



Synteza polienowych kwasów tłuszczowych przez mikroorganizmy

Jacek Leman

Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Synthesis of polyenoic fatty acids by microorganisms

Summary

The paper presents the possibilities of using some microorganisms as a potential source of biologically active polyenoic fatty acids. The reasons for using microorganisms for this purpose are among others, high yield, invariability of oil composition, independence from traditional agricultural conditions, efficient processing of cheap agro-food substrates and predisposition of microorganisms to biotransformations enabling tailoring of lipids. The following issues were discussed in particular: the methods suitable for the synthesis of specific fatty acids, oils of predicted composition, induced mutagenesis, genetic engineering of microorganisms, addition of inhibitors or activators of fatty acid biosynthesis to the growth medium, enzymatic modification of the oils, and production conditions *ie* recovery and processing of microbial oils.

Key words:

polyenoic fatty acids, oleaginous microorganisms, fatty acids: GLA, DGLA, AA, EPA, DHA, desaturation, elongation.

1. Wprowadzenie

Stwierdzenie niemieckiego filozofa Arthura Schopenhauera: „Zdrowie nie jest wszystkim, ale bez zdrowia wszystko jest niczym” ilustruje przedmiot opracowania. Mikroorganizmy syntetyzują wiele fizjologicznie ważnych składników lipidowych. Wystarczy tylko je wyselekcjonować i dokładnie zbadać.

Olej wytwarzany przez mikroorganizmy i glony nazywa się olejem jednokomórkowców (*single cell oil*, SCO). Jest to triacyloglicerolowy olej, o składzie analogicznym do olejów roślinnych

Adres do korespondencji

Jacek Leman,
Katedra Biotechnologii
Żywności,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Heweliusza 1,
10-718 Olsztyn.

biotechnologia

2 (61) 218-235 2003

i tłuszczów zwierzęcych. Olej taki zawiera polienowe kwasy tłuszczowe (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), tj. długołańcuchowe kwasy tłuszczowe o dwóch lub więcej wiązaniach podwójnych (patrz wykaz skrótów), które pospolicie występują w królestwie roślin i zwierząt. Wśród czterech rodzajów polienowych kwasów tłuszczowych swoiste biologiczne działanie wykazują trzy ich rodziny określane jako n-9, n-6 i n-3, a głównie dwie ostatnie, tj. rodzina kwasu linolowego (n-6) i rodzina kwasu α -linolenowego (n-3). Strukturę tych kwasów określa się zwykle skróconym opisem cyfrowym, w którym pierwsza liczba informuje o ilości węgla w cząsteczce, liczba po dwukropku oznacza liczbę wiązań podwójnych, a ostatnia – określa pozycję pierwszego wiązania podwójnego, licząc od metylowego końca łańcucha. Ostatni człon tego opisu stanowi nazwę rodziny (grupy) kwasów. W celu precyzyjniejszego określenia budowy kwasów tłuszczowych stosuje się dodatkową numerację uwzględniającą miejsce wiązań podwójnych, licząc od węgla grupy karboksylowej, np. zapis 18:3, 6, 9, 12, n-6, oznacza kwas γ -linolenowy.

2. Funkcje biologiczne i występowanie PUFA

Pomimo że w tkankach człowieka i zwierząt może zachodzić desaturacja kwasu stearynowego (C 18:0) do oleinowego (C 18:1, n-9), to ani człowiek ani zwierzęta nie są w stanie syntetyzować niezbędnych kwasów tłuszczowych (*essential fatty acids*, EFA), do których są zaliczane kwasy mające dwa lub więcej wiązań podwójnych, tj. kwasy należące do rodzin n-6 i n-3. Istnieje kilka kryteriów na podstawie których określa się cechę niezbędności kwasów tłuszczowych, w związku z czym grupa tych kwasów jest ciągle przedmiotem sporów. Wszystkie kryteria niezbędności spełnia kwas linolowy, a w niektórych przypadkach niezbędny okazuje się również kwas γ -linolenowy. Większość badaczy uważa, że do grupy niezbędnych kwasów tłuszczowych nie można zaliczyć kwasu arachidonowego (rodzina n-6) oraz kwasów wywodzących się od kwasu α -linolenowego (rodzina n-3). Niezbędność kwasów tłuszczowych należących do rodziny n-6 wynika nie tylko z konieczności ich dostarczenia z pożywieniem, ale również z faktu pełnienia przez te kwasy ważnych funkcji biologicznych, w których mogą być zastąpione tylko częściowo przez kwasy tłuszczowe należące do rodzin n-3 i n-9.

PUFA wchodzi zazwyczaj w skład tłuszczów zapasowych i lipidów błon komórkowych takich jak estry, etery, acyloglicerole, glikolipidy, fosfolipidy, fosfonolipidy, glikosfingolipidy, sulfolipidy i lipoproteiny (1-3). Kwasy te spełniają dwie podstawowe funkcje biologiczne (1-4). W ramach pierwszej uczestniczą w kształtowaniu struktury błon komórkowych, modulowaniu funkcji komórek, tworzeniu ligandów w receptorach na powierzchni błon komórkowych, zakotwiczeniu białek w błonach komórkowych, przekazywaniu i ochronie informacji genetycznej oraz reakcjach odpornościowych komórek. Znaczna część metabolicznych przemian lipidów błon komórkowych jest związana z ich wpływem na procesy transportu wody, jonów i nie-

elektrolitów przez pory i kanały błony zbudowane z dimerowych lub oligomero-
 wych białek transbłonowych zorientowanych częścią hydrofilową do wewnątrz
 i częścią hydrofobową na zewnątrz w kierunku podwójnej warstwy lipidowej. W ten
 sposób PUFA regulują biochemiczną aktywność komórki, procesy transportu i sty-
 mulują reakcje komórki, uczestnicząc w procesach fizjologicznych (metabolizmie li-
 pidów, reakcjach odpornościowych, adaptacji do niskich temperatur, karcynogene-
 zie, chorobach układu krążenia) (5). Jednocześnie PUFA są prekursorami wielu meta-
 bolitów, m.in. prostaglandyn, tromboksanów i hydroksykwasów tłuszczowych, nie-
 zbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu (tab. 1). Niektóre funkcje,
 np. oddziaływania receptorowe, PUFA spełniają pozostając w kompleksie lipido-
 wym, a inne – dopiero po uwolnieniu i przekształceniu w eikozanoidy, diacylgli-
 cerole aktywujące kinazę proteinową C, fosforany inozytoli stymulujące uwalnianie
 jonów wapnia z zapasów wewnątrzkomórkowych oraz lizoalkilofosfatydylocholinę
 metabolizowaną do czynnika aktywującego płytki krwi. Szlak eikozanoidów u ssa-
 ków rozpoczyna się od uwolnienia PUFA z lipidów błony komórkowej przez fosfoli-
 pazy A₂ i C, w następstwie czego w procesach katalizowanych przez enzymy oksy-
 dacyjne: cyklooksygenazy i lipooksygenazy powstają dwie główne grupy metaboli-
 tów, tj. związki cykliczne – prostanoidy (prostaglandyny, tromboksany i prostacy-
 kliny) oraz związki niecykliczne – lipoksyny i leukotrieny (1,6). Kwasy n-3 są kon-
 wertowane do 3-prostanoidów i 5-leukotrienów, a kwasy n-6 do 1- i 2-prostanoidów
 oraz 4-leukotrienów. Eikozanoidy wykazują bardzo szerokie spektrum działania.
 W dużym stopniu regulują czynności układu sercowo-naczyniowego, ciśnienie krwi,
 procesy powstawania zakrzepów wewnątrznaczyniowych, zawartość lipoprotein
 (w szczególności HDL), triacylogliceroli, swoistych białek i lipoproteidów, procesy
 kształtujące odporność ustroju, procesy zapalne, proliferację komórek, aktywność
 hormonów i neuroprzekazników, ekspresję genów, czynności wielu narządów, np.
 nerek i przewodu pokarmowego, procesy odpowiedzialne za odczuwanie bólu
 i wiele innych procesów fizjologiczno-biochemicznych. Potencjalne zastosowanie
 produktów biotransformacji polienowych kwasów tłuszczowych przedstawiono
 w tabeli 2.

