

BIOSYNTETA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO TŁUSZCZU PRZEZ MIKROORGANIZMY OLEJOGENNE DROŻDŻE OLEJOGENNE (LIPOLITYCZNE)

Renata Choińska, Hanna Giryn

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

renata.choinska@ibprs.pl

Streszczenie

Mikroorganizmy olejogenne (ang. *oleaginous*) to wybrane gatunki drożdży, grzybów oraz alg, które posiadają zdolność do produkcji i akumulacji tłuszczu w ilościach powyżej 20% tłuszczu na suchą substancję biomasy. Tłuszcze produkowane przez mikroorganizmy to głównie triacyloglicerole (TAG), bogate w specyficzne wielonienasycone kwasy tłuszczowe, których skład jest podobny do składu olejów roślinnych. Mikroorganizmy olejogenne mogą zatem pełnić rolę obiecującego zamiennika przy produkcji biopaliw i być alternatywą dla konwencjonalnych źródeł energii. Wykorzystanie mikroorganizmów do produkcji oleju jest korzystne zarówno w aspekcie ekonomicznym, jak i ekologicznym. Pozyskiwanie oleju przy udziale mikroorganizmów charakteryzuje krótki cykl produkcji, jest niezależne od warunków klimatycznych, eliminuje negatywne aspekty produkcji biopaliw z surowców roślinnych. Ekonomiczność procesu wynika z możliwości zastosowania przemysłowych i rolniczych substancji odpadowych jako pożywki do hodowli mikroorganizmów.

Przedstawiony artykuł obejmuje przegląd doniesień naukowych dotyczących wykorzystania wybranych szczepów drożdży olejogennych (lipolitycznych) w procesie biosyntezy wewnątrzkomórkowego tłuszczu.

Słowa kluczowe: biosynteza wewnątrzkomórkowego tłuszczu, mikroorganizmy olejogenne, SCO (Single Cell Oil), drożdże olejogenne (lipolityczne)

INTRACELLULAR FAT BIOSYNTHESIS BY OLEAGINOUS MICROORGANISMS. OLEAGINOUS YEAST

Summary

Oleaginous microorganisms including selected strains of yeast, fungi and algae are defined by their ability to accumulate more than 20% of their cell dry weight as lipid content. The produced microbial lipids are mainly in form of triacylglycerols (TGA), that are rich in specific polyunsaturated fatty acids. Fatty acid composition of the microbial oils is similar to

that of plant oils. The oleaginous microorganisms represents a potential raw material for biofuels production and also a sustainable alternative for the conventional oil industry. The use of the microorganisms for the oil production has economical, and ecological advantages. Microbial oil production is low time production process, independent on the environmental parameters and overcome the negative aspects of the plant oils production. Furthermore, reduction of the cost of the microbial oils production can be achieved by using low-valued nutrient sources such as agricultural residues, and industrial by-products.

This paper reviews studies on the use of the selected strains of oleagineous yeasts for intracellular lipids production.

Key words: biosynthesis of intracellular fat, oleaginous microorganisms, SCO (Single Cell Oil), lipolytic yeasts

