

Jolanta Krzyczkowska^{1*}, Agata Urszula Fabiszewska¹

¹Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w lipcu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia i bioróżnorodność gatunku *Yarrowia lipolytica*. 3. Morfologia i fizjologia drożdży *Yarrowia lipolytica*. 4. Charakterystyka genetyczna *Yarrowia lipolytica*. 5. Biotechnologiczne znaczenie drożdży *Yarrowia lipolytica*. 5.1. Rola drożdży *Yarrowia lipolytica* w biotechnologii żywności. 5.2. *Yarrowia lipolytica* w ochronie środowiska. 5.3. Synteza białek enzymatycznych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. 6. Podsumowanie

***Yarrowia lipolytica* – non-conventional yeast in biotechnology**

Abstract: *Yarrowia lipolytica* is one of the most extensively studied “non-conventional” yeast. It is considered as nonpathogenic and several processes based on this organism were generally recognized as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA, USA). Numerous unique physiological as well as biochemical properties exhibited by these microorganisms allow their wide use in biotechnology of food. High secretory capacity contributes to the production of a number of important metabolites, including organic acids, polyalcohols, carotenoids, aroma compounds, single cell oil or microbial surfactants. The sequenced genome and fairly well studied metabolism of this yeast species allows also for its usage as a model in numerous basic research in the field, including secretory protein, biogenesis of peroxisomes or lipid homeostasis. In this review, we have summarized the potential applications of the yeast *Y. lipolytica*, including the commercialization of some processes. The article provides also a synthetic description of the systematics, morphology and physiology of the species.

1. Introduction. 2. Taxonomy and biodiversity of species of *Yarrowia lipolytica*. 3. The morphology and physiology of the yeast *Yarrowia lipolytica*. 4. Genetic characteristics of *Yarrowia lipolytica*. 5. Biotechnological importance of yeast *Yarrowia lipolytica*. 5.1. The role of the yeast *Yarrowia lipolytica* in the biotechnology of food. 5.2. *Yarrowia lipolytica* in environmental protection. 5.3. Synthesis of enzymes by yeast *Yarrowia lipolytica*. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, drożdże niekonwencjonalne, biosynteza

Key words: *Yarrowia lipolytica*, non-conventional yeast, biosynthesis

1. Wprowadzenie

Yarrowia lipolytica jest jednym z najpowszechniej badanych w ostatnich latach gatunków niekonwencjonalnych drożdży. Mikroorganizmy te są wybitnie tlenowe, produkują wiele ważnych metabolitów i posiadają wysoką zdolność sekrecyjną. Powyższe cechy rzutują na coraz większe biotechnologiczne znaczenie tego gatunku. Aktualnie *Y. lipolytica* znajduje zastosowanie m.in. w syntezie kwasów organicznych, w tym kwasów dikarboksylovych, w syntezie substancji słodzących, karotenoidów, oleju mikrobiologicznego czy związków zapachowych. Za jej pośrednictwem produkowane są również wysokobiałkowe pasze (Skotan S.A.). *Y. lipolytica* należy do drożdży niepatogennych i wielu procesom prowadzonym na komercyjną skalę przy jej udziale Amerykańska Agencja Rządowa Żywności i Leków *Food and Drug Administration – FDA* przyznała status GRAS (*Generally Recognized As Safe*).

Należy wspomnieć, iż z uwagi na wysoką produkcję szeregu enzymów, w tym lipaz, drożdże *Y. lipolytica* stanowią cenne narzędzie w ochronie środowiska.

Z ich udziałem możliwa jest bowiem bioremediacja gleb i wód skażonych olejami, detoksykacja związków aromatycznych czy utylizacja uciążliwych ścieków przemysłu rybnego, olejowego bądź spożywczego.

Mając na względzie coraz większe biotechnologiczne znaczenie tego gatunku, starano się w niniejszym artykule dokonać syntetycznego zestawienia informacji na temat systematyki gatunku, jego morfologii, fizjologii i przede wszystkim możliwości aplikacyjnych. Wskazano, poprzez staranny dobór literatury ostatnich kilkunastu lat, na liczne, aktualnie prowadzone badania nad wykorzystaniem drożdży *Yarrowia*. W artykule wspomniano także o początkach prac badawczych i pierwszych komercjalizacjach procesów z udziałem tego gatunku.

2. Taksonomia i bioróżnorodność gatunku *Yarrowia lipolytica*

Nazwa rodzajowa *Yarrowia* została zaproponowana w 1980 roku przez van der Walt i von Arx. Było to następstwem identyfikacji w 1972 roku przez Davida

* Autor korespondencyjny: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Chemii, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa; tel. (0-22) 59 37 618, e-mail: jolanta_krzyczkowska@sggw.pl

Yarrow z Delft Microbiology Laboratory rodzaju wyróżniającego się charakterystycznym kształtem akso-spor oraz obecnością koenzymu Q-9 [51, 86, 88]. Nazwa gatunkowa „*lipolytica*” pochodzi z kolei od zdolności tych drożdży do hydrolizowania lipidów. *Yarrowia* należy do klasy *Saccharomycetes* i wcześniej znana była pod nazwą *Candida*, *Endomycopsis* lub *Saccharomycopsis lipolytica* [12, 44]. Nieformalnie *Y. lipolytica* zaliczana jest do grupy drożdży niekonwencjonalnych (ang. *non-conventional yeast*), obok takich gatunków jak *Pichia pastoris*, *Pichia guilliermondii* czy *Kluyveromyces lactis*, zaś w odróżnieniu od drożdży *Saccharomyces cerevisiae* czy *Schizosaccharomyces pombe* [81].

Szczepy *Y. lipolytica* powszechnie występują w przyrodzie i są często izolowane z produktów mlecznych, takich jak sery (Camembert, Livarot, Rokpol) czy jogurty; produktów mięsnych, np. kielbas, ze środowisk bogatych w tłuszcze. Spotyka się również szczepy izolowane ze ścieków, gleby oraz środowisk morskich o dużym zasoleniu [12, 28, 51].

W 2014 roku, w bazie CBS [www.cbs.knaw.nl/collections] znanych i zatwierdzonych po genetycznych badaniach było już 38 szczepów *Y. lipolytica*. W przypadku 22 szczepów znany jest geograficzny region ich pochodzenia, w większości są to kraje europejskie: Holandia (4 szczepy); Włochy (3 szczepy); Niemcy (3 szczepy); Norwegia (3 szczepy); Wielka Brytania (1 szczep) i Francja (1 szczep), ale także Rosja (2 szczepy), USA (3 szczepy) i Argentyna (2 szczepy). Izolowano je np. z gleby ($n=7$); węglowodorów (np. *n*-parafin, nafty) ($n=4$); oliwek ($n=2$); odpadów z przetworu kukurydzy ($n=2$); zjełczałych margaryn i majonezów ($n=4$); soku jabłkowego ($n=1$) bądź produktów mlecznych ($n=1$) [34].