Tabela 1

Oddziaływanie fizjologiczne eikozanoidów serii n-3 i n-6 (1)

Układ	Eikozanoidy n-6	Eikozanoidy n-3	Regulowane funkcje biologiczne
1	2	3	4
krążenia	PGI ₂ , TX ₂	PGI ₃ , TXA ₃	zlepianie i agregacja płytek krwi; poziom fibrynogenu i lipi- dów serum; przepuszczalność śródbłonna; rozszerzanie i kurczenie naczyń; ciśnienie krwi
oddechowy	PGE ₂ , PGF _{2α} , TXA ₂ , LTC ₄ , LTD ₄	PGI ₃ , TXA ₃	rozszerzanie i kurczenie oskrzeli; stany zapalne
pokarmowy	PGE ₂ , PGI ₂ , TXA ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄	PGI ₃ , LTB ₅	wydzielanie żółdkowe; ochrona komórek żółdka; pery- staltyka; wydzielanie insuliny i amylazy trzustki

1	2	3	4
moczowy	PGD ₂ , PGE ₂ , PGF _{2α} , PGH ₂ , PGI ₂ , TXA ₂ , LTB ₄	PGE ₃ , PGI ₃ , TXA ₃ , LTB ₅	przepuszczalność kłębuszków i filtracja; rozszerzanie naczyń nerkowych; wydzielanie reniny; wydalanie sodu
odpornościowy	5-HPETE, 12-HPETE, 15-HPETE, PGE ₂ , PGI ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄	LTB ₅	przepuszczalność naczyniowa; reakcja na cytokinę; ekspresja receptora leukocyту; degranulacja leukocyту; agregacja makrofaga i obojętnochłonnej krwinki białej; chemotaksja; wzrost naskórka

Objaśnienie skrótów: 5-, 12- i 15-HPETE – 5-, 12- i 15-kwas hydroperoksyekozaetraenowy; LTA_n, LTB_n, LTC_n i LTD_n – leukotrieny odpowiednio A_n, B_n, C_n i D_n; PGE_n i PGF_n – prostaglandyna odpowiednio E_n i F_n; prostacyklina I_n; TXA_n – tromboksan A_n. Indeksy dolne informują o podklasie eikozanoidów.

Tabela 2

Produkty biotransformacji polienowych kwasów tłuszczowych i ich potencjalne zastosowanie (1)

Polienowe kwasy tłuszczowe	Produkty przemian	Zastosowanie
AA, DHA, DHGLA, DPA, EPA	wolne kwasy, acyloglicerole, fosfolipidy, estry aldehidy, ketony, alkohole leukotrieny, prostaglandyny, tromboksany, prostacykliny, oksylipiny	wzbogacanie żywności, nutraceutyki, produkty prozdrowotne, emulgatory, odżywcze środki lecznicze, nośniki leków, środki lecznicze związki smakowo-zapachowe farmaceutyki – choroby zapalne, rak, niedomagania układu odpornościowego, starzenie organizmu, ginekologia, połoźnictwo
ALA, GLA, LA	wolne kwasy, acyloglicerole, fosfolipidy aldehidy, alkohole, laktony cyklooksykwasy, polihydroksykwasy, epoksyhydroksykwasy hydroksykwasy, ketokwasy, epoksykwasy	produkty prozdrowotne, nośniki leków, terapieutyki związki smakowo-zapachowe i aromatyzujące związki agrochemiczne: przeciwpleśniowe, przeciwbakteryjne, roślinne regulatory wzrostu polimery i żywice specjalnego przeznaczenia, syntetyczne półprodukty

Polienowe kwasy tłuszczowe podlegają w organizmie człowieka wielu przemianom, których początkowym etapem jest naprzemienne wprowadzanie do nich kolejnych wiązań podwójnych przez desaturazy Δ^6 , Δ^5 i Δ^4 oraz wydłużanie łańcucha o dwa atomy węgla przy udziale elongaz.

W przemianach metabolicznych kwasy linolowy (n-6) i α -linolenowy (n-3) współzawodniczą o te same enzymy, dlatego nadmiar kwasu linolowego w pożywieniu hamuje syntezę kwasów EPA (n-3) i DHA (n-3), natomiast stymuluje syntezę kwasu AA (n-6) (patrz wykaz skrótów), w wyniku czego może dojść do zakłócenia równowagi procesów fizjologicznych w organizmie człowieka. Odpowiednia podaż w pożywieniu kwasów z rodziny n-3, a zwłaszcza kwasów EPA i DHA zapobiega nadmiernemu wytwarzaniu kwasu AA w organizmie. W przypadku niedoboru niezbędnych kwasów tłuszczowych wzrasta biosynteza eikozatrienowej pochodnej kwasu oleinowego 20:3, (5,8,11), n-9. Wchodzi ona w skład fosfolipidów błon komórkowych.

wych umożliwiając ich fizykochemiczną stabilizację poprzez oddziaływanie z α -tokoferolem. W tych interakcjach kwas eikoza – (5,8,11), n-9 trienowy może zastąpić kwas AA będący kwasem eikoza tetraenowym – (5,8,11,14), n-6. Może on również podlegać oksygenacji do aktywnych metabolitów (np. 12-OH-20:3 (5,8,10), n-9, wykazujących aktywność tromboksanową, lecz nie jest jednak prekursorem prostaglandyn.

W wydłużaniu łańcucha węglowego kwasów tłuszczowych uczestniczą dwa układy enzymatyczne: biotynozależna karboksylaza acetylo-CoA oraz mitochondrialne i mikrosomalne systemy przyłączające dwie jednostki węglowe z malonylo-CoA. Elongazy nie są głównymi enzymami w biosyntezie polienowych kwasów tłuszczowych, natomiast w stanach niedoboru biotyny enzymem ograniczającym może być karboksylaza acetylo-CoA.

Głównym źródłem olejów o względnie dużej zawartości PUFA-C₁₈ są, jak dotąd, nasiona niektórych roślin zawierające kwasy linolowy i α -linolenowy. Występowanie znacznych ilości niezbędnego kwasu γ -linolenowego (GLA) (patrz wykaz skrótów) jest rzadkie i dotyczy głównie nasion wiesiołka (*Oenothera biennis*, 8-10% GLA), ogórecznika lekarskiego (*Borago officinalis*, 24-25% GLA) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*, 16-17% GLA) (tab. 3). PUFA o długości łańcucha powyżej C₁₈ nie są syntetyzowane w większych ilościach przez rośliny wyższe ze względu na brak układów enzymatycznych koniecznych do wprowadzenia wiązań podwójnych w pozycjach n-6 i n-3. Prozdrowotne oddziaływanie oleju rybiego jest przypisywane obecności kwasów C₂₀ i C₂₂ z rodziny n-3, przede wszystkim kwasom: eikozapentaenowemu (EPA), dokozapentaenowemu (DPA) i dokozaheksaenowemu (DHA) (7). Wadą oleju rybiego są niekorzystne cechy sensoryczne, konieczność usunięcia cholesterolu i potencjalnie toksycznych zanieczyszczeń, zmienna jakość i obecność kwasów tłuszczowych (np. kwasu AA) o właściwościach antagonistycznych w stosunku do kwasów z rodziny n-3 (7). Przypuszcza się, że jeżeli PUFA-n-3 weszłyby do powszechnego użytku jako leki profilaktyczne, to podaż oleju ryb morskich mogłaby okazać się niewystarczająca dla zaspokojenia światowego zapotrzebowania (7).

