s.s.</sub>, dla szczepu rodzicielskiego do 11–23 g/100 g<sub>s.s.</sub>, dla komórek transformowanych. Stwierdzono, że nadekspresja genu syntezy ACL nie miała wpływu na skład jakościowy kwasów tłuszczowych.

Tai i Stephanopoulos [49] badali wpływ nadekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę acylotransferazy diacyloglicerolowej (DGA1) oraz karboksylazy acetylo-CoA (ACC1). Geny te zostały wprowadzone do komórek drożdży *Y. lipolytica* na plazmidach. Po 100-godzinnej hodowli drożdży transformowanych genem *ACC1* otrzymano 17,9 g tłuszczu w suchej substancji komórkowej, co dało ponad 2-krotny wzrost względem próby kontrolnej – niemodyfikowanej. Komórki *Y. lipolytica* wykazujące nadekspresję acylotransferazy diacyloglicerolowej zawierały natomiast ponad 4-krotnie więcej tłuszczu (33,8 g/100 g<sub>s.s.</sub>) niż drożdże niemodyfikowane. W kolejnej części badań autorzy zastosowali konstrukt genowy zawierający zarówno gen syntezy DGA1 jak i ACC1, w wyniku czego w suchej substancji komórkowej znajdowało się 41,4% tłuszczu.

## 6. Ekstrakcja tłuszczu z komórek drożdży

Wydajna ekstrakcja wewnątrzkomórkowego tłuszczu stanowi bardzo ważne zagadnienie, niestety proces ten nie przebiega nigdy z wydajnością wynoszącą 100%. Spowodowane jest to obecnością grubej ściany

komórkowej, która odporna jest na wiele rozpuszczalników. Ponadto drożdże mogą wytwarzać lipazy, które przechodząc do ekstraktu zmniejszają jego stabilność. W komórkach drożdży olejogennych tłuszcz akumulowany jest w ciałkach lipidowych, w których mogą znajdować się także inne związki lipofilne. Substancje te są trudne do usunięcia podczas procesu oczyszczania lipidów. Z tych powodów metody ekstrakcji tłuszczu z biomasy drożdży są złożone [1].

W celu dezintegracji ściany komórkowej drożdży stosuje się zamrażanie lub ogrzewanie, hydrolizę chemiczną lub enzymatyczną. Jako rozpuszczalników organicznych w procesie ekstrakcji używa się powszechnie eter naftowy, chloroform, metanol lub mieszaniny chloroformu z metanolem w stosunku objętościowym 1:1 lub 2:1 [1]. Powszechnie stosowanymi metodami ekstrakcji tłuszczu z komórek drożdży są metody Soxhleta, Folcha oraz Bligh and Dyer [10, 46].

## 7. Możliwości przemysłowego zastosowania tłuszczu mikrobiologicznego

W porównaniu do olejów roślinnych czy tłuszczów zwierzęcych, produkcja SCO wykazuje wiele zalet. Jest niezależna od warunków pogodowych, pory roku, położenia geograficznego i nie wymaga wykorzystania gruntów rolnych oraz wody do nawadniania. Drobnoustroje wykazują szybkie tempo wzrostu, co znacznie skraca cykl produkcji. Możliwe jest także wykorzystanie, jako składników podłoży produktów odpadowych z różnych gałęzi przemysłu [45]. Przeszkodę w przemysłowej produkcji SCO stanowi natomiast stosunkowo niska wydajność tłuszczu mikrobiologicznego w odniesieniu do jednostki objętości podłoża hodowlanego. Najwięcej możliwości zastosowania w różnych dziedzinach gospodarki mają lipidy otrzymywane z biomasy pleśni oraz drożdży [37].