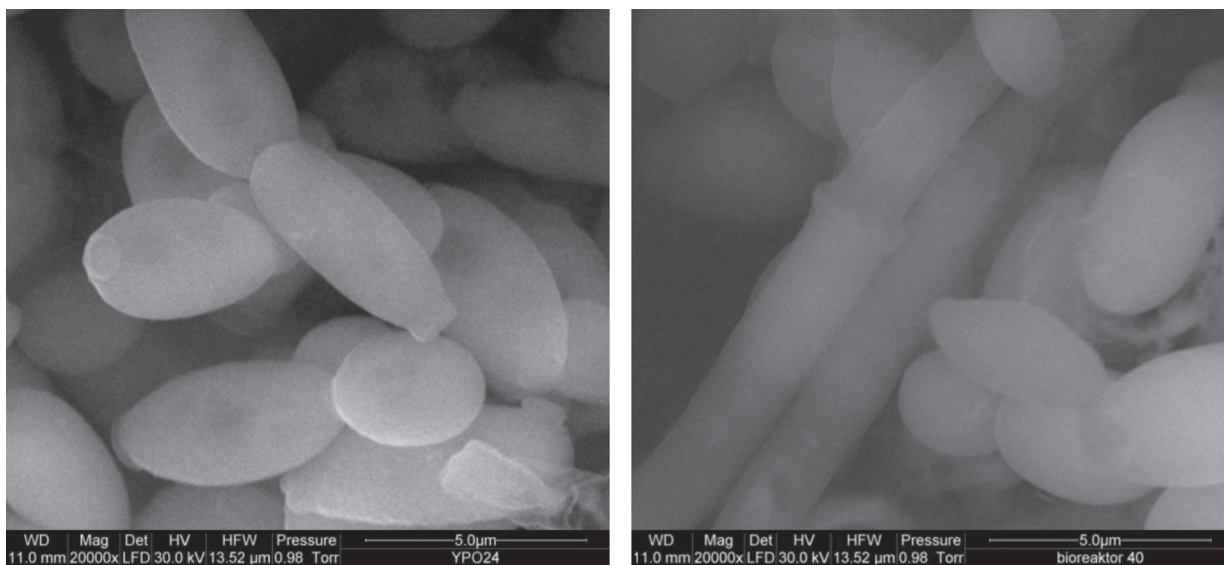
3. Morfologia i fizjologia drożdży *Yarrowia lipolytica*

Komórki drożdży z gatunku *Y. lipolytica* cechują się kształtem kulistym, elipsoidalnym lub wydłużonym, a ich wielkość waha się w granicach $3,0\text{--}5,0 \times 3,3\text{--}15,0 \mu\text{m}$. Ściana komórkowa tych drożdży zbudowana jest z galaktomannanów. Komórki występują pojedynczo lub w niewielkich skupiskach. Kolonie drożdży, rosnące na zestalonym ekstrakcie słodowym, przybierają postać gładką, błyszczącą i charakteryzują się barwą od białej do opalizująco-białej. Należy mieć jednak na względzie to, iż morfologię komórek determinują zarówno warunki środowiskowe, jak i genotyp danego szczepu [44].

Drożdże *Y. lipolytica* zaliczane są do gatunków dimorficznych, co oznacza, że komórki mogą przybierać formę od typowych komórek o sferycznym kształcie, przez pseudogrzybnię (*pseudohyphae*), aż po septowaną grzybnię (*hyphae*) charakterystyczną dla grzybów strzępkowych (Rys. 1) [12, 86].

Szerokość pojedynczej strzępki może wynosić $3,0\text{--}5,0 \mu\text{m}$, a jej długość nawet kilka milimetrów. W każdym segmencie strzępki znajduje się jedno jądro komórkowe, a septa posiada centralnie położone zagłębienie/por, przez które rozciągają się, od jednego do drugiego segmentu, błony retikulum endoplazmatycznego [40].

Y. lipolytica stanowi modelowy organizm do badań nad dimorfizmem drożdży [51]. Do dnia dzisiejszego mechanizm tego zjawiska nie jest bowiem w pełni poznany. Wielu autorów podaje, że dimorfizm jest zależny szczepowo oraz silnie kontrolowany przez warunki środowiska [71]. Aktualnie najintensywniej badane są dwa szlaki sygnałowe związane z dimor-



Rys. 1. Formy morfologiczne szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 (fot. własna).

Zdjęcia komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 wykonano techniką skaningowej mikroskopii elektronowej w Centrum Analitycznym SGGW w Warszawie przy użyciu Elektronowego Mikroskopu Skaningowego Quanta FEI Electron Optics.

fizmem drożdży – szlak kinazy MAP (*mitogen activated protein*) i kinazy białkowej A (PKA) [21]. Udowodniono, iż zmiany w morfologii komórek drożdży *Y. lipolytica* związane są z jednobiegowym wzrostem, asymetrycznym podziałem, obecnością dużych polarnie zlokalizowanych wakuol oraz zahamowaniem separacji komórek po podziale. Tworzenie strzępek obserwuje się zazwyczaj w warunkach ograniczonej dostępności azotu, a także w warunkach stresu termicznego i tlenowego. Badania naukowe dowodzą, iż obecność wielu form morfologicznych jednego mikroorganizmu nie jest korzystne. Wywiera to bowiem negatywny wpływ na przebieg procesów fermentacyjnych, utrudnia ich optymalizację, gdyż wraz ze zmianą form morfologicznych drożdży zmieniają się właściwości reologiczne oraz zaburzeniu ulega transfer ciepła i masy w bioreaktorze [25, 37, 52].

Drożdże *Y. lipolytica* zaliczamy do gatunków heterotallicznych, u których istnieją zarodniki o różnym typie koniugacyjnym, determinowanym przez dwa allele MATA i MATB. Częstotliwość koniugacji u naturalnych izolatów jest bardzo niska (poniżej 1% wszystkich żywych komórek). Sporulacja u tego gatunku drożdży zachodzi nawet w warunkach dużej dostępności źródła azotu, w przeciwieństwie do takich drożdży jak *Saccharomyces cerevisiae*. Szczepy diploidalne tworzą zarodniki w momencie, kiedy w podłożu zostanie wyczerpane źródło węgla, np. glukoza. Najwyższą częstotliwość komórek koniugujących obserwuje się w późnej fazie wzrostu logarytmicznego, a za optymalną temperaturę, w której zachodzi koniugacja uznaje się 20–28°C [81]. W każdym worku może powstać od 1 do 4 askospor, których kształt jest różnorodny, w dużej mierze determinowany koniugującymi ze sobą typami. Wśród szczepów izolowanych naturalnie ze środowiska spotyka się najczęściej komórki haploidalne [12, 44].

Drożdże *Y. lipolytica* są organizmami tlenowymi i nie prowadzą procesów fermentacji. Optymalna temperatura ich wzrostu zawiera się w przedziale 20–28°C, choć obserwuje się również namnażanie tych organizmów w szerszym zakresie temperaturowym: 5–37°C. *Y. lipolytica* rośnie w przedziale pH od 2 do 8, przy aktywności wody rzędu 0,85–0,89. Mikroorganizmy te tolerują dość wysokie zasolenie – do 10–12% w/v NaCl oraz duże stężenie sacharozy w środowisku – nawet ok. 50% w/v [12, 34, 44].

Mikroorganizmy, o których mowa w niniejszym przeglądzie posiadają zdolność do wykorzystywania jako źródła węgla szerokiej gamy substratów. Wśród nich znajdują się m.in.: węglowodany, alkohole, kwasy organiczne oraz związki hydrofobowe (np. alkany, kwasy tłuszczowe oraz triglicerydy) [24].

Spośród węglowodanów *Y. lipolytica* asymiluje heksozy, przede wszystkim glukozę, fruktozę i mannozę. Transport cukrów prostych przez błonę odbywa się

zazwyczaj za pośrednictwem specyficznych przenosi-
ników/białek transportowych zwanych permeazami [30]. W przypadku di- bądź tri- sacharydów konieczna jest wcześniejsza hydroliza tych związków, przeprowadzana na zewnątrz komórki. Nie wszystkie szczepy *Y. lipolytica* tę zdolność jednak posiadają. Udowodniono to na przykładzie sacharozy, która nie jest wykorzystywana przez dzikie szczepy *Yarrowia*, z uwagi na brak zdolności tych mikroorganizmów do syntezy inwertazy – enzymu hydrolizującego wiązania fruktofuranozydowe [61].

Obok węglowodanów, *Y. lipolytica* wykorzystuje również kwasy organiczne. Badania Rodrigues i Pais [67] potwierdziły możliwość wykorzystywania przez te drożdże, jako źródła węgla i energii, kwasów: octowego, mlekowego, propionowego, bursztynowego, jabłkowego czy cytrynowego. Niektóre kwasy karboksylowe mogą mieć jednak inhibitoryczne działanie. Takie cechy w stosunku do komórek *Yarrowia* przejawiają m.in. kwas masłowy i sorbowy. Spowolniony wzrost komórek drożdży może być obserwowany również w przypadku przyswajalnego kwasu octowego, po przekroczeniu 1% stężenia w podłożu [24].