Tabela 3

Występowanie głównych polienowych kwasów tłuszczowych z rodzin n-3 i n-6 (1)

Kwas	Źródła tradycyjne	Źródła alternatywne
1	2	3
GLA	rośliny: <i>Oenothera</i> , <i>Borago</i> , <i>Ornithogalum</i> sp. (1,3-7,6%)	grzyby strzępkowe: <i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus</i> sp. (3,6-4,5%) glony: <i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> sp. (0,6-1,6%)
AA	ryby: <i>Brevoortia</i> , <i>Clupea</i> , <i>Sardina</i> sp. (0,2-0,6%) tkanki zwierzęce: (0,1-0,3%)	grzyby strzępkowe: <i>Pythium</i> , <i>Mortierella</i> sp. (3,4-6,3%) glony: <i>Porphyridium</i> sp. (1,6-3,6%) mchy: <i>Rhytidiadelphus</i> , <i>Brachyctecium</i> , <i>Eurhynchium</i> sp. (0,7-2,4%)
ALA	rośliny: <i>Brassica</i> , <i>Glycine</i> , <i>Juglana</i> , <i>Linum</i> sp. (4-21%)	glony: <i>Chlorella</i> sp. (0,9-1,7%)

1	2	3
EPA	ryby: <i>Brevoortia</i> , <i>Engraulis</i> , <i>Sardina</i> , <i>Scomber</i> sp. (1,7-6,2%)	grzyby strzępkowe: <i>Mortierella</i> , <i>Pythium</i> sp. (2,9-6,4%) glony: <i>Chlorella</i> , <i>Monodus</i> , <i>Porphyridium</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Cryptoleura</i> , <i>Schizymenia</i> , <i>Navicula</i> sp. (1,8-4,8%) mchy: <i>Brachythecium</i> , <i>Eurhynchium</i> , <i>Scleropodium</i> sp. (0,7-3,1%) bakterie: <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> sp. (0,6-1,7%)
DHA	ryby: <i>Brevoortia</i> , <i>Engraulis</i> , <i>Sardina</i> , <i>Scomber</i> sp. (1,6-7,4%)	grzyby strzępkowe: <i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> sp. (0,9-5%) glony: <i>Gonyaulax</i> , <i>Gyrodinium</i> , <i>Cryptoconidium</i> sp. (2,7-4,1%) bakterie: <i>Rhodopseudomonas</i> sp. (0,6-1,1%)

Liczby w nawiasach podają zawartość kwasów polienowych ogółem w mokrej masie.

Potencjalnymi mikrobiologicznymi producentami PUFA, jak się wydaje, są lądowe i morskie grzyby niższe z rzędu *Mucorales*, szczególnie z rodziny *Phycomycetae*, wytwarzające kwasy GLA, AA, EPA i DHA (patrz wykaz skrótów) (2-4,8-18), jedno- i wielokomórkowe glony z rodzin: *Chlorophyceae* i *Cryptophyceae*, wytwarzające kwasy AA i EPA, *Dinophyceae*, wytwarzające kwasy EPA i DHA (1-4,8-10,19), oraz niektóre morskie *Eubacteria*, wytwarzające kwas EPA (1-4,8,9). Chociaż w świecie mikroorganizmów występuje zdumiewająco duża różnorodność struktur kwasów tłuszczowych (20), tylko niektóre z nich syntetyzują biologicznie ważne kwasy tłuszczowe w wystarczająco dużych ilościach. Należy zaznaczyć, że spadek światowych cen olejów roślinnych i tłuszczów zwierzęcych zmniejsza konkurencyjność olejów z mikroorganizmów. Na korzyść tych ostatnich przemawia jednak to, że są źródłem wysoce specyficznych kwasów tłuszczowych – bardzo drogich, gdy są pozyskiwane z tradycyjnych źródeł lub wręcz w nich nieobecnych.

3. Potencjał „olejodajnych” mikroorganizmów

„Olejodajne” mikroorganizmy mogą być alternatywą dla konwencjonalnych źródeł roślinnych i zwierzęcych, za czym przemawiają następujące argumenty (21,22):

- mikroorganizmy są wyposażone w aktywny aparat syntetyzujący lipidy;
- oleje z mikroorganizmów są produktami o wyższej wartości niż tanie, powszechnie dostępne w handlu oleje: sojowy, palmowy i słonecznikowy;
- produkcja oleju z mikroorganizmów może być prowadzona niezależnie od pory roku i warunków klimatycznych;
- jest możliwa równoczesna synteza lipidów i innych biopreparatów, np. białek, witamin, antyoksydantów, które jako źródło makro- i mikroelementów mogą być przydatne do wzbogacania żywności;
- dobrze rozwinięta technologia fermentacji i nadzwyczaj duża szybkość wzrostu mikroorganizmów w wielu pożywkach pozwalają efektywnie przetwarzać tanie substraty, np. produkty odpadowe przemysłu spożywczego;

- łatwość kontrolowania czynników odżywczych i środowiskowych, za pomocą których można stymulować lub hamować podstawowe etapy biosyntezy kwasów tłuszczowych oraz regulować wydajność lipidów i ich skład;
- predyspozycje mikroorganizmów do biotransformacji (np. oksydacji, desaturacji, uwodornienia) umożliwiającej uszlachetnianie lipidów;
- pomimo mniejszej zawartości lipidów w mikroorganizmach niż w źródłach konwencjonalnych (odpowiednio 2-12% i 1,6-21%) oleje pochodzenia mikrobiologicznego zawierają często znacznie więcej pożądanych kwasów (zazwyczaj 9-80% w porównaniu do 7-33%), co ułatwia ich koncentrację i oczyszczanie, tym samym zmniejszając możliwość powstawania wad zapachowych związanych z zanieczyszczeniami;
- zastosowanie mutantów pozbawionych specyficznych enzymów (np. desaturaz) umożliwia pozyskiwanie lipidów o zaplanowanym składzie;
- „olejodajne” mikroorganizmy są dobrymi gospodarzami dla obcych (roślinnych i zwierzęcych) genów, umożliwiając konstruowanie wydajnych szczepów syntetyzujących PUFA i nietypowe kwasy tłuszczowe;
- prostsza budowa mikroorganizmów niż roślin i zwierząt sprawia, że są dobrym modelem w badaniach biochemii lipidów, kontroli ich metabolizmu i funkcji.

W świetle przedstawionej argumentacji przemysłowa produkcja SCO jest realna. Do jej uruchomienia niezbędne jest spełnienie kilku warunków, m.in. wyselekcjonowanie mikroorganizmów zdolnych do nadprodukcji kwasów tłuszczowych, dobór pożywek, uwzględniający tanie substraty, np. odpady przemysłu spożywczego, selektywna inhibicja enzymów (desaturaz, elongaz), matematyczna optymalizacja środowiskowych i technologicznych warunków bioprodukcji oraz optymalizacja procesów przetwarzania PUFA.