Pierwsza przemysłowa produkcja SCO odbywała się w latach 1985–1990 w Wielkiej Brytanii. Olej mikrobiologiczny otrzymywany był z biomasy pleśni *Mucor circinelloides* i charakteryzował się wysoką zawartością niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza kwasu  $\gamma$ -linolenowego, którego zawartość wynosiła ok. 18%. Stosowany był wówczas, jako naturalna alternatywa drogiego oleju z wiesiołka [39]. W chwili obecnej na rynku europejskim dopuszczony jest do obrotu olej o wysokiej zawartości kwasu arachidonowego, otrzymywany z biomasy pleśni *Mortierella alpina* z przeznaczeniem do stosowania w preparatach żywienia niemowląt i wcześniaków [15]. Olej bogaty w ARA (ok. 43%) produkowany jest przez Suntory Limited w Japonii pod nazwą SUNTGA40S oraz przez Cargill Alking Bioengineering (Wuhan) Co., Ltd. w Chinach pod nazwą handlową CABIO oil. W Sta-

nach Zjednoczonych w sprzedaży znajduje się także tłuszcz mikrobiologiczny otrzymywany z biomasy glonów *Schizochytrium* sp., o wysokiej zawartości kwasu dokozaheksaenowego (ok. 41%) [39].

Z uwagi na wysokie koszty procesu, najbardziej ekonomiczne jest zastosowanie drożdży do otrzymywania substytutów szlachetnych tłuszczów np. masła kakaowego, które jest powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym, przede wszystkim w procesie wytwarzania czekolady oraz w branży kosmetycznej, jako składnik nawilżający oraz natłuszczający. Jego cena ulega niestannym wahaniom, które są spowodowane przez ataki szkodników oraz grzybice niszczące plantacje kakaowca. Rozwiązaniem tego problemu mogłaby się stać produkcja tłuszczu mikrobiologicznego o cechach masła kakaowego [36]. Ykema i wsp. [55] zastosowali w tym celu auksotroficzny mutant drożdży *Apiotrichum curvatum* Ufa25. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze stosując, jako podłoże odpadową serwatkę wzbogaconą w olej rzepakowy, będący źródłem kwasu oleinowego. Po 120 godzinach prowadzenia procesu uzyskano średnio 6 g lipidów/litr podłoża. Otrzymany tłuszcz charakteryzował się składem zbliżonym do masła kakaowego i zawierał 40% (w/w) kwasu stearynowego, 25% (w/w) kwasu palmitynowego, 20% (w/w) kwasu oleinowego oraz 10% (w/w) kwasu linolowego. Zastosowanie serwatki, jako podłoża hodowlanego, dodatkowo czyniło proces bardziej opłacalnym ekonomicznie.

Wiele opracowań naukowych [17, 32, 41] skupia się nad potencjalnym wykorzystaniem tłuszczu mikrobiologicznego, jako substratu do produkcji biodiesla tzw. III generacji. W 2008 roku Ratledge i Cohen [41] przedstawili wyliczenia dotyczące ekonomicznej opłacalności takiego przedsięwzięcia. Przy założeniu, że wytworzenie 1 tony oleju mikrobiologicznego wymaga dostarczenia 5 ton glukozy, szacunkowy koszt wynosił około 3000 \$ za tonę tłuszczu. Cena powszechnie używanego do produkcji biodiesla oleju rzepakowego kształtowała się na poziomie około 1500 \$/tonę. Na podstawie danych opublikowanych przez Departament Rolnictwa USA dotyczących cen glukozy oraz oleju rzepakowego w 2013 roku [12, 48] można obliczyć, że w chwili obecnej przybliżony koszt wyprodukowania tony tłuszczu przez drożdże wynosi ok. 3400 \$. Cena oleju rzepakowego kształtuje się na poziomie około 1300 \$/tonę, z czego wynika, że aktualnie tłuszcz mikrobiologiczny jest zbyt drogą alternatywą dla tradycyjnie stosowanych substratów pochodzenia roślinnego.