Z uwagi na obecność w komórkach drożdży *Y. lipolytica* enzymów z klasy oksydoreduktaz, źródłem węgla dla tych mikroorganizmów mogą być także alkohole. Drożdże, syntetyzując dehydrogenazę alkoholową, mogą wykorzystywać etanol [11]. Maksymalne stężenie alkoholu w podłożu nie powinno przekraczać jednak 3%, gdyż w wyższych stężeniach działa on na komórki toksycznie [12, 24]. Liczne badania z zakresu metabolizmu drożdży potwierdzają, iż *Y. lipolytica* posiada także zdolność do asymilacji glicerolu [5, 75]. W świecie *Prokaryota* odkryto dwa główne szlaki przemian biochemicznych tego alkoholu. Pierwszy z nich polega na fosforylacji glicerolu przy pomocy kinazy glicerolowej do 3-fosfoglicerolu. Następnie związek ten poprzez działanie dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej zostaje przekształcany w fosfodihydroksyacetone. Fosfodihydroksyacetone może powstawać także w odmiennym szlaku metabolicznym drożdży, w którym początkowo następuje utlenianie glicerolu do dihydroksyacetone, a dopiero w następnym etapie jego fosforylacja [39]. Wykorzystywanie przez drożdże *Y. lipolytica* glicerolu jako źródła węgla może prowadzić do otrzymywania szeregu cennych metabolitów, w tym m.in. kwasu cytrynowego [74], erytrytolu [72, 73], mannitolu [84] bądź lipidów, z dużą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych [58].

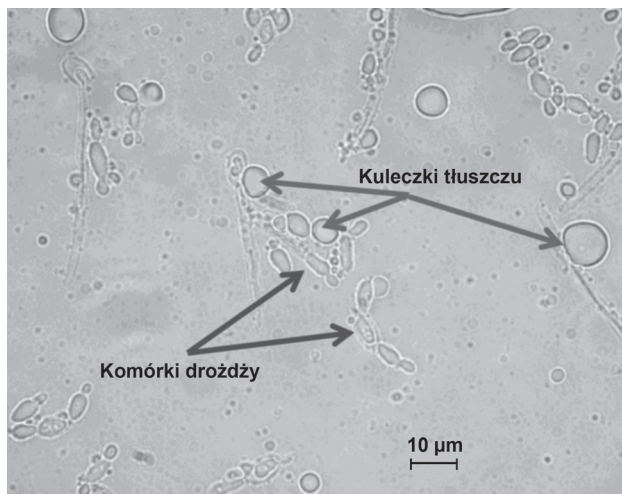
Komórki drożdży *Y. lipolytica* mogą asymilować także substraty hydrofobowe. Do najistotniejszych etapów ich asymilacji należą: pobranie i transport cząsteczek do wnętrza komórki, wstępne terminalne utlenianie cząsteczek alkanów do odpowiednich kwasów tłuszczowych w retikulum endoplazmatycznym

(ER) oraz peroksysomach, aktywacja wolnych kwasów tłuszczowych do odpowiednich estrów acetylo-CoA na drodze β -oksydacji w peroksysomach (na tym etapie może także zachodzić ich akumulacja w postaci lipidów komórkowych) oraz synteza substratów pośrednich cyklu kwasów trikarboksylowych [28].

Triglicerydy są najpierw hydrolizowane do wolnych kwasów tłuszczowych za pośrednictwem syntetyzowanych przez drożdże enzymów lipolitycznych, a następnie pobierane do wnętrza komórek. Alkany wnikają do komórki bezpośrednio, bez wstępnych modyfikacji enzymatycznych. Istnieją dwie hipotezy dotyczące transportu cząsteczek hydrofobowych do wnętrza komórki. Pierwszym etapem asymilacji alkanów jest prawdopodobnie ich emulgacja, którą umożliwia m.in. liposan – glikoproteina o masie 27 kDa, syntetyzowana przez drożdże *Y. lipolytica*. Drugi mechanizm dotyczy zdolności adhezyjnych struktury ściany komórkowej drożdży (Rys. 2) oraz transportu pasywnego drogą dyfuzji.

Drożdże *Y. lipolytica* posiadają zdolność do modyfikacji hydrofobowych właściwości powierzchni komórki i są one w stanie modyfikować zarówno grubość ściany komórkowej, jak i przestrzeni periplazmatycznej oraz tworzyć system wpukleń błony komórkowej, które łączą kanały w ścianie komórkowej, z systemem błon wewnętrznych ER [28].

Asymilacja kwasów tłuszczowych przez drożdże *Y. lipolytica* odbywa się dzięki obecności kilku specyficznych białek transportowych FABP (*fatty acid binding proteins*) oraz syntetaz acylo-CoA (I i II), a cząsteczki alkanów ulegają hydroksylacji przez monooksygenazy cytochromu P-450 [12, 23, 28]. Jak dotąd w komórkach *Y. lipolytica* zidentyfikowano 40 kom-



Rys. 2. Adsorbpcja kuleczek tłuszczowych na powierzchni komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* MTL40-2p namnażanych na podłożu z olejem rycynowym (fot. własna).

Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Carl Zeiss Axioplan 2.

pleksów białkowych, które biorą udział w metabolizmie substratów hydrofobowych [45].

W zależności od warunków środowiska drożdże potrafią kumulować kwasy tłuszczowe w postaci triglicerydów lub estrów steroli, tworząc tzw. ciała lipidowe LB (*lipid bodies*). Ciała lipidowe składają się z hydrofobowego rdzenia zbudowanego głównie z triacylogliceroli, otoczonego pojedynczą warstwą fosfolipidów i związanych z nimi cząsteczek białek [28]. Biosynteza lipidów odbywa się dwiema drogami – *de novo* z prekursorów acetylo- i malonylo-CoA oraz *ex novo* czyli z substratów obecnych w podłożu [13].

4. Charakterystyka genetyczna *Yarrowia lipolytica*

Kompletny genom jądrowy szczepu *Y. lipolytica* E150 (CLIB99) opublikowany został w 2004 roku przez konsorcjum Génolevures, kierowane przez Bernarda Dujon [27, 44].

Zawartość par zasad GC (guanina i cytozyna) w genomie *Y. lipolytica* wynosi 49,6% [44]. Wielkość genomu tych drożdży nie jest stała dla wszystkich szczepów dzikich oraz laboratoryjnych i waha się w zakresie od 12,7 Mb (milionów par zasad) do 22,1 Mb. Genom *Y. lipolytica* koduje 6448 genów, z czego 957 z nich posiada co najmniej jeden intron. Liczba chromosomów wynosi od czterech do sześciu [12, 27].

Drożdże *Y. lipolytica* różnią się znacznie od pozostałych workowców m.in. pod względem zawartości par zasad GC, brakiem polimerazy RNA I, większym rozmiarem snRNA (mały jądrowy RNA, *small nuclear RNA*) i 7S RNA [12]. Kod genetyczny używany w komórkach *Y. lipolytica* wykazuje podobieństwo do tego wykorzystywanego przez komórki *A. niger*, a różni się od kodu genetycznego drożdży *S. cerevisiae* [32]. Drzewo filogenetyczne, zbudowane na podstawie porównania sekwencji genów najbardziej znanych gatunków drożdży, kodujących dobrze zakonserwowane funkcjonalności (jak geny rRNA), umiejscawia gatunek *Y. lipolytica* na oddzielnej w stosunku do pozostałych workowców gałęzi [10, 55].

Geny rDNA drożdży z rodzaju *Yarrowia* cechuje duży polimorfizm oraz rozproszona lokalizacja w genomie [12]. Komórki *Y. lipolytica* nie posiadają plazmidów DNA, natomiast odkryto u nich linearne cząsteczki dsRNA o długości 4,9 oraz 6 kb, podobnie jak w komórkach *S. cerevisiae*. Dodatkowo cząsteczki dsRNA zamknięte są wewnątrz białkowej otoczki przypominającej kapsyd wirusowy. Mimo to nie znaleziono żadnego dowodu na występowanie u tego gatunku fenotypu killerowego [12]. W genomie *Y. lipolytica* odkryto retrotranspozon Ylt1 o długości 9,4 kb, należący do grupy retrotraspozonów *Ty3/gypsy* i posiadający długie powtórzone sekwencje nukleotydów tzw.