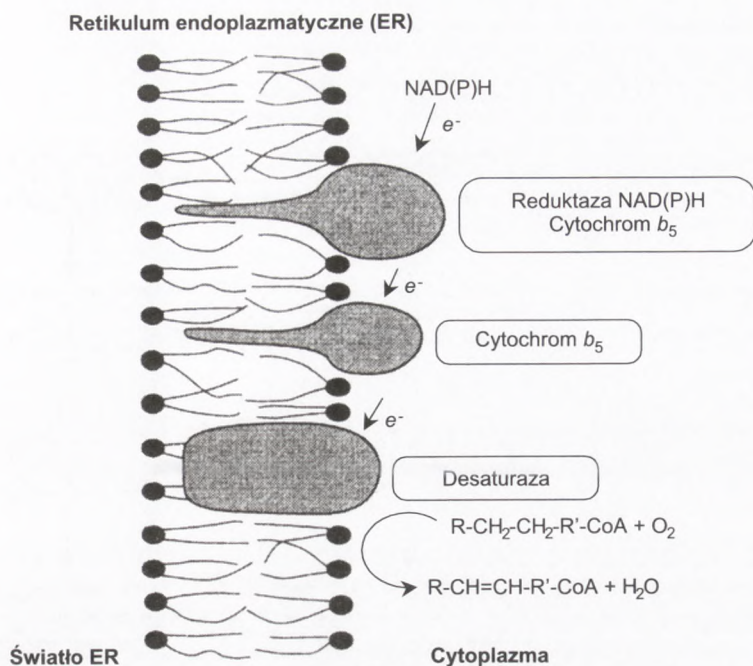
4. Biosynteza PUFA w komórkach drobnoustrojów

Warunkiem upowszechnienia przemysłowej produkcji PUFA przez mikroorganizmy jest poznanie mechanizmów ich biosyntezy w komórce. Główne aspekty metabolizmu lipidów uważa się za powszechnie znane. Generalnie jednak są one jeszcze niedostatecznie wyjaśnione. W biosyntezie uczestniczy kilka podstawowych szlaków (7):

- synteza *de novo* kwasów tłuszczowych z glukozy;
- włączenie egzogennych lipidów bezpośrednio w struktury komórkowych lipidów;
- postępująca desaturacja i elongacja kwasów tłuszczowych.

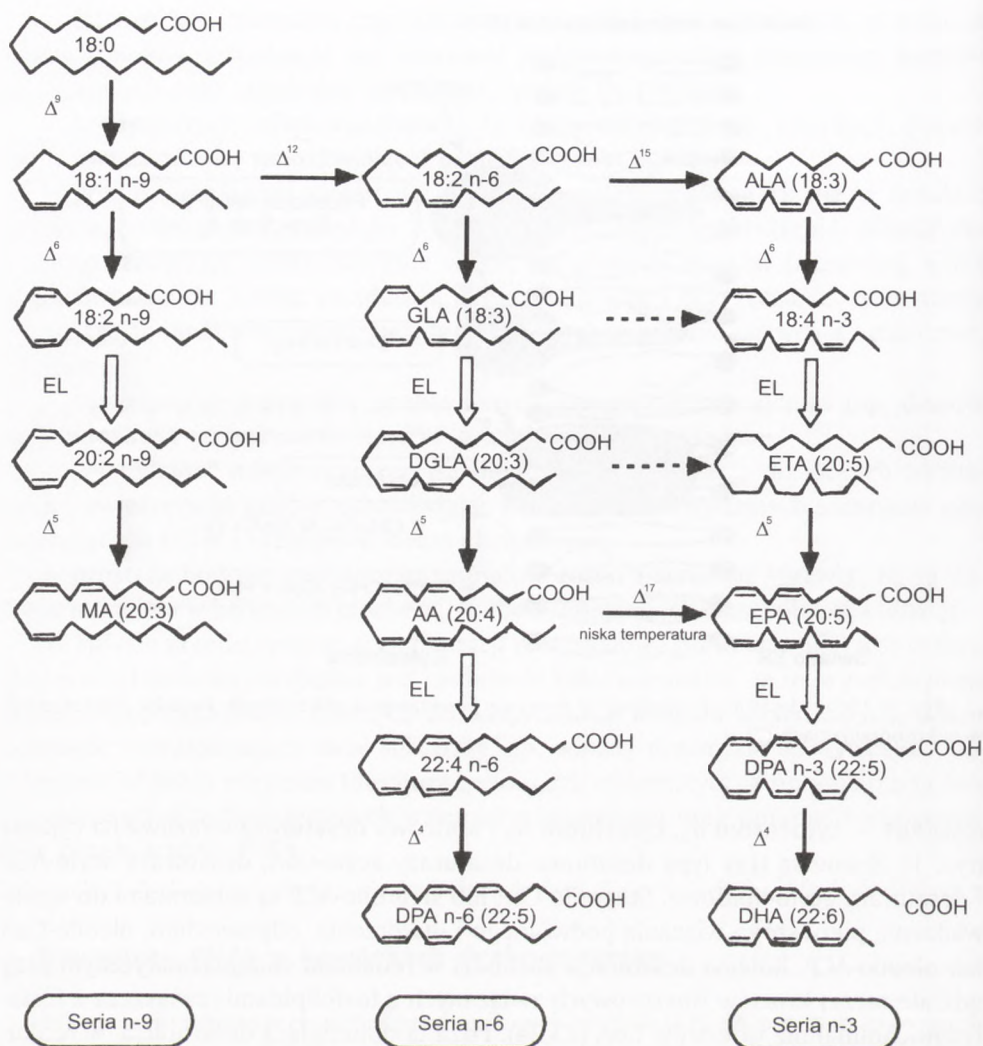
W procesie biosyntezy może również zachodzić biouwodornienie (saturacja) kwasów tłuszczowych i ich częściowa lub całkowita degradacja (β -oksydacja).

Polienowe kwasy tłuszczowe są syntetyzowane w warunkach tlenowych i beztlenowych. W pierwszym przypadku w desaturacji uczestniczą trzy białka: reduktaza



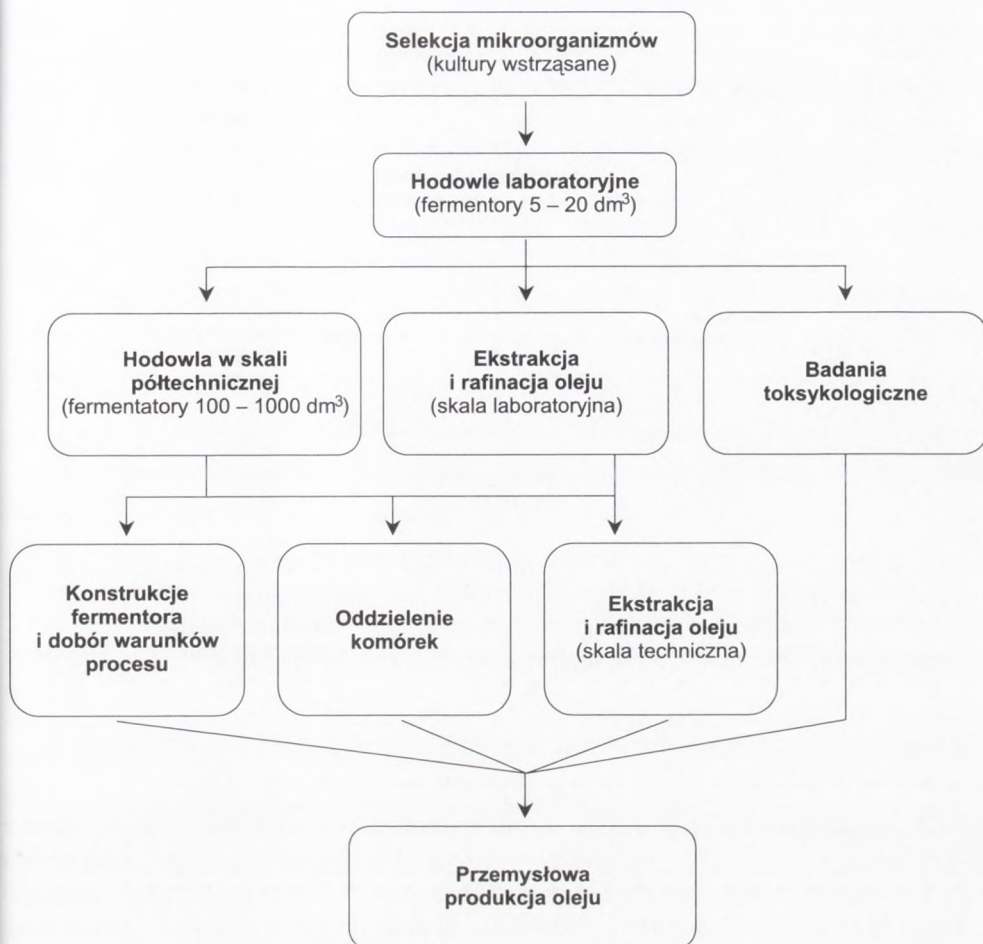
Rys. 1. Układ desaturacji tlenowej w procesie powstawania polienowych kwasów tłuszczowych w mikroorganizmach (7).