WSTĘP

Nadmierna eksploatacja paliw kopalnianych spowodowana dynamicznym rozwojem przemysłu, motoryzacji, wzrostem populacji ludności prowadzi do zubożenia i powolnego wyczerpywania tych źródeł energii. Analiza danych statystycznych i pesymistyczne prognozy na przyszłość sprawiły, iż zaczęto poszukiwania alternatywnych rozwiązań w tym obszarze. Początkowo podjęto działania zmierzające do wykorzystania oleju pochodzenia roślinnego lub tłuszczu zwierzęcego do produkcji biopaliw. Przewidywane wymierne korzyści ekonomiczne oraz gospodarcze wynikające ze stosowania biopaliw miały zapewnić ich szybką dominację nad paliwami konwencjonalnymi. W praktyce okazało się, że ilość produkowanych biopaliw nie jest wystarczająca, aby całkowicie pokryć zapotrzebowania społeczeństwa. Oprócz tego istnieje wysokie ryzyko degradacji środowiska, spowodowane powiększającą się powierzchnią upraw roślin oleistych, dużym zużyciem nawozów sztucznych, wykorzystaniem roślin wyłącznie do produkcji biopaliw zamiast w celach spożywczych. Negatywne aspekty związane ze stosowaniem roślin do produkcji biopaliw przyczyniły się do poszukiwania innych niekonwencjonalnych źródeł oleju do produkcji biopaliw. W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku zrodziła się idea wykorzystania do tego celu komórek mikroorganizmów olejogennych. Mikroorganizmy olejogenne, do których zaliczane są wybrane gatunki bakterii, drożdży, grzybów, posiadają zdolność do produkcji i akumulacji znacznych ilości tłuszczu. Tłuszcze produkowane przez mikroorganizmy to głównie triacyloglicerole o składzie podobnym do składu olejów roślinnych, zawierające długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Pod względem aplikacyjnym decydujące znaczenie mają kwas oleinowy, kwas linolowy i linolenowy. Za wykorzystaniem mikroorganizmów olejogennych do produkcji tłuszczu i olejów przemawiają korzyści ekonomiczne

i ekologiczne. Mikroorganizmy te są zdolne do wzrostu na substancjach odpadowych pochodzących z przemysłu i rolnictwa, zawierających przyswajalne formy węgla, azotu, fosforu. Z tego względu produkcja oleju mikrobiologicznego odgrywa istotną rolę także w procesie utylizacji odpadów.

Biosynteza wewnątrzkomórkowego tłuszczu przez mikroorganizmy

Synteza lipidów jest procesem zachodzącym w komórkach wszystkich organizmów, niezbędnym do utrzymania podstawowych funkcji życiowych. Tylko niewielka grupa mikroorganizmów zwanych olejogennymi charakteryzuje się unikalną zdolnością do gromadzenia zsyntetyzowanego tłuszczu, stanowiącego więcej niż 20% suchej substancji ich biomasy. Do tej grupy zalicza się wybrane gatunki alg, drożdży, grzybów [Subramaniam i in. 2010]. Mikroorganizmy olejogenne magazynują tłuszcz, głównie w postaci triacylogliceroli, czyli estrów glicerolu i długołańcuchowych nasyconych i/lub nienasyconych kwasów tłuszczowych. Mechanizm biosyntezy tłuszczu mikroorganizmów olejogennych jest zbliżony do tego procesu u pozostałych „nieolejogennych” mikroorganizmów. Proces magazynowania tłuszczu u mikroorganizmów olejogennych odbywa się jedynie w warunkach nadmiaru źródła węgla i ograniczonej ilości azotu w podłożu. Wyczerpywanie się źródła azotu prowadzi do asymilacji węgla, przeważnie w postaci glukozy, i jego dalszej przemiany do triacylogliceroli. TAG są następnie gromadzone we wnętrzu istniejących komórek, nieulegających już dalszym podziałom. U mikroorganizmów nieolejogennych w „stresowych” warunkach środowiska, jakim jest brak źródła azotu, następuje przyswajanie dostępnych węglowodanów i ich przemiana w odpowiednie polisacharydy (glukany, mannany) [Ratledge 2004]. Kluczową rolę w procesie metabolizmu lipidów mikroorganizmów olejogennych pełnią enzymy: dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca zależna od NADP (E.C.1.1.1.40) i liaza cytrynianowa zależna od ATP (ACL, E.C.2.3.3.8) [Meng i in. 2009]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono istotną zależność między aktywnością ACL, a zdolnością mikroorganizmów olejogennych do akumulacji lipidów [Adams i in. 2002]. Do skutecznego przebiegu procesu biosyntezy i gromadzenia lipidów konieczny jest ponadto NADPH, który uczestniczy w syntezie kwasów tłuszczowych [Ratledge 2004; Sitepu i in. 2013]. Poziom lipidów regulowany jest zawartością zsyntezowanych kwasów tłuszczowych. Sterowanie procesem syntezy kwasów tłuszczowych umożliwia zatem kontrolę procesu biosyntezy lipidów.