LTR (*long terminal repeats*) oraz retrotranspozon Ylli, należący do rodziny L1 i nie posiadający sekwencji tego typu. Elementy transpozonowe biorą udział w rekombinacji homologicznej oraz rearanżacji genomu i szeroko spotyka się je u eukariontów [12, 19, 49, 78].

Genom mitochondrialny szczepu drożdży *Y. lipolytica* W29 opublikowany został w 2001 roku przez zespół naukowców z Niemiec i Francji. Jest to kłosa dwuniciowa cząsteczka DNA wielkości 47,9 kb. Zawartość par zasad GC wynosi 22,7%. Na tej samej nici znajdują się geny: oksydoreduktazy NADH-ubichinon (kompleks I), oksydoreduktazy ubichinon-cytochrom oraz apocytochrom b (kompleks III), oksydazy cytochromowej (kompleks IV), 3 podjednostek syntazy ATP, dużej i małej podjednostki rybosomu i zestaw 27 tRNA. Co ciekawe, kod genetyczny mitochondrialnego genomu *Y. lipolytica* jest typowy dla pleśni, a wśród kodowanych cząsteczek tRNA brakuje tRNA dla argininy rozpoznającej kodon CGN [38].

5. Biotechnologiczne znaczenie drożdży *Yarrowia lipolytica*

Zainteresowanie przemysłowe gatunkiem *Y. lipolytica* rośnie nieustająco od ponad pół wieku, kiedy w latach 60-tych drożdże te badano pod kątem wykorzystania jako źródła białka SCP (*single-cell protein*). Pionierską firmą w tym zakresie było British Petroleum (BP), które rozpoczęło swą działalność w 1957 roku, tworząc z francuską spółką konsorcjum Societé Francaise des Petroles BP. BP opracowało wówczas mikrobiologiczną metodę produkcji białka opartą na wykorzystaniu *n*-parafin. Uruchomiono dwie linie produkcyjne: we Francji, gdzie produkowano białko pod handlową nazwą Toprina L przy zastosowaniu drożdży *Candida tropicalis* oraz w Szkocji, gdzie do produkcji SCP pod nazwą Tropina G wykorzystywano drożdże *Y. lipolytica* [34].

Obecnie komercyjną produkcję biomasy drożdży *Y. lipolytica* wznosiła polska firma Skotan S.A. z siedzibą w Katowicach [<http://www.skotansa.pl/>]. Od 2009 roku spółka produkuje ok. 1200 ton biomasy rocznie. Komórki drożdży namnażane są na podłożu zawierającym w formie źródła węgla odpadowy glicerol i produkty po odsłuzowywaniu olejów roślinnych używanych przy produkcji biodiesla. Firma deklaruje, iż zawartość białka w produkowanych drożdżach paszowych sięga poziomu 41–45%, a w jego skład wchodzi istotne z żywieniowego punktu widzenia aminokwasy, w ilości wyższej niż rekomenduje to FAO/WHO [76]. Aktualnie, przy współpracy z grupą naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Skotan S.A. prowadzi badania nad zdolnościami probiotycznymi i prebiotycznymi drożdży *Y. lipolytica*.

Właściwości fizjologiczne i biochemiczne, w tym wysoka zdolność sekrecyjna przejawiana przez drożdże *Y. lipolytica* stały się podstawą szerokiego biotechnologicznego wykorzystania tych mikroorganizmów, zarówno w procesach biosyntezy, biotransformacji jak i biodegradacji.

5.1. Rola drożdży *Yarrowia lipolytica* w biotechnologii żywności

Na skalę przemysłową, z udziałem drożdży *Y. lipolytica* produkowane są kwasy organiczne, w tym kwasy będące produktami pośrednimi cyklu trikarboksylowego: kwas cytrynowy, izocytrynowy, α -ketoglutarynowy i pirogronowy. Synteza kwasu cytrynowego (CA) przez drożdże *Y. lipolytica* stanowi alternatywną technologię w stosunku do procesów prowadzonych z udziałem grzybów strzępkowych *Aspergillus niger*. Wiele naturalnych szczepów tych drożdży odznacza się dobrą wydajnością i produktywnością tego kwasu [72]. Problemem jest jednak równoczesna produkcja znacznych ilości kwasu izocytrynowego (ICA) (obserwowana szczególnie u dzikich szczepów *Yarrowia*, niezależnie od zastosowanego rodzaju źródła węgla i azotu w podłożu hodowlanym oraz ich wzajemnych proporcji), a także ograniczona zdolność asymilacji cukrów. Dlatego też prowadzone są szerokie badania w kierunku ulepszania cech technologicznych tych mikroorganizmów. Celem uzyskania szczepów o wyższej wydajności produkcji i czystości procesów oraz poszerzenia możliwości wykorzystywania alternatywnych źródeł węgla prowadzone są działania w kierunku mutagenizacji czy hybrydyzacji na drodze fuzji protoplastów. Szczególnie szerokie badania w tym zakresie wykonane były dotychczas m.in. w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stosując różnorodne techniki genetyczne szukano m.in. mutantów z defektami metabolicznymi minimalizującymi uboczną produkcję ICA oraz rekombinantów o poszerzonej zdolności asymilacji cukrów. Przy zastosowaniu klasycznej mutagenizacji z udziałem różnych mutagenów, w tym: promieniowania UV, NTG (nitrozoguanidyny) oraz EMS (metanosulfonianu etylu) otrzymano mutanty *oct-*: A-101; I.31 i K-1 produkujące kwas cytrynowy przy znacząco zmniejszonej produkcji kwasu izocytrynowego (stosunek CA:ICA – 42:1) [66]. Stosunek kwasu cytrynowego do jego izoformy na poziomie 95:5 udało się uzyskać w hodowli *Yarrowia* również zespołowi Kruse i wsp. [41], dzięki amplifikacji w komórkach drożdży genu ICL (liazy izocytrynianowej). Förster i wsp. [31] wskazali z kolei na możliwość obniżenia ilości syntetyzowanego kwasu izocytrynowego nawet poniżej 5% poprzez całkowite pozbawienie szczepu aktywności liazy izocytrynianowej.

Liczne badania naukowe [35, 57, 92, 94] wskazują także na potencjał drożdży *Yarrowia* w biosyntezie ketokwasów: kwasu α -ketoglutazarowego i pirogronowego. Pierwsze wzmianki o zastosowaniu drożdży *Y. lipolytica* do produkcji KGA pojawiły się w 1969 roku, kiedy Tsuga i wsp. opracowali proces biosyntezy KGA, używając jako źródła węgla podłoża z 8% dodatkiem *n*-parafin. Zastosowany szczep – *Candida lipolytica* AJ5004 pozwalał wówczas na otrzymanie 46 g KGA/dm³ w czasie 72 godzin hodowli [26]. Na początku lat siedemdziesiątych Maldonado i wsp. [48] opatentowali syntezę kwasu KGA przez diploidalny szczep *Y. lipolytica*. Aktualne badania z tego zakresu dotyczą m.in. optymalizacji warunków hodowli w kierunku nadprodukcji KGA z glicerolu (szczep *Y. lipolytica* WSH-Z06) [95]; nadekspresji genu kodującego karboksylazę pirogronianową ScPYC1 z *Saccharomyces cerevisiae* i RoPYC2 z *Rhizopus oryzae* w komórkach szczepu *Y. lipolytica* WSH-Z06 [91]; regulacji metabolizmu acetylo-CoA poprzez ekspresję genu ACS1, kodującego syntetazę acetylo-CoA z *S. cerevisiae* oraz genu ACL, kodującego ATP-zależną liazę cytrynianową z *Mus musculus* w komórkach ww. szczepu *Y. lipolytica* [94].