NAD(P)H – cytochrom b_5 , cytochrom b_5 i końcowa desaturaza wrażliwa na cyjanki (rys. 1). Znane są trzy typy desaturazy: desaturazy acylo-CoA, desaturazy acylo-ACP i desaturazy acylo-lipidowe. Stearoil-CoA lub stearoil-ACP są substratami do wprowadzenia pierwszego wiązania podwójnego i utworzenia, odpowiednio, oleoil-CoA lub oleoil-ACP. Kolejna desaturacja zachodzi w retikulum endoplazmatycznym przy udziale raczej kwasów tłuszczowych związanych z fosfolipidami (zwłaszcza z fosfatydylocholiną) niż tioestrów CoA (23,24). Poza tą dominującą desaturacją, w retikulum może odbywać się również bezpośrednia konwersja acylo-CoA kwasu tłuszczowego do odpowiedniego PUFA (23). Pierwsze wiązanie podwójne, dominujące w komórkach eukariotów i niektórych bakterii, jest zawsze wprowadzane w pozycji Δ^9 nasyconych kwasów tłuszczowych i dlatego kwasy palmitoleinowy (16:1 cis 9) i oleinowy (18:1 cis 9) są najbardziej pospolitymi monoenami w mikroorganizmach. Kwas oleinowy jest desaturowany przy udziale Δ^{12} desaturazy do kwasu linolowego, który przy udziale Δ^{15} desaturazy ulega konwersji do kwasu α -linolenowego. Te trzy kwasy tłuszczowe są podstawowymi prekursorami rodzin n-9, n-6 i n-3 (rys. 2). Następnymi etapami biosyntezy PUFA są: desaturacja odpowiednich prekursorów kwasów tłuszczowych z udziałem Δ^6 desaturazy, elongacja łańcucha i kolejna desaturacja prowadzące do powstania odpowiednich PUFA- C_{20} i C_{22} (7). Rodzina PUFA n-9 jest syntetyzowana z kwasu oleinowego, z którego po sekwencyjnej Δ^6 desatu-



Rys. 2. Szlaki biosyntezy polienowych kwasów tłuszczowych w mikroorganizmach (7) EL – elongacja; Δ⁴, Δ⁵, Δ⁶, Δ⁹, Δ¹², Δ¹⁵, Δ¹⁷ – desaturacja.

racji, elongacji i Δ⁵ desaturacji powstaje kwas eikozatrienowy (20:3, cis 9, 12, 15, MA). Kwasy tłuszczowe n-6 powstają z kwasu linolowego przez desaturacje (Δ⁶, Δ⁵, Δ⁴) i elongacje do kwasów GLA, DGLA, AA, adrenowego i DPA. Synteza PUFA n-3 w mikroorganizmach przebiega dwoma drogami (22). W pierwszej z nich, niezależnej od temperatury, kwas ALA jest metabolizowany na szlaku n-3 do kwasów EPA, DPA-n-3 i DHA. W drugiej, zależnej od temperatury, następuje konwersja kwasów tłuszczowych n-6 do odpowiednich PUFA n-3 katalizowana przez Δ¹⁵ i Δ¹⁷ desaturazy.

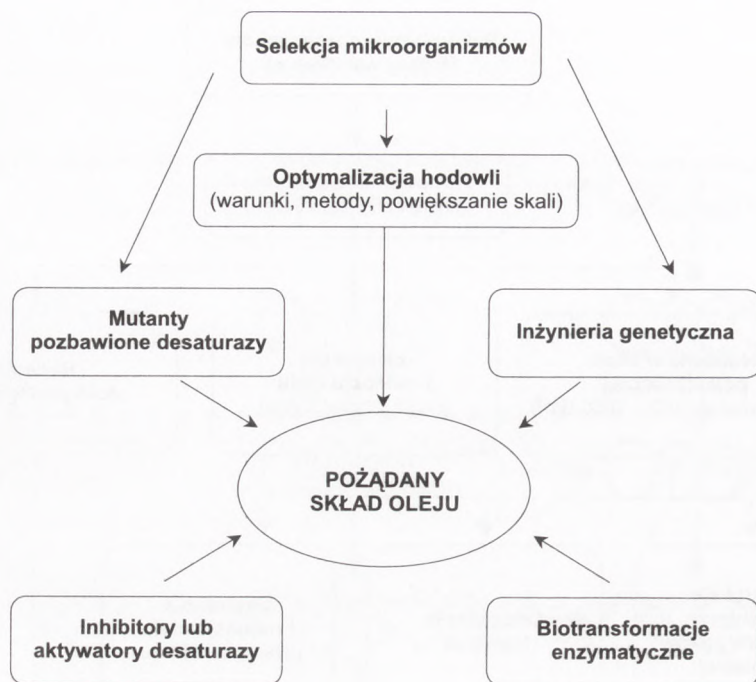


Rys. 3. Schemat produkcji oleju z mikroorganizmów (21).

5. Przemysłowa produkcja PUFA przez mikroorganizmy

Przemysłowy bioprocess obejmuje kilka operacji jednostkowych poczynając od prowadzenia szczepu do rafinacji oleju (rys. 3). PUFA mikroorganizmów można uzyskać metodą fermentacji węgłębnej oraz metodą fermentacji w podłożu stałym (*solid state fermentation*, SSF).

W metodzie węgłębnej trzy podstawowe operacje związane z naturą olejodajnych mikroorganizmów wymagają szczególnej uwagi: fermentacja, separacja komórek, ekstrakcja oleju i jego rafinacja (7,21). Ponieważ w warunkach optymalnych potrzeba aż 5 kg sacharydu do wyprodukowania 1 kg oleju typu triacyloglicerolowego zaleca się stosowanie jako pożywek tanich produktów odpadowych przemysłu spożywczego.



Rys. 4. Strategia w modyfikacji oleju mikroorganizmów (21).

Aby zaspokoić wciąż wzrastające zapotrzebowanie na oleje zawierające aktywne biologicznie kwasy tłuszczowe należy stosować alternatywne strategie w kombinacji z klasycznymi fermentacjami (rys. 4). Przykładowo, metody indukowanej mutagenyzy przy użyciu N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyny, umożliwiające zahamowanie lub aktywację specyficznych desaturaz, są przydatne nie tylko do otrzymywania określonych kwasów tłuszczowych, ale mogą być wykorzystane do śledzenia biosyntezy kwasów tłuszczowych w komórce mikroorganizmu (22). Znane są mutanty pozbawione desaturaz (Δ^5 , Δ^6 , Δ^9 , Δ^{12} , Δ^{15} , Δ^{17}), mutanty o zwiększonej aktywności desaturaz (Δ^5 , Δ^6) lub kombinacje tych mutantów (7,25,26) jak również mutanty pozbawione elongaz (27), syntetyzujące nie tylko więcej swoistych PUFA, ale również PUFA nietypowe dla macierzystego szczepu. Ponadto, takie mutanty mogą wykorzystywać egzogenne kwasy tłuszczowe do otrzymywania docelowych PUFA w dużych ilościach, co jest o tyle istotne, że w przyrodzie spotyka się wiele łatwo dostępnych olejów naturalnych zawierających prekursorów poszczególnych kwasów tłuszczowych.