## 8. Podsumowanie

W ciągu ostatnich lat zainteresowanie naukowców mikrobiologiczną syntezą tłuszczu wzrosło. Poznano drogi biochemiczne syntezy lipidów w komórkach



drożdży, przeprowadzonych zostało również wiele badań dotyczących optymalizacji warunków hodowli i składu podłoża hodowlanego do wydajnej biosyntezy oraz zastosowano modyfikacje genetyczne w celu jej zwiększenia. Tłuszcze wytwarzane przez drożdże mają wiele potencjalnych zastosowań. Główną zaletą wytwarzania SCO jest jej niezależność od klimatu, natomiast wysoka cena ogranicza stosowanie procesów mikrobiologicznej syntezy tłuszczu do wytwarzania produktów szlachetnych takich jak substytuty masła kakaowego czy preparaty kwasów nienasyconych z przeznaczeniem uzupełnienia ich niedoborów w diecie ludzi i zwierząt. W związku z tym, dalsze badania w tym kierunku będą dotyczyły obniżenia całkowitych kosztów produkcji SCO, np. przez wykorzystanie przemysłowych produktów odpadowych, jako składników podłoży hodowlanych, czy też modyfikacje genetyczne drożdży w celu zwiększenia biosyntezy.

## Piśmiennictwo

- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga-Crespo P., Villa T.G.: Oily yeast as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1219–1227 (2011)
- Alvarez H.M., Steinbüchel A.: Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 367–376 (2012)
- Amaretti A., Raimondi S., Leonardia A., Rossi M.: *Candida freyschussii*: an oleaginous yeast producing lipids from glycerol. *Chem. Eng. Trans.* **27**, 139–144 (2012)
- Amaretti A., Raimondi S., Sala M., Roncaglia L., De Lucia M., Leonardi A., Rossi M.: Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb. Cell Fact.* **9**, doi:10.1186/1475-2859-9-73 (2010)
- Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M., Guebitz G.M.: Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **99**, 3051–3056 (2008)
- Armenta R.E., Valentine M.C.: Single-Cell Oils as a source of Omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 167–182 (2013)
- Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* **48**, 375–387 (2009)
- Beopoulos A., Mrozova Z., Thevenieau F., Le Dall M.T., Hapala I., Papanikolaou S., Chardot T., Nicaud J.M.: Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 7779–7789 (2008)
- Beopoulos A., Nicaud J.M.: Yeast: A new oil producer? *OCL*, **19**, 22–28 (2012)
- Błażej S., Gienka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Różańska L., Maszewska M.: Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach zawierających ziemniaczaną odpadową wodę sokową wzbogaconą glicerolem. *ZPPNR*, **576**, 3–12 (2014)
- Boulton C.A., Ratledge C.: Partial purification and some properties of ATP:citrate lyase from the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2863–2869 (1983)
- Canola. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/canola.aspx> (21.02.2015)
- Christophe G., Kumar V., Nouaille R., Gaudet G., Fontanille P., Pandey A., Soccol C.R., Larroche C.: Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Braz. Arch. Biol. Technol.* **55**, 29–46 (2012)
- Dai C.C., Tao J., Xie F., Dai Y.J., Zhao M.: Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 2130–2134 (2007)
- Decyzja Komisji Europejskiej z dnia 12 grudnia 2008 r. zezwalająca na wprowadzenie do obrotu oleju z *Mortierella alpina* o wysokiej zawartości kwasu arachidonowego jako nowego składnika żywności zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady (notyfikowana jako dokument nr C(2008) 8080)
- Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Strub C., Schorr-Galindo S.: Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass Bioenergy*, **68**, 135–150 (2014)
- Easterling E.R., French W.T., Hernandez R., Licha M.: The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* **100**, 356–361 (2009)
- Enshaeieh M., Abdoli A., Nahvi I.: Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M7 and *Candida* sp. *Journal of Cell and Molecular Research*, **5**, 17–23 (2013)
- Evans C.T., Ratledge C.: Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1693–1704 (1984)
- Fei Q., Chang H.N., Shang L., J.D., Kim N., Kang J.: The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **102**, 2695–2701 (2011)
- Fickers P., Benetti P.H., Wachè Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M.: Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* **5**, 527–543 (2005)
- Fidler N., Koletzko B., Sauerwald T.U.: Single cell oils production and application. *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, **74**, 37–45 (1999)
- Hames D.B., Hooper N.M.: Metabolizm lipidów (w) Biochemia. Krótkie wykłady, red. Hames D.B., Hooper N.M., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353–389
- Johnson V.W., Singh M., Saini V.S., Adhikari D.K., Sista V., Yadav N.K.: Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 1–4 (1995)
- Johnson V., Singh M., Saini V.S., Sista V.R., Yadav N.K.: Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 382–384 (1992)
- Kaboosi H., Behbahani B.: An overview on effective parameters in production of single cell oil by microorganisms especially the fungus of *Mortierella isabellina*. *Annals of Biological Research*, **3**, 1650–1654 (2012)
- Kavadia A., Komaitis M., Chevalot I., Blanchard F., Marc I., Aggelis G. 2001: Lipid and  $\gamma$ -linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 341–346 (2001)
- Kegg Pathway Database. GenomeNet, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (18.02.2015)
- Kendrick A., Ratledge C.: Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, **27**, 15–20 (1992)
- Leman J., Bednarski W.: Mikrobiologiczna synteza tłuszczu. *Post. Mikrobiol.* **26**, 277–291 (1987)