Również kwasy dikarboksyłowe (DCA), takie jak dodekanodiowy (C₁₂) czy brasyłowy (C₁₃) mogą być syntetyzowane z udziałem drożdży *Yarrowia*. Wymienione DCA stanowią istotne półprodukty dla przemysłu chemicznego. Zarówno same kwasy, jak i ich pochodne znajdują bowiem zastosowanie m.in. przy produkcji topliwych żywic, klejów proszkowych, inhibitorów korozji, smarów i plastyfikatorów (środków zmiękcujących). Produkcja DCA na drodze syntezy chemicznej przebiega wydajnie, jedynie dla kwasów o łańcuchu węglowym poniżej 12 atomów węgla. Dlatego też prowadzone są badania nad biotechnologiczną syntezą długołańcuchowych DCA, opartą o biokonwersję kwasów tłuszczowych. Dotychczas podejmowano liczne próby bioprodukcji kwasów dikarboksyłowych przez drożdże *Candida cloacae*, *Candida tropicalis* i *Y. lipolytica*, w oparciu o rozkład alkanów. Pilotażowe badania w tym zakresie prowadziła m.in. japońska firma Ajinomoto Company (1971 r). Szereg badań nad syntezą DCA przez drożdże *C. cloacae* uwidocznili konieczność modyfikacji genetycznych mikroorganizmów, z uwagi na degradację syntetyzowanych DCA i kwasów tłuszczowych w szlaku β -oksydacji. Dodatkowo, w przypadku drożdży *Y. lipolytica* wskazano na kumulację triglicerydów w komórce w postaci ciał lipidowych (*lipid bodies*), co rzutowało na wydajność biokonwersji z uwagi na ograniczoną hydrolizę kumulowanych związków [83].

Athenstedt i wsp. [6] na podstawie licznych badań biochemicznych i proteomicznych zidentyfikowali u drożdży *Y. lipolytica* białka odpowiedzialne za

magazynowanie triglicerydów. Odkryto gen DGA1 (YALI0E32769g) kodujący aktywność acylotransferazy diglicerolowej acyl-CoA oraz gen LRO1 (YALI0E16797g) odpowiedzialny za syntezę białka o domniemanej aktywności acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej. Usunięcie tych dwóch genów przyczyniło się do znacznej poprawy wydajności biosyntezy DCA przez drożdże *Y. lipolytica*.

Nicaud i wsp. [50], w badaniach nad syntezą długołańcuchowych DCA przez wyżej wymienione drożdże, udało się zidentyfikować dodatkowe geny: G3P (dehydrogenaza 3-fosfoglicerolowa), SCP2 (prawdopodobny przenośnik specyficzny steroli, *putative sterol carrier*), oraz IFP 621 IPF, IPF 905 i IPF 2569 (reduktaza NADH-ubichinon). Modyfikacja ich aktywności (poprzez zakłócenia, bądź nadekspresję) pozwoliła na zmniejszenie poziomu kumulacji substratów biokonwersji w obrębie komórek *Y. lipolytica* i umożliwiła syntezę DCA na poziomie ok. 23 g/l w ciągu 130-godzinnej hodowli.

Wspomniana wcześniej zdolność *Y. lipolytica* do kumulacji lipidów przyczyniła się do włączenia tych drożdży do grupy mikroorganizmów oleogennych (czyli zdolnych do kumulacji lipidów w ilości powyżej 20% suchej masy komórki). O ile w przypadku biosyntezy DCA cecha ta nie jest pożądana, o tyle stała się cenna w opracowywaniu technologii otrzymania oleju mikrobiologicznego, czyli tzw. SCO (*single cell oil*). SCO przyciągnął uwagę naukowców, ze względu na możliwość jego stosowania w formie suplementów diety, bądź wykorzystywania przy produkcji biopaliw płynnych. Badania naukowe potwierdziły zdolność wybranych szczepów *Yarrowia* do syntezy tłuszczu, w ilości do 50% suchej masy komórki, z czego ponad 90% stanowią triglicerydy, w skład których wchodzi m.in.: kwas linołowy (ok. 50%), kwas oleinowy (ok. 30%) oraz kwas palmitynowy (ok. 10%) [14]. Tai i Stephanopoulos [82], przeprowadzając modyfikację komórek *Yarrowia* byli w stanie uzyskać nawet 61,7% tłuszczu w suchej masie komórek, po 120 h hodowli.

O praktycznym aspekcie zdolności drożdży oleogennych wspomina Papanikolaou i Aggelis [59] wskazując na możliwość stosowania lipidów syntetyzowanych przez *Yarrowia* w formie substytutów masła kakaowego. Aktualnie komercyjnie, ze zdolności kumulowania lipidów przez *Y. lipolytica* korzysta amerykańska firma DuPont, sprzedająca w formie suplementów diety mikrobiologiczny olej wzbogacony w kwas eikozapentaenowy (EPA), dostępny na rynku pod handlową nazwą New Harvest™ [34].

Inna firma ze Stanów Zjednoczonych – Microba (koncern DSM) podjęła z kolei próbę wykorzystania drożdży *Yarrowia* w syntezie karotenoidów. Doniesienia naukowe [89] i patenty dotyczące syntezy tych związków przez drożdże oleogenne [7, 8, 79] skłoniły

firmę do badań pilotażowych, które zaowocowały wystąpieniem do FDA o status GRAS dla procesu syntezy β -karotenu przez drożdże *Y. lipolytica* [34].

Biotechnologiczne zastosowanie drożdży *Yarrowia* jest szerokie i dotyczy także m.in. syntezy alkoholu cukrowego z grupy polioli – erytrytolu. Związek ten stosowany jest jako dodatek do żywności, pełniący funkcję słodzącą, wzmacniającą smak, utrzymującą wilgoć w produkcie, ale także jako stabilizator, zagęstnik i substancja teksturująca. Od 2003 roku chińska firma Baolingbao Biology Co. z siedzibą w Shandong produkuje erytrytol przy zastosowaniu drożdży *Yarrowia*. Produkt był dotychczas dystrybuowany był w Chinach, Japonii, Korei i Norwegii [34]. Od maja 2011 roku proces produkcji erytrytolu stosowany przez Baolingbao Biologu Co. zyskał status GRAS (http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/GRN000382.pdf).

Liczne badania w zakresie syntezy erytrytolu przez drożdże *Yarrowia* prowadzone są na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Przy okazji prac nad syntezą kwasu cytrynowego odkryto i wyłoniono szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 zdolny do biosyntezy ok. 100 g erytrytolu na dm³ podłoża, przy wzroście na podłożu z dodatkiem odpadowego glicerolu [76, 84].

Obok polioli, *Y. lipolytica* jest w stanie syntetyzować również inne alkohole, np. 2-fenyletanol. Alkohol ten jest cennym komponentem aromatów, cechuje się bowiem przyjemnym, różanym zapachem. Szczep *Y. lipolytica* zdolny do syntezy 2 – fenyletanolu, w ilości ok. 0,6 g/l przy wzroście na pożywce płynnej, zawierającej jako źródło węgla glukozę lub glicerol oraz organiczne źródło azotu w formie m.in. L-fenylalaniny, wyizolował zespół naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu [20].

Od dawna prowadzone są także liczne badania nad syntezą przez *Yarrowia* składników aromatyzujących typu laktonów. Możliwość produkcji cyklicznych estrów na drodze biotransformacji kwasów tłuszczowych przez drożdże (*Candida tropicalis*) odkryto już w 1963 roku [56]. Od momentu tego odkrycia nieustannie podejmowane są próby wykorzystania różnych gatunków mikroorganizmów w wydajnej syntezie laktonów. *Y. lipolytica* okazała się w tym zakresie wdzięcznym mikroorganizmem. Komórki tych drożdży są aktywne w procesie β -oksydacji kwasu rycylowego [(R)-12-hydroksy-9-oktadeka-enowego], z którego finalnie, po cyklizacji otrzymuje się γ -dekalakton – związek charakteryzujący się brzoskwiniowym, morelowym zapachem. Dane literaturowe podają możliwość syntezy przez *Yarrowia* nawet ok. 12,3 g γ -dekalaktonu na dm³ podłoża [1, 87].

