



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska

**Badania nad pozyskiwaniem oleju
mikrobiologicznego z komórek drożdży
olejogennych i możliwością wykorzystania go
jako dodatku do żywności**

Studies on obtaining microbial oil from oleaginous yeast cells and
the possibility of using it as a food additive

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Dr hab. inż. Dorota Nowak

Instytut Nauk o Żywności, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji,

SGGW

Promotor pomocniczy

Dr hab. inż. Agata Fabiszewska

Instytut Nauk o Żywności, Katedra Chemii, SGGW

Warszawa 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 31.01.2025..... Czytelny podpis promotora Dorota Nowak

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 31.01.2025..... Czytelny podpis autora rozprawy Katarzyna Wencelarska

STRESZCZENIE

Badania nad pozyskiwaniem oleju mikrobiologicznego z komórek drożdży olejogennych i możliwością wykorzystania go jako dodatku do żywności

Celem pracy było zbadanie warunków biosyntezy oleju mikrobiologicznego przez drożdże olejogenne z gatunku *Yarrowia lipolytica* w celu pozyskania, z wysoką wydajnością, oleju o pożądanych parametrach jakościowych, z jednoczesną utylizacją wybranych odpadów przemysłowych. Założono również opracowanie koncepcji wykorzystania go w charakterze dodatku do żywności. Badano możliwość wykorzystania produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego: hydrofilowego w formie melasy buraczanej i hydrofobowego w postaci posmażalniczego oleju rzepakowego jako źródeł składników odżywczych niezbędnych do hodowli drożdży.

Analizowano wpływ limitacji źródeł fosforu oraz azotu w podłożu jako strategii stymulacji wydajności biosyntezy oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży. Wykazano, że limitacja źródła fosforu i azotu w hodowli wybranego szczepu sprzyja biosyntezie lipidów w podłożach z hydrofobowym źródłem węgla, a najwyższą wydajność - 47,44%, uzyskano w podłożu mineralnym z jednoczesną limitacją obu składników. Porównano także efektywność ekstrakcji klasyczną metodą ługowania z tzw. metodami niekonwencjonalnymi. Zastosowanie dezintegracji komórek za pomocą ultradźwięków (US), pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) oraz homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH), przy opisanych parametrach, okazało się nieskutecznymi metodami wydobywania lipidów z komórek. Jednak zastosowanie wspomnianych metod jako formy wstępnej obróbki biomasy istotnie zwiększyło wydajność tradycyjnej metody ługowania z 30,1% do 36,5% (PEF) oraz 45,7% (HPH).

Oceniono jakość olejów mikrobiologicznych wyekstrahowanych z biomasy hodowanej w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego. Rodzaj wykorzystanych substratów wpływał na zawartość wybranych pierwiastków w biomacie, steroli oraz na profil kwasów tłuszczowych pozyskanych lipidów mikrobiologicznych. Mikrobiologiczne lipidy pozyskane na drodze okresowej hodowli z zasilaniem podłoża melasą, charakteryzował się najwyższą zawartością steroli (68,40 mg/g), w szczególności ergosterolu (60,16 mg/g). Natomiast olej z okresowej hodowli w podłożu z posmażalniczym olejem rzepakowym, odznaczał się najwyższym udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych (93,34%) oraz był najbardziej stabilny oksydacyjnie, także w porównaniu z olejami roślinnymi. Oleje mikrobiologiczne pozyskane w hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających melasę i posmażalniczy olej nie zawierały metali ciężkich ani wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ilościach przekraczających prawnie ustanowione limity. Zaproponowano wykorzystanie mikrobiologicznych lipidów w formie wyekstrahowanego z komórek oleju mikrobiologicznego, jak i całej, wysuszonej, dezaktywowanej biomasy zasobnej w SCO z hodowli w podłożu z posmażalniczym olejem rzepakowym jako dodatek wzbogacający wartość żywieniową do roślinnego analogu sera dojrzewającego typu Camembert.

Słowa kluczowe – drożdże olejogenne, *Yarrowia lipolytica*, olej mikrobiologiczny, dodatek do żywności, odpadowe źródło węgla

ABSTRACT

Studies on the extraction of microbial oil from oleaginous yeast cells and the possibility of using it as a food additive

The aim of the study was to investigate the conditions of microbial oil biosynthesis by a selected species of oleaginous yeast for the efficient production of oil with the desired quality parameters with simultaneous disposal of selected industrial waste, and to develop a concept for its use as a food additive. The possibility of using hydrophilic: molasses and hydrophobic: post-frying rapeseed oil by-products of the agro-food industry as sources of nutrients necessary for the cultivation of the oleaginous yeast strain *Yarrowia lipolytica* KKP 379 has been investigated.