31. Li M., Liu G.L., Chi Z., Chi Z.M.: Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass Bioenergy*, **34**, 101–107 (2010)
32. Li Q., Du W., Liu D.: Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 749–756 (2008)
33. Meesters P.A.E.P., Huijberts G. N. M., Eggink G.: High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 575–579 (1996)
34. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* **82**, 43–49 (2002)
35. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1031–1051 (2011)
36. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1052–1073 (2011)
37. Ratledge C.: Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, **86**, 807–815 (2004)
38. Ratledge C.: Lipid biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 1647–1656 (1987)
39. Ratledge C.: Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *OCL*, **20**, D602 (2013)
40. Ratledge C.: Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids w: Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, red. B.S. Kamel, Y. Kakuda, Springer, Londyn, 1994, s. 235–291
41. Ratledge C., Cohen Z.: Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, **20**, 155–160 (2008)
42. Ratledge C., Wynn J.P.: The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **51**, 1–51 (2002)
43. Rattray J.B.M., Schibeci A., Kidby D.K.: Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* **39**, 197–231 (1975)
44. Saenge Ch., Cherisilp B., Suksaroge T., Bourtoom T.: Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bio-conversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.* **46**, 210–218 (2011)
45. Santos C.A., Caldeira M.L., Lopes da Silva T., Novais J.M., Reis A.: Enhanced lipidic algae biomass production using gas transfer from a fermentative *Rhodospiridium toruloides* culture to an autotrophic *Chlorella protothecoides* culture. *Bioresour. Technol.* **138**, 48–54 (2013)
46. Schneider R., Daum G.: Extraction of yeast lipids. *Methods Mol. Biol.* **313**, 41–45 (2006)
47. Subramaniam R., Dufreche S., Zappi M., Bajpai R.: Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 1271–1287 (2010)
48. Sugar and Sweeteners Yearbook Tables. United States Department of Agriculture. <http://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx> (21.02.2015)
49. Tai M., Stephanopoulos G.: Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.* **15**, 1–9 (2013)
50. Tsigie Y.A., Wanga C.Y., Truong C.T., Ju Y.H.: Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **102**, 9216–9222 (2011)
51. Turcotte G., Kosaric N.: Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **40**, 73–92 (1989)
52. Wang G.Y., Chi Z., Song B., Wanga Z.P., Chi Z.M.: High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Bioresour. Technol.* **124**, 77–82 (2012)
53. Wild R., Patil S, Popovic M., Zappi M, Dufreche S., Bajpai R.: Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 329–335 (2010)
54. Xue F, Miao J., Zhang X., Luo H., Tan T.: Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour. Technol.* **99**, 5923–5927 (2008)
55. Ykema A., Kater M.M., Smit H.: Lipid production in whey permeate by an unsaturated fatty acid mutant of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Biotechnol. Lett.* **11**, 477–482 (1989)
56. Ykema A., Verbree E.C., Verwoert I.I.G.S., van der Linden K.H., H. Nijkamp H.J.J., Smit H.: Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 176–182 (1990)
57. Zhang H., Zhang L., Chen H., Chen Y.Q., Chen W., Songa Y., Ratledge C.: Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: citrate lyase from *Mus musculus*. *J. Biotechnol.* **192**, 78–84 (2014)
58. Zhao X., Kong X., Hua Y., Feng B., Zhao Z.: Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 405–412 (2008)