Do estrów syntetyzowanych z udziałem drożdży *Y. lipolytica* należy także m.in. octan 2-fenyletylu. Związek ten syntetyzowano z udziałem biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 w zespole prof. Białeckiej-Florjańczyk z SGGW w Warszawie [16].

Kolejną grupą związków zapachowych, możliwych do otrzymania na drodze biotechnologicznej z udziałem komórek *Yarrowia* są lotne C₆–C₉ aldehydy, kreuujące zieloną nutę zapachową (*green note aroma compounds*). Modyfikacja genetyczna drożdży, polegająca na ekspresji systemu liazy wodoronadtlenkowej i lipooksygenazy roślinnej w ich komórkach pozwala na produkcję heksanalu w ilości nawet ok. 0,6 g/l [18, 77].

Zdolność drożdży *Y. lipolytica* do syntezy szeregu związków zapachowych, determinowana m.in. właściwościami lipolitycznymi i proteolitycznymi ma istotne znaczenie w kształtowaniu tekstury, smaku i aromatu produktów mięsnych i mleczarskich, tj. suszonych kiełbas oraz serów różnych typów, w tym m.in. Cheddar, Gouda, Brie czy Camembert. Niektóre szczepy są zdolne do syntezy amin biogennych oraz lotnych związków siarki. Obecnie prowadzone są liczne prace nad zastosowaniem drożdży z rodzaju *Yarrowia* w produkcji nowych kultur starterowych o pożądanym właściwościach przemysłowych i żywieniowych [97].

Do długiej listy substancji syntetyzowanych z udziałem *Yarrowia* należą także bioemulgatory, które stanowią dobrą alternatywę dla surfaktantów syntetycznych, m.in. z uwagi na naturalne pochodzenie, niższą toksyczność, wyższą biodegradowalność oraz często wyższą aktywność w ekstremalnych temperaturach, warunkach pH i zasoleniu [85]. Aktualnie znane są cztery biosurfaktanty produkowane przez *Y. lipolytica*: „Liposan” izolowany z hodowli na heksadekanie [23] „Yansan” syntetyzowany przy namnażaniu komórek na podłożu z glukozą [4] surfaktant „BS-I” otrzymywany z podłoża serwatkowego [90] oraz „Rufisan” produkowany podczas wzrostu mikroorganizmów na oleju sojowym, stanowiącym odpad rafinerijny [70].

5.2. *Yarrowia lipolytica* w ochronie środowiska

Uważa się, iż synteza Yansanu może być przyszłościowo obiecująca przy zastosowaniu drożdży *Yarrowia* w oczyszczaniu tanków przemysłu olejowego oraz w procesach bioremediacji [85]. Z punktu widzenia ochrony środowiska *Y. lipolytica* może odgrywać bowiem istotną rolę zarówno w bioremediacji gleb, jak i wód skażonych olejami, detoksykacji związków aromatycznych (w tym bifenyli, fenolu, dibenzofuranu), biosorpcji metali ciężkich oraz utylizacji ścieków z przemysłu rybnego, olejowego czy spożywczego [9]. Obecnie znane są udane próby stosowania drożdży w doświadczeniach mających na celu bioremediację środowisk zanieczyszczonych odpadami przemysłu tłuszczowego i paliwowego. Szczepy *Yarrowia* W29, CBS 2073 oraz IMUFRJ 50682 wykorzystywano m.in. w utylizacji odpadów pochodzących z procesu tłoczenia oliwy z oliwek i produkcji oleju palmowego [24]. Na aktywności lipolitycznej *Y. lipolytica* bazowano także

podczas usuwaniu biofilmów olejowych na powierzchni wody, gdzie immobilizowane w piankach poliuretanowych komórki drożdży były w stanie wykorzystać ok. 7–9 g oleju/g pianki [54]. Również immobilizowane komórki drożdży *Yarrowia* wykorzystano w modelowych badaniach konstrukcji biosensora wykrywającego alkany o średniej długości łańcuchach, w tym dodekan z limitem detekcji 3 mM [2].

Ciekawe rozwiązanie z punktu widzenia ochrony środowiska przedstawiła belgijska spółka Artechno SA, produkująca liofilizowaną kulturę drożdży i lipaz zewnątrzkomórkowych, pozyskaną z namnażania komórek *Yarrowia* na olejowych substratach odpadowych [28].

Aktywność *Yarrowia* w detoksykacji związków aromatycznych potwierdził z kolei zespół R o m e r o i wsp. [69], izolując szczep *Y. lipolytica* LPS 605 zdolny do biotransformacji bifenylu do 4-hydroksybifenylu i 3,4-dihydroksybifenylu oraz hydroksylacji dibenzofuranu [68]. U szczepu *Y. lipolytica* Y103 obserwowano z kolei zdolność do hydroksylacji fenolu [46]. Udowodniono także zdolność niektórych szczepów *Y. lipolytica* do detoksykacji 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) poprzez redukcję pierścienia aromatycznego oraz bezpośrednią redukcję grup nitrowych [36, 96].

5.3. Synteza białek enzymatycznych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Nie bez znaczenia dla przyszłych komercyjnych zastosowań drożdży *Y. lipolytica* jest ich zdolność do syntezy zewnątrzkomórkowych enzymów, w tym m.in. proteaz: alkalicznej (AEP, EC 3.4.21 – *alkaline extracellular protease*) oraz kwaśnej (AXP, EC 3.4.23 – *acid extracellular protease*). Ich sekrecja regulowana jest w znacznej mierze przez pH środowiska, a wydajność produkcji AEP może wynosić nawet 2 g/dm³ [12, 53, 81]. Istotne znaczenie odgrywa także synteza zewnątrz-

komórkowej RNazy [22], zewnątrzkomórkowej fosfatazy [47], esteraz oraz kilku lipaz.

Aktywność lipolityczna drożdży *Y. lipolytica* została opisana po raz pierwszy przez P e t e r s a i N e l s o n a [62, 63], zaś geny kodujące białka o aktywności lipaz odkryto w ostatnim dziesięcioleciu. Wyróżnia się dwie frakcje lipaz *Y. lipolytica*: zewnątrzkomórkową oraz wewnątrzkomórkową (enzymy znajdujące się w cytozolu oraz związane ze strukturami ściany komórkowej). Lipazy i esterazy gatunku *Y. lipolytica* kodowane są przez rodzinę genów *LIP* (Tab. 1) [28, 29, 60].

Za główną zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną drożdży *Y. lipolytica* odpowiada gen *LIP2* kodujący proenzym lipazy Lip2p, składający się z 334 aminokwasów. Jego aktywacja następuje przez odcięcie odcinka 12 aminokwasów przez endoproteazę kodowaną przez gen *XP R6*. Lipaza Lip2p należy do rodziny lipaz „GX”. To enzym *sn*-1,3-regioselektywny, a produktami reakcji hydrolizy przez nią katalizowanej są głównie 2-monoglicerydy. Podobnie jak lipazy ssaków, nie jest hamowana przez sole żółciowe, wykazuje stabilność przy niskich wartościach pH oraz optimum działania w zakresie pH 6,0–7,5 i w temperaturze 37°C [3, 29, 80]. F i c k e r s i wsp. [28] potwierdzili znaczącą rolę Lip2p w aktywności lipolitycznej gatunku *Y. lipolytica*. Nokaut genu *LIP2* spowodował spadek aktywności lipolitycznej modyfikowanego szczepu o ponad 97% w stosunku do szczepu dzikiego. Co ciekawe, białko enzymatyczne Lip2p nie potrzebuje pełnej glikozylacji, aby zachować znaczną część swojej aktywności [33], a B o r d e s i wsp. [17] sugerują, że mechanizm otwierania „wieczka” lipazy Lip2 jest dwuetapowy. Lipazę Lip2p charakteryzuje wysokie powinowactwo do estrów kwasu oleinowego, zaś lipazy Lip7p oraz Lip8p odpowiednio do estrów kwasu kapronowego (C6) oraz kwasu kaprynowego (C10). Drugą zasadniczą różnicą pomiędzy lipazą Lip2p a lipazami Lip7p i Lip8p jest lokalizacja ich aktywności. Pierwsze białko pod-