Rodzaj syntezowanych kwasów tłuszczowych (liczba atomów węgla w łańcuchu), ich stopień nasycenia oraz wzajemne proporcje różnią się w zależności od cech genetycznych danego mikroorganizmu. Kwasami tłuszczowymi syntetyzowanymi przez drożdże olejogenne

są głównie kwas oleinowy (18:1), kwas palmitynowy (16:0), kwas linolowy (18:2), kwas stearynowy (18:0) oraz kwas palmitooleinowy (16:1) [Beopoulos i in. 2009]. Grzyby olejogenne syntetyzują w większości kwas γ -linolenowy (18:3) oraz kwas arachidonowy (AA) (20:4) [Subramaniam i in. 2010]. Algi są natomiast bogatym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: kwasu arachidonowego (20:4), kwasu eikozapentaenowego (EPA) (20:5), kwasu dokozaheksaenowego (DHA) (22:5) [Ward, Singh, 2005]. Gromadzenie przez mikroorganizmy olejogenne kwasów tłuszczowych jako energetycznych materiałów zapasowych w postaci triacylogliceroli uzależnione jest nie tylko od rodzaju mikroorganizmu, lecz także od warunków hodowli. Optymalizacja warunków hodowli jest czynnikiem determinującym uzyskanie satysfakcjonującej efektywności biosyntezy tłuszczu. Miarą efektywności biosyntezy tłuszczu jest wysoka wydajność produkcji biomasy i wysoka zawartość zsyntetyzowanego tłuszczu na jednostkę biomasy, osiągnięta w odpowiednio krótkim czasie. Ze względów aplikacyjnych ważnymi kryteriami efektywności biosyntezy tłuszczu są rodzaj i zawartość kwasów tłuszczowych wchodzących w skład triacylogliceroli. Na przykład w składzie tłuszczu pochodzenia mikrobiologicznego przeznaczonego do produkcji biopaliw powinny dominować nasycone kwasy tłuszczowe, takie jak kwas palmitynowy i stearynowy. Udział nienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych powinien być jak najmniejszy [Rasoul-Amini i in. 2011]. Natomiast do celów żywieniowych najkorzystniejsze są tłuszcze zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe: kwas arachidonowy, kwas eikozapentaenowy (EPA), kwas dokozaheksaenowy [Ward, Singh 2005; Kolanowski 2007].

Biosynteza wewnątrzkomórkowego tłuszczu przez drożdże olejogenne (lipolityczne)

Spośród 600 znanych gatunków drożdży ok. 30 zostało dotychczas zidentyfikowanych jako drożdże olejogenne, zwane również lipolitycznymi. U niektórych gatunków np. *Rhodosporidium toruloides* [Li i in. 2007; Hu i in. 2009], *Rhodotorula glutinis* [Dai i in. 2007; Xue i in. 2008], *Cryptococcus curvatus* [Meesters i in. 1996; El-Fadaly i in. 2009] oraz *Lipomyces starkeyi* [Wild i in. 2010; Angerbauer i in. 2008] tłuszcz może stanowić nawet ok. 70% suchej masy drożdży. Właściwości olejogenne wykazują: *Yarrowia lipolytica* [Papanikolaou i in. 2006; Beopoulos i in. 2009], *Cryptococcus albidus*, *Candida curvata* [Meng i in. 2009]. W porównaniu z innymi olejogennymi mikroorganizmami, drożdże lipolityczne charakteryzują się wyższą szybkością wzrostu, a skład syntetyzowanych przez nie tłuszczów jest zbliżony do składu olejów roślinnych. Do prowadzenia swoich procesów życiowych, w tym i do syntezy tłuszczu, wykorzystują różnorodne źródła węgla, takie jak np.: glukoza, ksyloza, arabinoza, mannoza. Nadrzędne znaczenie w procesie biosyntezy tłuszczu