Innym narzędziem do konstruowania nowych mikroorganizmów syntetyzujących ważne kwasy tłuszczowe jest inżynieria molekularna macierzystych szczepów i ich mutantów (7). Do sterowania składem kwasów tłuszczowych, tj. do zmodyfikowania długości łańcucha lub ilości i pozycji wiązań podwójnych, można wykorzystać trzy współzależne techniki genetyczne: 1) klonowanie genów kodujących

białka uczestniczące w biosyntezie PUFA; 2) transgeniczną ekspresję tych genów; 3) modyfikacje sklonowanych genów w celu konstruowania kodowanych przez nie białek (28). Przykładem takiego rozwiązania może być rekombinant *Saccharomyces cerevisiae*, który w wyniku klonowania i ekspresji genów kodujących Δ^{12} i Δ^6 – desaturazy *Mortierella alpina* syntetyzował zwiększoną ilość kwasu γ -linolenowego.

Kontrola poszczególnych etapów desaturacji przez dodatek inhibitorów lub aktywatorów reakcji do pożywki również umożliwia pożądaną modyfikację kwasów tłuszczowych (1). Wyróżnia się cztery główne typy inhibitorów (7):

- cyklopropanowy kwas sterulinowy, który blokuje działanie Δ^9 desaturazy katalizującej konwersję kwasu stearynowego do kwasu oleinowego oraz estry innych cyklopropanowych kwasów tłuszczowych hamujące Δ^6 , Δ^{12} i Δ^{15} desaturazy (29,30);
- składniki lignanowe – analogi sezaminy, które niewspółzawodniczo hamują Δ^5 desaturazę (31,32);
- alkilowe galusany zawierające specyficzne struktury takie jak pierścień aromatyczny z grupą hydroksylową w pozycji meta i grupą karboksylową zestryfikowaną alkoholem o odpowiedniej długości łańcucha, które niewspółzawodniczo hamują Δ^5 i Δ^6 desaturazy (33);
- kurkuminę [1,7-bis (4-hydroksy-3-metoksy-fenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion], hamującą niewspółzawodniczo Δ^5 i Δ^6 desaturazy (34,35).

Interesującą możliwością strukturyzowania składu kwasów tłuszczowych jest enzymatyczna modyfikacja wstępnie otrzymanego oleju (7). W porównaniu z procesami chemicznymi enzymatyczna biotransformacja umożliwia eliminowanie w łagodnych warunkach niepożądanych koproduktów i sterowanie składem PUFA przez odpowiednią selekcję biokatalizatorów i warunków reakcji (36). Enzymatyczna interstryfikacja jest szczególnie przydatna do modyfikacji triacylogliceroli mikroorganizmów, których wartość odżywcza zależy nie tylko od stopnia nienasycenia, ale również od długości łańcucha acylowego i pozycji poszczególnych kwasów w szkielecie glicerolu (37). Ponadto enzymatyczne włączenie PUFA n-3 w strukturę olejów zawierających PUFA n-6 może być wykorzystane do otrzymania olejów o pożądanym stosunku PUFA n-6/n-3. Alternatywnym rozwiązaniem jest enzymatyczne włączenie PUFA mikroorganizmów do olejów roślinnych i zwierzęcych i tym sposobem wzbogacanie w PUFA tanich olejów przeznaczonych do bezpośredniego spożycia (7).

Utrudniony marketing produktów PUFA otrzymanych metodą wglębną zachęca do upowszechnienia metody SSF, w której mikroorganizmy są namnażane w wilgotnym substracie stałym, pozbawionym wody wolnej. W tych warunkach „olejodajne” mikroorganizmy wytwarzają nie tylko znaczne ilości PUFA, lecz również zmniejszają zawartość składników antyodżywczych (np. kwasu fitynowego) w substratach i hydrolizują biopolimery substratu, dzięki czemu przefermentowana masa o dużej zawartości PUFA może być stosowana jako dodatek do żywności lub paszy (7). Najważniejszymi problemami do rozwiązania w metodzie SSF są: transfer masy w stałym substracie, zarówno tlenu do rozwijających się mikroorganizmów jak i składników odżywczych i enzymów, utrzymanie stałej temperatury fermentacji oraz powiększa-

nie skali. Proces SSF może być atrakcyjny dla produkcji PUFA, gdyż gwarantuje dużą wydajność, skraca czas bioprocesu, wymaga mniejszych reaktorów i jest bardziej przyjazny środowisku ze względu na mniejsze zużycie wody oraz utylizację produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego (38).

6. Przetwarzanie oleju mikroorganizmów

6.1. Ekstrakcja oleju

Dotychczas w biotechnologii lipidów syntetyzowanych przez mikroorganizmy koncentrowano się na selekcji mikroorganizmów i optymalizacji warunków hodowli. Mniej uwagi przywiązywano do ekstrakcji oleju adaptując większość metod ekstrakcyjnych typowych dla materiałów roślinnych i tkanek zwierzęcych. Perspektywy biotechnologicznego pozyskiwania olejów z mikroorganizmów są jednak nierozdzielnie związane z opracowaniem warunków ich odzyskiwania i oczyszczania.

Wybór metody izolacji oleju zależy od natury komórek mikroorganizmów i pożądanego typu ekstraktu. Głównym problemem, wciąż nie do końca rozwiązany, jest lipoliza zachodząca podczas procesu odzyskiwania tłuszczu mikrobiologicznego. Inne zjawiska, np. autooksydatywna degradacja i obecność substancji przeszkadzających, również wymagają rozwiązań. Ekstrakcję olejów mikrobiologicznych przeznaczonych do spożycia prowadzi się rozpuszczalnikami nietoksycznymi, łatwymi w transporcie, bezpiecznymi i tanimi, np. etanolem, n-butanolem, izopropanolem lub heksanem (7,39,40). Chloroform i metanol nie są zalecane ze względu na rakotwórcze działanie pierwszego (41) i uszkadzające wzrok drugiego (40). Olej zawierający duże ilości kwasu GLA zaleca się ekstrahować dwuetapowo etanolem i heksanem (7,42). Taki ekstrakt zawiera jednak duże ilości zanieczyszczeń lipidowych oraz lipaz katalizujących niepożądane reakcje. Droższym (43), ale i wydajniejszym rozwiązaniem jest ekstrakcja nadkrytycznym CO₂, którą w skali półprzemysłowej stosowano do produkcji takiego oleju z grzyba *Cunninghamella echinulata* (44).

Konwencjonalne urządzenie ekstrakcyjne zapewnia 96% wydajność ekstrakcji lipidów i kwasu EPA z grzybni *Pythium irregulare* mieszaniną heksan-izopropanol (39), tj. nieco większą aniżeli ekstrakcja nadkrytycznym CO₂ z grzybni *Mortierella* (45) i *Saprolegnia parasitica* (46).

6.2. Rafinacja oleju

Celem rafinacji oleju z mikroorganizmów jest usunięcie lub przynajmniej zmniejszenie ilości zanieczyszczeń, które mogą niekorzystnie wpływać na jakość produktu i skuteczność jego modyfikacji. Oczyszczanie i koncentrację olejów mikroorganizmów

proceedzi się różnymi metodami stosując np. wymrażanie rozpuszczalnikiem, frakcjonowaną krystalizację, kompleksowanie mocznikiem, rozdziały chromatograficzne i reakcje enzymatyczne, takie jak selektywna hydroliza triacylogliceroli, zawierających PUFA lub selektywna estryfikacja mieszanin kwasów tłuszczowych zawierających PUFA, które są najprostszym sposobem rafinacji (7, 47-49). Destylacja PUFA i ich estrów nie jest natomiast wskazana ze względu na prawdopodobieństwo przemieszczania wiązań podwójnych, stereomutacji, cyklizacji i dimeryzacji w wyższych temperaturach (7).