Tabela I
Geny kodujące białka o aktywności lipaz i esteraz u gatunku *Y. lipolytica*

Nazwa genu	Nazwa kodowanego białka	Aktywność enzymu	Źródło
<i>LIP1</i>	–	karboksysteraza (EC 3.1.1.1)	[28]
<i>LIP2</i>	Lip2p	lipaza zewnątrzkomórkowa (EC 3.1.1.3)	[64, 65]
<i>LIP3</i>	–	karboksysteraza (EC 3.1.1.1)	[28]
<i>LIP6</i>	–	karboksysteraza (EC 3.1.1.1)	[28]
<i>LIP7</i>	Lip7p	lipaza związana ze ścianą komórkową (EC 3.1.1.3)	[29]
<i>LIP8</i>	Lip8p	lipaza związana ze ścianą komórkową (EC 3.1.1.3)	[28]
<i>LIP9</i>	Lip9	lipaza (EC 3.1.1.3)	[93]
<i>LIP11</i>	Lip11	regioselektywna lipaza (EC 3.1.1.3)	[43]
<i>LIP12</i>	Lip12	niespecyficzna lipaza (EC 3.1.1.3)	[43]
<i>LIP14</i>	Lip14	termostabilna lipaza (EC 3.1.1.3)	[42]

lega intensywnej sekrecji, podczas gdy dwa pozostałe w znacznej mierze pozostają związane ze strukturami ściany komórkowej [28, 64, 65].

Inne lipazy *Y. lipolytica* (Tab. 1) zostały sklonowane i scharakteryzowane, choć wiedza na ich temat jest nadal niewielka. Niewiele wiadomo także na temat lipaz wewnątrzkomórkowych tego gatunku znajdujących się w cytozolu. W ciałach lipidowych zidentyfikowano białko Tgl3, które scharakteryzowano wcześniej jako lipazę wewnątrzkomórkową u drożdży *S. cerevisiae*, ale jego funkcja nie została potwierdzona [6, 15].

6. Podsumowanie

Liczne badania laboratoryjne nad gatunkiem *Yarrowia lipolytica* prowadzone na całym świecie pozwoliły uzyskać duży zasób wiedzy na temat tych mikroorganizmów. Zsekwencjonowany genom i dość dobrze poznany metabolizm drożdży sprawia, że *Y. lipolytica* jest obecnie gatunkiem modelowym w licznych badaniach podstawowych z zakresu: sekrecji białek, biogenezy peroksysomów, badań nad kompleksem I łańcucha oddechowego, dimorfizmem, wykorzystaniem substratów hydrofobowych czy homeostazy lipidowej.

Przytoczone w niniejszym artykule przykłady ukazują, że potencjał zastosowań szczepów drożdży *Y. lipolytica* w różnych gałęziach przemysłu jest ogromny. Opisane technologie, na chwilę obecną w większości ograniczają się jednak do skali laboratoryjnej. Aby nabrały właściwego znaczenia należy podjąć działania w kierunku zwiększenia skali procesów i komercyjnej dostępności.

Piśmiennictwo

- Alchihab M., Destain J., Aquedo M., Thonart P.: Production d'aromes de type lactone par des levures. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 681–691 (2010)
- Alkasrawi M., Nandakumar R., Margesin R., Schinner F., Mattiasson B.: A microbial biosensor based on *Yarrowia lipolytica* for the off-line determination of middle-chain alkanes. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 723–727 (1999)
- Aloulou A., Puccinelli D., De Caro A., Leblond Y., Carrière F.: A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 1446–1456 (2007)
- Amaral P.F., Lehocky M., Barros-Timmons A.M.: Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*, **23**, 867–877 (2006)
- André A., Chatzifragkou A., Diamantopoulou P., Sarris D., Philippoussis A., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Papanikolaou S.: Biotechnological conversions of bio-dieselderived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng. Life Sci.* **9**, 468–478 (2009)
- Athenstaedt K., Jolivet P., Boulard C., Zivy M., Negroni L., Nicaud J.M., Chardot T.: *Proteomics*, **6**, 1450–1459 (2006)
- Bailey R., Madden K.T., Trueheart J.: Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. International Patent WO 2006/102342 A2 (2006)
- Bailey R.B., Madden K.T., Trueheart J.: Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. International Patent WO 2008/042338 A2 (2008)
- Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S.: Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 847–865 (2009)
- Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C., Weisburg W.G.: Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* **173**, 2250–2255 (1991)
- Barth G., Künkel W.: Alcohol dehydrogenase (ADH) in yeast. II. NAD⁺- and NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenases in *Saccharomycopsis lipolytica*. *Z. Allg. Mikrobiol.* **19**, 381–390 (1979)
- Barth G., Gaillardin C.: Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 219–237 (1997)
- 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., 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., Chardot T., Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, **91**, 692–696 (2009)
- Białecka-Florjańczyk E., Krzyczkowska J., Stolarzewicz I., Kapturowska A.: Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **74**, 241–245 (2012)
- Bordes F., Barbe S., Escalier P., Mourey L., André I., Marty A., Tranier S.: Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophys. J.* **99**, 2225–2234 (2010)
- Bourel G., Nicaud J.M., Nthangeni B., Santiago-Gomez P., Belin J.-M., Husson F.: Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehyde. *Enz. Microb. Technol.* **35**, 293–299 (2004)
- Casaregola S., Neuvéglise C., Bon E., Gaillardin C.: Ylli, a non-LTR retrotransposon L1 family in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 664–677 (2002)
- Celińska E., Kubiak P., Białas W., Dziadas M., Grajek W.: *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 389–392 (2013)
- Cervantes-Chávez J.A., Kronberg F., Passeron S., Ruiz-Herrera J.: Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 390–399 (2009)
- Cheng S.C., Ogrydziak D.M.: Extracellular RNase produced by *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **168**, 581–589 (1986)
- Cirigliano M.C., Carman G.M.: Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846–850 (1995)
- Coelho M.A.Z., Amaral P.F.F., Belo I.: *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse (w) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, red. A. Méndez-Vilas, *Formatex*, 2010, s. 930–944.
- Cruz J.M., Domínguez J.M., Domínguez H., Parajó J.C.: Dimorphic behaviour of *Debaryomyces hansenii* grown on barley bran acid hydrolyzates. *Biotechnol. Lett.* **22**, 605–610 (2000)
- Cybulski K., Tomaszewska L., Rywińska A.: Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **11**, 5–14 (2012)