przez drożdże ma skład podłoża hodowlanego, w tym przede wszystkim wzajemna proporcja węgla do azotu, pH, zawartość soli nieorganicznych oraz temperatura hodowli [Ratledge 2004]. Ograniczona zawartość azotu przyczynia się do zahamowania aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej w cyklu Krebsa i zwiększonej produkcji cytrynianu, który poprzez błonę mitochondrialną zostaje przeniesiony do cytozolu komórkowego. Badając wpływ temperatury na poszczególne etapy procesu biosyntezy i magazynowania tłuszczu, Suutari i in. (1993) stwierdzili, że efektywność procesu zależy od temperatury fazy wzrostu oraz od temperatury etapu gromadzenia tłuszczu. Temperatura fazy wzrostu determinuje dynamikę wzrostu mikroorganizmów. Temperatura etapu gromadzenia tłuszczu ma zaś wpływ na wzajemne proporcje między kwasem palmitynowym i oleinowym.

Najważniejszą, z ekonomicznego punktu widzenia, zaletą drożdży lipolitycznych, wyróżniającą je zdecydowanie z grupy mikroorganizmów olejogennych, jest zdolność do wzrostu z wykorzystaniem rolno-przemysłowych substancji odpadowych, np. glicerol [Meeters i in. 1996; Papanikolaou, Aggelis 2002], melasa buraczana [El-Fadaly i in. 2009], pozostałości lignocelulozowe [Chen i in. 2009; Tsigie i in. 2011; Hu i in. 2011], odpadowa ziemniaczana woda sokowa [Błażejczak i in. 2014], szlam ściekowy [Angebauer i in. 2008], kolby kukurydziane [Chang i in. 2013]. Możliwość zastosowania tanich rozwiązań w zakresie surowcowym pozwala znacznie obniżyć koszty produkcji biopaliw przy udziale mikroorganizmów i wyznacza optymistyczne prognozy na rozszerzenie produkcji biopaliw na skalę przemysłową. Do tej pory wysokie koszty surowca były głównym problemem w procesie pozyskiwania tłuszczu mikrobiologicznego.

Glicerol odpadowy powstający przy produkcji biodiesla był wykorzystywany jako pożywka do biosyntezy tłuszczu przez *Yarrowia lipolytica* [Papanikolaou, Aggelis 2002; Makri i in. 2010], *Cryptococcus curvatus* [Hassan i in. 1996, Liang i in. 2010] oraz *Rhodotorula gracilis* [Błażejczak i in. 2014]. Przy wykorzystaniu szczepu *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 Papanikolaou i in. (2006) otrzymali 43% TAG w przeliczeniu na suchą masę w warunkach hodowli stacjonarnej. Dominującymi kwasami w cząsteczkach triacylogliceroli był kwas oleinowy i linolowy. Przy użyciu szczepu *Cryptococcus curvatus* uzyskano, w zależności od sposobu prowadzenia hodowli okresowej, 44,2% do 52% TAG w przeliczeniu na suchą masę. Syntetyzowane kwasy tłuszczowe to: kwas palmitynowy, stearynowy, olejowy oraz linolowy [Hassan i in. 1996]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Easterling i in. (2009) przy użyciu lipolitycznego szczepu *Rhodotorula glutinis* największą wydajność syntezy tłuszczu, wynoszącą ok. 34% TAG w przeliczeniu na suchą masę, stwierdzono w przypadku, gdy źródło węgla w podłożu