Oczyszczanie poszczególnych PUFA wymaga optymalizacji warunków koncentracji dla każdego z nich z osobna ze względu na różnice właściwości. Przykładowo, po wstępnym oddestylowaniu kwasów LA i GLA, frakcjonowanie mocznikiem etylowych estrów kwasu DGLA w oleju z grzybów (13,7% DGLA), zwiększyło zawartość tego kwasu do 51,5% (47). Koncentrat kwasu AA o czystości od 78 do 90% można otrzymać z oleju grzybów strzępkowych przez frakcjonowanie mocznikiem, odpowiednio, kwasów tłuszczowych lub ich estrów metylowych (50). Hydroliza oleju *Mortierella* lipazą drożdży zwiększa zawartość kwasu AA we frakcji triacylogliceroli do 60% (37), a jej kombinacja z selektywną estryfikacją kwasów tłuszczowych umożliwiła uzyskanie 75% koncentratu tego kwasu (51). Koncentraty kwasów DGLA lub AA o czystości powyżej 90% można otrzymać metodami: wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (47), chromatograficznego rozdziału na oktadecysilanie (52) i chromatografii cienkowarstwowej w odwróconej fazie (53).

Koncentraty kwasów EPA i DHA otrzymuje się przez kompleksowanie mocznikiem lub frakcjonowaną krystalizację w niskich temperaturach, a następnie ich rozdział (54). W pierwszym rozwiązaniu wykorzystuje się różnice w zdolności do tworzenia kryształów z mocznikiem w zależności od stopnia nienasycenia tych kwasów tłuszczowych (55). Często kompleksowanie mocznikiem roztworu kwasów tłuszczowych jest połączone z rozdziałem metodą HPLC.

Frakcjonowanie mocznikiem mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych *Mortierella* sp. (6,8% GLA) lub estrów etylowych *Mucor circinelloides* (25,1% GLA) umożliwia produkcję oleju o zawartości 97,5% kwasu GLA przy 50-60% odzysku (7,47), a dalsze oczyszczanie tego produktu metodą HPLC zwiększa zawartość kwasu GLA do 99,5% (47). Selektywna estryfikacja n-butanolem katalizowana lipazą zwiększa do prawie 70% zawartość kwasu GLA we frakcji nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych w oleju grzybów strzępkowych (56). Estry metylowe kwasu GLA o 98% czystości uzyskiwano z mieszaniny estrów kwasów tłuszczowych przy użyciu różnych typów Y-zeolitu (57).

Znane procedury otrzymywania kwasu EPA zapewniają wprawdzie dużą czystość produktu, lecz wydajność procesu wynosi zaledwie 43% z powodu małej wydajności koncentracji metodą kompleksowania mocznikiem (54,58). Usprawniono je przez zmianę warunków ekstrakcji i frakcjonowania mocznikiem (w procesie trój etapowym), albo wręcz przez jego pominięcie (w procesie dwuetapowym) (41). Pierwsze rozwiązanie, zastosowane do ekstrakcji lipidów z biomasy *Phaeodactylum tricornutum*, zapewnia wzrost wydajności kwasu EPA do 66% przy 85% odzysku i obejmuje (41): 1) bezpośrednie zmydlanie biomasy dwoma rozpuszczalnikami zawierającymi

KOH (heksan/96% etanol (1:2,5) i 96% etanol); wzrost wydajności na tym etapie osiągnięto wskutek odfiltrowania roztworu mydła od biomasy przed jego ekstrakcją heksanem w celu usunięcia substancji niezmydlonych, 2) frakcjonowanie mocznikiem roztworu zmydlonych kwasów (w 65-70°C), a następnie ich krystalizację (w 28°C), 3) frakcjonowanie metodą HPLC. W procesie dwuetapowym odzyskiwano 100% kwasu EPA o czystości około 94%, lecz po dłuższym czasie procesu i większym zużyciu eluenta niż w procesie trój etapowym (41). Koncentraty kwasów EPA i AA, otrzymane w trójstopniowym procesie z oleju syntetyzowanego przez glony zawierały odpowiednio 97% pierwszego z nich lub 80% – drugiego (59).

Kompleksowanie mocznikiem, jak się wydaje, ma największe znaczenie praktyczne w produkcji koncentratów DHA z oleju syntetyzowanego przez glony (60-63). Proces koncentracji przebiega w dwóch etapach. W pierwszym, triacyloglicerole są hydrolizowane przy użyciu alkoholowego roztworu KOH lub NaOH do kwasów tłuszczowych i niezmydlających się składników (m.in. steroli, witamin A i D), które są usuwane. W drugim etapie wolne kwasy tłuszczowe poddaje się działaniu etanolowego lub metanolowego roztworu mocznika. Nasycone i monoenoowe kwasy tłuszczowe łatwo tworzą związki kompleksowe z mocznikiem i po krystalizacji, w niskiej temperaturze, są usuwane przez filtrację. Maksymalne zawartości PUFA (98,2%) i kwasu DHA (97,1%) we frakcji nie ulegającej kompleksowaniu osiągnano przy stosunku masowym mocznik/kwasy tłuszczowe 3:1 (62).

7. Podsumowanie

W opracowaniu wskazano na przydatność niektórych mikroorganizmów jako potencjalnego źródła aktywnych biologicznie polienowych kwasów tłuszczowych. „Olejodajne” mikroorganizmy mogą znaleźć również zastosowanie do produkcji hydroksy PUFA, prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanów, których chemiczna synteza jest bardzo kosztowna. Zaletą syntezy PUFA przez mikroorganizmy jest duża wydajność, niezmiennosc składu syntetyzowanego oleju, uniezależnienie od tradycyjnych uwarunkowań rolniczych. Za tym rozwiązaniem przemawia rosnące zapotrzebowanie na bioaktywne metabolity. Główną wadą technologii jest ciągle jeszcze duży koszt produkcji, jakkolwiek konkurencyjny w stosunku do tradycyjnych technologii olejów roślinnych i tłuszczów zwierzęcych, ustępujących pod względem jakości metabolitom mikrobiologicznym.

Metodami mutagenезy i inżynierii genetycznej jest możliwe pozyskanie mikroorganizmów transgenicznych, syntetyzujących specyficzny kwas tłuszczowy lub olej o zaplanowanym składzie. Błędem byłoby zatem nie doceniać potencjału mikroorganizmów w tym zakresie. Niezależnie od aspektu ekonomicznego, badania „olejodajnych” mikroorganizmów stymulują postęp naukowy w biochemii lipidów umożliwiając poznanie i regulację szlaków metabolicznych biosyntezy kwasów tłuszczowych.

Wykaz skrótów

N:m (n – x) PUFA: kwas polienowy zawierający **n** atomów węgla w łańcuchu i **m** wiązań podwójnych, w którym pierwsze wiązanie podwójne znajduje się przy **x** atomie węgla licząc od grupy CH₃

Δ^m desaturaza: desaturaza, która wprowadza podwójne wiązanie przy **m** atomie węgla licząc od karboksylowego końca łańcucha kwasu tłuszczowego

AA: kwas arachidonowy (20:4 *cis* 5,8,11,14, n-6)

ALA: kwas α-linolenowy (18:3 *cis* 9,12,15, n-3)

DGLA: kwas dihomogamma-linolenowy (20:3 *cis* 8,11,14, n-6)

DHA: kwas dokozaheksaenowy (22:6 *cis* 4,7,10,13,16,19, n-3)

DPA-n-3: kwas dokozapentaenowy (22:5 *cis* 7,10,13,16,19, n-3)

DPA-n-6: kwas dokozapentaenowy (22:5 *cis* 4,7,10,13,16, n-6)

EDA: kwas eikozadienowy (20:2 *cis* 8,11, n-9)

EPA: kwas eikozapentaenowy (20:5 *cis* 5,8,11,14,17, n-3)

ETA: kwas eikozatetraenowy (20:4 *cis* 8,11,14,17, n-3)

GLA: kwas gamma-linolenowy (18:3 *cis* 6,9,12, n-6)