27. Dujon B., Souciet J.L. i wsp.: Genome evolution in yeasts. *Nature*, **430**, 35–44 (2004)
28. Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M.: Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* **5**, 527–543 (2005)
29. Fickers P., Marty A., Nicaud J.-M.: The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **29**, 632–644 (2011)
30. Flores C.L., Rodriguez C., Petit T., Gancedo C.: Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Reviews.* **24**, 507–529 (2000)
31. Förster A., Jacobs K., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G.: Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 861–869 (2007)
32. Gaillardin C., Heslot H.: Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **28**, 161–174 (1988)
33. Grillitsch K., Daum G.: Triacylglycerol lipases of the yeast. *Front. Biol.* **6**, 219–230 (2011)
34. Groenewald M., Boekhout T., Neuveglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W.M., Wyss M.: *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* **40**, 187–206 (2014)
35. Holz M., Otto C., Kretschmar A., Yovkova V., Aurich A., Pötter M., Marx A., Barth G.: Overexpression of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its effect on production of organic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1519–1526 (2007)
36. Jain M.R., Zinjarde S.S., Deobagkar D.D., Deobagkar D.N.: 2,4,6-Trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Mar. Poll. Bull.* **49**, 783–788 (2004)
37. Kawasse F.M., Amaral P.F., Rocha-Leão M.H., Amaral A.L., Ferreira E.C., Coelho M.A.: Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **25**, 371–375 (2003)
38. Kerscher S., Durstewitz G., Casaregola S., Gaillardin C., Brandt U.: The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp. Funct. Genomics.* **2**, 80–90 (2001)
39. Kośmider A., Czaczyk K.: Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol.* **48**, 277–287 (2009)
40. Kreger-van Rij N. J. W., Veenhuis M.: Electron microscopy of septa in ascomycetous yeasts. *Ant. Van Leeuwenhoek.* **39**, 481–490 (1973)
41. Kruse K., Förster A., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G.: Method for biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast *Yarrowia lipolytica*. Patent WO2004/009828. Technische Universität Drezno, Niemcy (2004)
42. Kumari A., Gupta R.: Extracellular expression and characterization of thermostable Lip8, Lip14 and Lip18, from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1733–1739. (2012)
43. Kumari A., Verma V. V., Gupta R.: Comparative biochemical characterization and in silico analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 with Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 3103–3111 (2012)
44. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T.: The yeasts: a taxonomic study, wyd. 5, Elsevier, 2011, tom 1.
45. Lasserre J. P., Nicaud J.-M., Pagot Y., Joubert-Caron R., Caron M., Hardouin J.: First complexomic study of alkane-binding protein complexes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Talanta*, **80**, 1576–1585 (2010)
46. Lee J.S., Kang E.J., Lee D.H., Bae K.S., Kim C.K.: Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 112–117 (2001)
47. López M. C., Domínguez A.: Purification and properties of a glycoprotein acid phosphatase from the yeast form of *Yarrowia lipolytica*. *J. Basic Microb.* **28**, 249–263 (1988)
48. Maldonado P., Desmarquest J., Gaillardin C., Binet D.: Process for getting diploid *Candida lipolytica* strains for alpha-ketoglutarate fermentation. Patent USA nr 3930946. Institute Francaise du Petrole, Francja (1973)
49. Neuveglise C., Chalvet F., Wincker P., Gaillardin C., Casaregola S.: Mutator-like element in the yeast *Yarrowia lipolytica* displays multiple alternative splicings. *Eukaryot. Cell*, **4**, 615–624 (2005)
50. Nicaud J.M., Thevenieau F., Le Dall M.T., Marchal R.: Production of dicarboxylic acids by improved mutant strains of *Yarrowia lipolytica*. Patent US 20100041115 A1. (2010)
51. Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **29**, 409–418 (2012)
52. O’Shea D.G., Walsh P.K.: The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy 2415: a study incorporating image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 316–322 (2000)
53. Ogrzydziak D.M.: Yeast extracellular proteases. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**, 1–55 (1993)
54. Oh Y.S., Maeng J., Kim S.J.: Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 418–423, (2000)
55. Ohkuma M., Hwang C.W., Masuda Y., Nishida H., Sugiyama J., Ohta A., Takagi M.: Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1793–1794 (1993)
56. Okui S., Uchiyama M. and Mizugaki M.: Metabolism of hydroxy fatty acids: 2. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by Genus *Candida*. *J. Biochem.* **54**, 536–540 (1963)
57. Otto C., Yovkova V., Barth G.: Overproduction and secretion of alpha-ketoglutaric acid by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 689–695 (2011)
58. 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)
59. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1052–1073 (2011)
60. Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leão M.H.M., Sant’Anna Jr. G.L.: Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.* **22**, 71–75 (2000)
61. Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H., Sant’Anna G.L.: A stable lipase from *Candida lipolytica*, cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63**, 73–85 (1997)
62. Peters I.I., Nelson F.E.: Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.* **55**, 581–591 (1948)
63. Peters I.I., Nelson F.E.: Preliminary characterization of the lipase of *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.* **55**, 593–600 (1948)
64. Pignède G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.-M.: Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**, 2802–2810 (2000)
65. Pignède G., Wang H., Fudalej F., Seman M., Gaillardin C., Nicaud J.-M.: Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3283–3289 (2000)
66. Robak M.: Studia nad wykorzystaniem octanu I wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Rozprawa habi-

- litacyjna. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu Rozprawy CXCI, 422 (2002)
67. Rodrigues G, Pais C.: The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food Technol. Biotechnol.* **38**, 27–32 (1997)
 68. Romero M.C., Hammer E., Cazau M.C., Arambarri A.M.: Isolation and characterization of biacrylic structure-degrading yeasts: hydroxylation potential of dibenzofuran. *Environ. Pollut.* **118**, 379–382 (2002)
 69. Romero M.C., Hammer E., Cazau M.C., Arambarri A.M.: Selection of autochthonous yeast strains able to degrade biphenyl. *World J. Microb. Biot.* **17**, 591–594 (2001)
 70. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A.: Antimicrobial and adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloid. Surface. B.* **84**, 1–5 (2011)
 71. Ruiz-Herrera J., Sentandreu R.: Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Microbiol.* **178**, 477–483 (2002)
 72. Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W.: Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chem. Pap.* **62**, 239–246 (2008)
 73. Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M.: High yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **31**, 377–380 (2009)
 74. Rywińska A., Rymowicz W., Marcinkiewicz M.: Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Electron. J. Biotechnol.* **13** (2010)
 75. Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W.: Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy*, **48**, 148–166 (2013)
 76. Rywińska A., Tomaszewska L., Rymowicz W.: Erythritol biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast under various culture conditions. *Afr. J. Microbiol. Res.* **7**, 3511–3516 (2013)
 77. Santiago-Gomez M.P., Thanh H.Y., De Coninck J., Cachon R., Kermasha S., Belin J.M., Gervais P., Husson F. Modeling hexanal production in oxido-reducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* **44**, 1013–1018 (2009)
 78. Schmid-Berger N., Schmid B., Barth G.: Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **176**, 2477–2482 (1994)
 79. Sharpe P.L., Ye R.W., Zhu Q.Q.: Carotenoid production in a recombinant oleaginous yeast. International Patent WO 2008/073367 A1 (2008)
 80. Singh A.K., Mukhopadhyay M.: Overview of fungal lipase: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 486–520 (2012)
 81. Spencer J.F., Ragout de Spencer A.L., Laluece C.: Non-conventional yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 147–156 (2002)
 82. 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)
 83. Thevenieau F., Nicaud J.-M., Gaillardin C.: Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* (w) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, red. T. Satyanarayana, G. Kunze: Springer Netherlands, 2009, s. 589–613.
 84. Tomaszewska L., Rywińska A., Gładkowski W.: Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 1333–1343 (2012)
 85. Trindade J.R., Freire M.G., Amaral P.F.F., Coelho M.A.Z., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M.: Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **324**, 149–154 (2008)
 86. Van der Walt J.P., von Arx J.A.: The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Anton. Leeuw.* **46**, 517–521 (1980)
 87. Waché Y., Aguedo M., Nicaud J.M., Belin J.M.: Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 393–404 (2003)
 88. Yarrow D.: Four new combinations in yeasts. *Anton. Leeuw.* **38**, 357–360 (1972)
 89. Ye R.W., Sharpe P.L., Zhu Q.: Bioengineering of Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* for Lycopene Production. Microbial Carotenoids From Fungi. *Method. Mol. Biol.* **898**, 153–159 (2012)
 90. Yilmaz F., Ergene A., Yalcin E., Tan S.: Production and characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from milk factory wastewaters. *Environ. Technol.* **30**, 1397–1404 (2009)
 91. Yin X., Madzak C., Du G., Zhou J., Chen J.: Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1527–1537 (2012)
 92. Yu Z., Du G., Zhou J., Chen J.: Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresour. Technol.* **114**, 597–602 (2012)
 93. Zhao H., Zheng L., Wang X., Liu Y., Xu L., Yan Y.: Cloning, expression and characterization of new lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **33**, 2445–2452 (2011)
 94. Zhou J., Yin X., Madzak C., Du G., Chen J.: Enhanced alpha-ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J. Biotechnol.* **161**, 257–264 (2012)
 95. Zhou J., Zhou H., Du G., Liu L., Chen J.: Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for alpha-ketoglutaric acid production. *Let. Appl. Microbiol.* **51**, 264–271 (2010)
 96. Ziganshin A.M., Gerlach R., Borch T., Naumov A.V., Naumova R.P.: Production of eight different hydride complexes and nitrite release from 2,4,6-trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7898–7905 (2007)
 97. Zinjarde S.S.: Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem.* **152**, 1–10 (2014)