stanowiły dekstroza i/lub glicerol. W badanych warunkach hodowli szczep ten syntetyzował głównie kwas palmitynowy i stearynowy, a zawartość nienasyconych i nasyconych kwasów tłuszczowych różniła się w zależności od stosowanego źródła węgla. *Rhodotorula glutinis* była stosowana także w pracach doświadczalnych prowadzonych przez Dai i in. (2007). Stosując jako źródło węgla glukozę, uzyskano 49% TAG w przeliczeniu na suchą masę. Zawartość ta wzrosła do 60,7% w warunkach hodowli ciągłej. Podobną zawartość tłuszczu (67,5%) uzyskano w warunkach hodowli zsynchronizowanej prowadzonej w bioreaktorze o poj. 15 L przy użyciu drożdży z gatunku *Rhodospiridium toruloides*, stosując glukozę jako jedyne źródło węgla. W badanych warunkach hodowli *Rhodospiridium toruloides* syntetyzuje w większości kwas oleinowy, kwas palmitynowy, kwas stearynowy oraz linolowy. Uzyskane wyniki, jak również czas trwania procesu, były nieco wyższe w porównaniu z wynikami uzyskanymi w hodowlach prowadzonych w warunkach laboratoryjnych [Li i in. 2007].

El-Fadaly i in. (2009) w swoich pracach doświadczalnych nad wykorzystaniem szczepu *Cryptococcus curvatus* do biosyntezy tłuszczu zastosowali jako źródło węgla melasę buraczaną i gluten jako źródło azotu. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalili optymalne warunki hodowli, w których synteza kwasów tłuszczowych przebiegała z najlepszą efektywnością. Uzyskany skład kwasów tłuszczowych, w którym 58,04% stanowiły nienasycone kwasy tłuszczowe, był zbliżony do składu oleju rzepakowego, różnił się jedynie stężeniem poszczególnych kwasów tłuszczowych.

Szlam ściekowy był wykorzystywany jako pożywka w badaniach prowadzonych przy użyciu *Lipomyces starkeyi* [Angebauer i in. 2008]. Uzyskana zawartość tłuszczu wynosiła, w zależności od stosunku węgla do azotu, od 40% do ok. 68% w przeliczeniu na suchą masę drożdży. Podobne wyniki uzyskali Wild i in. (2010), stosując jako źródło węgla skrobię ziemniaczaną i/lub glukozę, a zsyntetyzowanymi kwasami tłuszczowymi były w większości kwas palmitynowy (39%) i oleinowy (55%).

Kolejnym obiecującym surowcem odpadowym stosowanym do produkcji oleju mikrobiologicznego są lignocelulozowe substancje odpadowe. Ze względu na olbrzymie ilości powstającej corocznie na świecie biomasy lignocelulozowej, możliwość zastosowania tego surowca jako alternatywnego źródła przyswajalnych form węgla niesie za sobą wiele korzyści. Przede wszystkim umożliwia znaczne obniżenie kosztów produkcji oleju mikrobiologicznego. Stosowanie substancji lignocelulozowych wymaga jednak odpowiedniej obróbki wstępnej, prowadzącej do uzyskania przyswajalnych form węgla, tj. cukrów prostych: glukozy i ksylozy. Proces ten obejmuje depolimeryzację ligniny, a następnie