MA: kwas eikozatrienowy (20:3 *cis* 9,12,15, n-9)

Literatura

- Gill I., Valivety R., (1997), Trends Biotechnol., 15, 401-409.
- Radwan S. S., (1991), Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 421-430.
- Ratledge C., (1993), Trends Biotechnol., 11, 278-284.
- Ratledge C., (1992), in: *Industrial applications of single cell oils*, Eds. Kyle D. J., Ratledge C., American Oil Chemist's Society, Champaign, Il., 1-15.
- Clarke S. D., Jump D. B., (1996), Lipids, 31, S7-S11.
- German J. B., Dillard C. J., Whelan J., (1996), J. Nutr., 126, S1076-S1080.
- Certik M., Shimizu S., (1999), J. Biosci. Bioeng., 87, 1-14.
- Ratledge C., (1994), in: *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*, Eds. Kamel B. S., Kakuda Y., Blackie Academic, London, UK, 235-291.
- Bajpai P., Bajpai P. K., (1993), J. Biotechnol., 30, 161-183.
- Bajpai P., Bajpai P. K., (1992), Biotechnol. Appl. Biochem., 15, 1-10.
- Kennedy M. J., Reader S. L., Davies R. J., (1993), Biotechnol Bioeng., 42, 625-634.
- Yamada H., Shimizu H., Shinmen Y., Akimoto K., Kawashima H., Jareonkitmongkol S., (1992), in: *Industrial applications of single cell oils*, Eds. Kyle D. J., Ratledge C., American Oil Chemist's Society, Champaign, Il., 118-138.
- Kendrick A. J., Ratledge C., (1992), Lipids, 27, 15-30.
- Leman J., (1997), *Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential*, in: *Adv. Appl. Microbiol.*, 43, Eds. Neidleman S. L., Laskin A. I., Academic Press, New York, 195-243.
- Leman J., Brakoniecka-Sikorska A., (1996), Pol. J. Nutr. Sci., 3, 111-120.
- Leman J., (1994), Acta Acad. Agricult. Tech. Olst., Technol. Aliment., 26, 107-122.
- Leman J., (1993), Pol. J. Food Sci. Nutr., 3, 5-22.
- Leman J., (1993), Biotechnologia, 2, 134-153.
- Kyle D. J., (1992), Lipid Technol., 4, 59-64.
- Ratledge C., Wilkinson S. G., (1989), *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London.
- Certik M., Shimizu S., (1999), Agro-Food-Industry Hi-Tech, 1, 26-32.
- Certik M., Sakuradani E., Shimizu S., (1998), Trends Biotechnol., 16, 500-505.
- Kates M., Pugh E. L., Ferrante G., (1984), in: *Membrane fluidity*, Eds. Kates M., Manson L. A., Plenum Publ. Corporation, New York, 379-395.
- Jackson F. M., Fraser T. C. M., Smith M. A., Lazarus C., Stobart A. K., Griffiths G., (1998), Eur. J. Biochem., 252, 513-519.

25. Anamnat S., Tolstorukov I., Kaneko Y., Harashima S., (1998), *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 476-482.
26. Chattopadhyay P., Banerjee K. S., Sen K., (1985), *Can. J. Microbiol.*, 31, 346-351.
27. Dittrich F., Zajonc D., Huhne K., Hoja U., Ekici A., Greiner E., Klein H., Hofmann J., Bessoule J.-J., Sperling P., Schweizer E., (1998), *Eur. J. Biochem.*, 252, 477-485.
28. Ivy J. M., Beremand P. D., Thomas T. L., (1998), *Biotechnol. Genetic Eng. Rev.*, 15, 271-288.
29. Al Dulayymi J. R., Baird M. S., Dale C. M., Grehan B. J., Shortt M. F., (1997), *Tetrahedron*, 53, 1099-1110.
30. Moreton R. S., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 41-45.
31. Shimizu S., Kawashima H., Akimoto K., Shinmen Y., Sugano M., Yamada H., (1992), *Phytochemistry*, 31, 757-760.
32. Shimizu S., Akimoto K., Shinmen Y., Kawashima H., Sugano M., Yamada Y., (1991), *Lipids*, 26, 512-516.
33. Kawashima H., Akimoto K., Shirasaka N., Shimizu S., (1996), *Biochim Biophys. Acta*, 1299, 34-38.
34. Kawashima H., Akimoto K., Jareonkitmongkol S., Shirasaka N., Shimizu S., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 108-110.
35. Shimizu S., Jareonkitmongkol S., Kawashima H., Akimoto K., Yamada H., (1992), *Lipids*, 27, 509-512.
36. Gandhi N. N., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 621-634.
37. Shimada Y., Sugihara A., Maruyama K., Nagao T., Nakayama S., Nakano H., Tominaga Y., (1995), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1323-1327.
38. Lonsane B. K., Saucedo-Castaneda G., Raimbault M., Rousos S., Viniegra-Gonzales G., Ghildyal N. P., Ramakrishna M., Krishnaiah M. M., (1992), *Process Biochem.*, 27, 259-273.
39. O'Brien D., Senske G. E., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 947-950.
40. Hara A., Radin N. S., (1978), *Anal. Biochem.*, 90, 420-426.
41. Cartens M., Molina Grima E., Robles Medina A., Gimenez Gimenez A., Ibanez Gonzalez J., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1025-1031.
42. Certik M., Andrasi P., Sajbidor J., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 357-365.
43. Mishra V. K., Temelli F., Ooraikul B., (1993), *Food Res. International*, 26, 217-226.
44. Certik M., Horenitzky R., (1999), *Biotechnol. Techniques*, 13, 11-15.
45. Sako T., Yokochi T., Sato M., Suzuki O., Haguta T., Sugeta T., Nakazawa N., (1989), U.S. Patent 4 857 329.
46. Cygnarowicz-Provost M., O'Brien D. J., Maxwell R. J., Hampson J. W., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 24-31.
47. Nakajima T., Izu S., (1993), in: *Essential fatty acids and eicosanoids*, Eds. Sinclair A., Gibson R., AOCS Press, Champaign, 57-64.
48. Wanasundara U., Shahidi F., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 945-951.
49. Shishikura A., Fujimoto K., Suzuki T., Arai K., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 961-967.
50. Sajbidor J., Lamacka M., Cista J., Certik M., (1994), *Biotechnol. Techniques*, 8, 561-564.
51. Shimada Y., Sugihara A., Minamigawa Y., Higashiyama K., Akimoto K., Fujikawa S., Komemuchi S., Tominaga Y., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1213-1217.
52. Shinmen Y., (1987), *Eur. Patent Appl.*, 0 276 541.
53. Totani N., (1986), *Eur. Patent Appl.*, 0 223 960.
54. Robles Medina A., Gimenez Gimenez A., Garcia Camacho F., Sanchez Perez J. A., Molina Grima E., Contreras Gomez A., (1995), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 575-583.
55. Haagsma N., van Gent C. M., Luten J. B., de Jong R. W., van Doorn E., (1982), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59, 117-118.
56. Mukherjee K. D., Kiewitt I., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 579-584.
57. Arai M., Fukuda H., Morikawa H., (1987), *J. Ferment. Technol.*, 65, 569-574.
58. Akimoto K., Shinmen Y., Yamada H., Shimizu S., (1990), *European Patent* 0 355 972 A2.
59. Cohen Z., Cohen S., (1991), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 16-19.
60. Nakahara T., Yokochi T., Higashihara T., Tanaka S., Yaguchi T., Honda D., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1421-1426.

61. Yamamura R., Shimomura Y., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1435-1440.
62. Senanayake S. P. J. N., Shahidi F., (2000), *J. Food Lipids*, 7, 51-61.
63. Ratnayake W. M. N., Olsson B., Matthews D., Ackman R. G., (1988), *Fat. Sci. Technol.*, 90, 381-386.