enzymatyczną hydrolizę frakcji hemicelulozowych i celulozowych. Jednym z podstawowych problemów związanych z obróbką wstępną jest generowanie, w jej wyniku, inhibitorów takich jak furfural, kwas octowy, kwas mrówkowy, kwas lewulinowy [Chen i in. 2009]. Związki te mogą mieć negatywny wpływ na proces wewnątrzkomórkowej biosyntezy tłuszczu, a nawet prowadzić do zahamowania wzrostu komórek drożdży. Z tego powodu podjęto liczne próby optymalizacji warunków technologicznych procesu mikrobiologicznej biosyntezy tłuszczu z wykorzystaniem substancji lignocelulozowych różnego pochodzenia, np. wyłoków trzciny cukrowej [Tsigie i in. 2011; Anschau i in. 2014], słomy kukurydzianej [Gong i in. 2014], słomy pszennej [Yu i in. 2011], suszonych łodyg sorgo [Matsakas i in. 2015], kolb kukurydzianych [Huang i in. 2012]. Na podstawie badań dowiedziono, iż większość z przebadanych szczepów drożdży jest zdolna do biosyntezy znacznych ilości tłuszczu w obecności inhibitorów, jednakże wydajność procesu jest niska. Gdy wykorzystano szczep *Rhodospiridium toruloides*, zawartość tłuszczu, jaką uzyskano, wynosiła 13,8 g/L. Syntezowane kwasy tłuszczowe to głównie kwas palmitynowy, oleinowy [Matsakas i in. 2015]. Stosunkowo wysoką zawartość tłuszczu (9,8 g/L) uzyskano przy użyciu szczepu *Trichosporon dermatis*, hodowanego na pożywce z enzymatycznie hydrolizowanych kolb kukurydzianych [Huang i in. 2012]. Dominującymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi wchodzącymi w skład produkowanego tłuszczu były kwas oleinowy (43%), palmitynowy (28%) oraz stearynowy (14%). Gong i in. (2014) prowadzili badania nad wyborem najlepszego procesu technologicznego do biosyntezy tłuszczu przez szczep *Cryptococcus curvatus*, przy wykorzystaniu hydrolizatu słomy kukurydzianej. Najlepsze wyniki (4,69 g tłuszczu/L/d) uzyskano, gdy zastosowano metodę jednoczesnego scukrzania biomasy i produkcji tłuszczu. Otrzymany olej zawierał w swym składzie głównie kwas oleinowy (51%), palmitynowy (25%), stearynowy (14,6%) oraz linolowy (6%).

W pracach doświadczalnych nad wykorzystaniem substancji odpadowych do produkcji oleju mikrobiologicznego analizowano również możliwość zastosowania takich substancji jak: lotne kwasy tłuszczowe [Fei i in. 2011], wyłoki jabłkowe [Kulkarni i in. 2013]. Uzyskane wyniki poszerzają zakres potencjalnych surowców stosowanych do produkcji biopaliw.

PODSUMOWANIE

Dotychczas prowadzone badania nad wykorzystaniem drożdży olejogennych wskazują na ich potencjał w procesie biosyntezy tłuszczu, który z powodzeniem może być wykorzystywany do produkcji m.in. biopaliw. Przemysłowa produkcja tłuszczu przy ich udziale wymaga jednak dalszej intensyfikacji prac w tym kierunku. W celu osiągnięcia

korzyści ekonomicznych, w tym przede wszystkim niskich kosztów produkcji, konieczne są innowacyjne rozwiązania głównie na etapie hodowli. Rozwiązania te powinny zmierzać do uzyskania wysokiej wydajności syntetyzowanego tłuszczu z jednostki podłoża, przy jednoczesnym wykorzystaniu jako pożywki łatwo dostępnych, relatywnie tanich i bogatych w węglowodany produktów, takich jak np. rolno-przemysłowe produkty uboczne. W dalszym ciągu istotne jest też prowadzenie badań w skali laboratoryjnej nad doбором odpowiednich szczepów, charakteryzujących się wysoką efektywnością syntezy tłuszczu w zoptymalizowanych warunkach hodowli.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams I.P., Dack S., Dickinson F.M. (2002). The distinctiveness of ATP: citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1597, 36-41
2. Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M., Guebitz G. M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 99, 3051-3056
3. Anschau A., Xavier M. C. A., Hernalsteens S., Franco T. T. (2014). Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, 157, 214-222
4. Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribe Larrea J.-L., Molina-Jouve C., Nicaud J.-M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48, 375-387
5. Błażej S., Gientka I., Bzducha-Wróbel A., Stasiak-Róžańska L., Maszewska M. (2014). Ocena zdolności biosyntezy tłuszczu przez drożdże *Rhodotorula gracilis* w podłożach zawierających ziemniaczaną wodę sokową wzbogaconą glicerolem. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 576, 3-12
6. Chen X., Li Z., Zhang X., Hu F., Ryu D.Y., Bao J. (2009). Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 159, 591-604
7. Chang Y.-H., Chang K.-S., Hsu C.-L., Chuang L.-T., Chen C.-Y., Huang F.-Y., Jang H.-D. (2013). A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. *Fuel*, 103, 711-717

8. Dai C.-C., Tao J., Xie F., Dai Y.-J., Zhao M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, 6 (18), 2130-2134
9. Easterling E. R., French W. T., Hernandez R., Licha M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 100, 356-361
10. El-Fadaly H. A., El-Ahmady El-Naggar N., Marwan E. M. (2009). Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. *Research Journal of Microbiology*, 4 (8), 301-313
11. Fei Q., Chang H. N., Shang L., Choi J., Kim N. J., Kang J. W. (2011). The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 2695-2701
12. Gong Z., Shen H., Yang X., Wang Q., Xie H., Zhao Z. K. (2014). Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for Biofuels*, 7 (158), 1-9
13. Hassan M., Blanc P. J., Granger L.-M., Pareilleux A., Goma G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 31 (4), 355-361
14. Hu C., Zhao X., Zhao j., Wu S., Zhao Z. K. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 100, 4843-4847
15. Hu C., Wu S., Wang Q., Jin G., Shen H., Zhao Z. K. (2011). Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology for Biofuels*, 4 (25), 1-8
16. Huang C., Chen X.-F., Xiong L., Chen X., Ma L. (2012). Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *Bioresource Technology*, 110, 711-714
17. Kolanowski W. (2007). Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 – znaczenie zdrowotne w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, XL, 3, 229-237
18. Kulkarni A., Singh A., Kumbhar B.K., Sahgal M. (2013). Optimization of pomace and banana peel fermentation for production of single cell oil. *Focusing on Modern Food Industry*, 2 (4), 170-178

19. Li Y., Zhao Z., Bai F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 312-317
20. Liang Y., Cui Y., Trushenski J., Blackburn J. W. (2010). Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 7581-7586
21. Makri A., Fakas S., Aggelis G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, 101, 2351-2358
22. Matsakas L., Bonturi N., Miranda E. A., Rova U., Christakopoulos P. (2015). High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 1-6
23. Meesters P. A. E. P., Huijberts G. N. M., Eggik G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 575-579
24. Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34, 1-5
25. Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. (2006). Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 52, 134-142
26. Papanikolaou S., Aggelis G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 82, 43-49
27. Rasoul-Amini S., Montazeri-Najafabady N., Mobasher M. A., Hoseini-Alhashemi S., Ghasemi Y. (2011). *Chlorella* sp.: a new strain with highly saturated fatty acid for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Appl. Energy*, art. in press
28. Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86, 807-815
29. Sitepu I. R., Sestric R., Ignatia L., Levin D., German J. B., Gillies L. A., Almada L. A. G., Boundy-Mills K. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technology*, 144, 360-369

30. Subramaniam R., Dufreche S., Zappi M., Bajpai R. (2010). Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, 37, 1271-1287
31. Suutari M., Priha P., Laakso S. (1993). Temperature shifts in regulation of lipids accumulated by *Lipomyces starkeyi*. *JAOCs*, 70 (9), 891-894
32. Tsigie Y. A., Wang C.-Y., Truong C.-T., Ju Y.-H. (2011). Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1 g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 102, 9216-9222
33. Ward O., Singh A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, 3627-3652
34. Wild R., Patil S., Popovic M., Zappi M., Dufreche S., Bajpai R. (2010). Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technol. Biotechnol.*, 48 (3), 329-335
35. Xue F., Miao J., Zhang X., Luo H., Tan T. (2008). Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*, 99, 5923-5927
36. Yu X., Zheng Y., Dorgan K.M., Chen S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102, 6134-6140