The effect of limiting phosphorus and nitrogen sources in the culture medium has been analyzed as a strategy for stimulating the efficiency of microbial oil biosynthesis in yeast cells. It was shown that limiting the source of phosphorus and nitrogen in the culture of the selected strain promotes lipid biosynthesis in media with a hydrophobic carbon source, and the highest efficiency (47.44%) was obtained in a mineral medium with simultaneous limitation of both components. The efficiency of extraction by the classical leaching method was also compared with so-called unconventional methods. The use of cell disintegration using ultrasound (US), pulsed electric field (PEF), and high-pressure homogenization (HPH), with the parameters described, proved to be an ineffective method for extracting lipids from cells. However, using the aforementioned methods as a form of biomass pretreatment significantly increased the efficiency of the traditional leaching method from 30.1% to 36.5% (PEF) and 45.7% (HPH).

The quality of oils extracted from biomass cultured in substrates containing selected agro-food industry wastes was also analyzed. The type of substrates used affected the content of selected elements in the biomass, sterols, and the fatty acid profile of the extracted microbial lipids. SCO obtained by through periodic culture with substrate feeding with molasses had the highest sterol content (68.40 mg/g), especially ergosterol (60.16 mg/g). On the other hand, SCO from batch culture in medium with post-frying rapeseed oil, had the highest proportion of unsaturated fatty acids (93.34%) and was the most oxidatively stable, also compared to conventional vegetable oils. Microbial oils obtained by culturing *Y. lipolytica* yeast in media containing molasses and post-frying oil did not contain heavy metals or polycyclic aromatic hydrocarbons in amounts exceeding legally established limits.. The present study proposes the concept of using microbial lipids in the form of microbial oil extracted from cells, as well as whole, dried, heat-inactivated SCO-rich biomass from culture in the medium with post-frying rapeseed oil. A plant-based analog of Camembert-type cheese has been selected as the enriched product.

Key words - oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, microbial oil, food additive, waste carbon source

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i oznaczeń.....	9
Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską	10
WSTĘP.....	11
1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	12
1.1. Mikroorganizmy olejogenne.....	12
1.2. Olejogenne drożdże z gatunku <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
1.3. Biosynteza oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży	15
1.4. Hodowla olejogennych drożdży <i>Y. lipolytica</i>	18
1.5. Ekstrakcja oleju mikrobiologicznego z biomasy	20
1.6. Koncepcja wykorzystania produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego w hodowli drożdży <i>Y. lipolytica</i>	22
2. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE	23
3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	24
3.1. Materiały do badań	24
3.2. Hodowle olejogennych drożdży	24
3.2.1. Hodowle inokulacyjne	24
3.2.2. Hodowle eksperymentalne	25
3.3. Mikroskopia konfokalna.....	27
3.4. Oznaczenie stężenia biomasy drożdży	27
3.5. Ekstrakcja lipidów	27
3.5.1. Niekonwencjonalne metody obróbki biomasy	28
3.6. Parametry kinetyczne hodowli	30
3.7. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących	30
3.8. Oznaczenie pozostałości źródła azotu w podłożach	30
3.9. Analiza składu pierwiastkowego biomasy drożdży	31
3.10. Analiza składu kwasów tłuszczowych olejów mikrobiologicznych	31
3.11. Analiza zawartości steroli	32
3.12. Analiza stabilności oksydacyjnej wyekstrahowanych lipidów	32
3.13. Analiza pozostałości rozpuszczalników w olejach mikrobiologicznych	33
3.14. Przygotowanie i analiza wybranych właściwości roślinnych analogów serów dojrzewających.....	33
3.14.1. Kultury starterowe.....	34
3.14.2. Oznaczenie suchej masy produktów	34

3.14.3. Oznaczenie kwasowości miareczkowej	34
3.14.4. Oznaczenie zawartości białka.....	35
3.14.5. Oznaczenie zawartości i stabilności oksydacyjnej tłuszczu roślinnych analogów sera	35
3.14.6. Oznaczenie zawartości cukrów	35
3.14.7. Charakterystyka mikrobiologiczna roślinnych analogów	35
3.14.8. Analiza zawartości włókna.....	35
3.15. Analiza statystyczna wyników	36
4. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	37
4.1. Badanie stymulacji biosyntezy <i>ex novo</i> lipidów komórkowych metodą limitacji źródeł azotu oraz fosforu.....	37
4.2. Analiza wydajności wybranych metod ekstrakcji lipidów komórkowych	41
4.3. Hodowle drożdży <i>Y. lipolytica</i> w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego.....	45
4.4. Analiza biomasy i wyekstrahowanych z niej olejów mikrobiologicznych pozyskanych na drodze hodowli z wybranymi odpadami przemysłu spożywczego	53
4.5. Wykorzystanie biomasy drożdży olejogennych, jak i wyekstrahowanego z niej oleju mikrobiologicznego w roli dodatku do produktu spożywczego.....	70
5. SPOSTRZEŻENIA I WNIOSKI	76
6. SPIS LITERATURY	78
7. DOROBIEK NAUKOWY	91
8. PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ WRAZ Z OŚWIADCZENIAMI WSPÓŁAUTORÓW	95

Wykaz skrótów i oznaczeń

Symbol	Znaczenie
--------	-----------

SCO	olej mikrobiologiczny (ang. Single Cell Oil)
GRAS	ogólnie uznawany za bezpieczny (ang. generally recognized as safe)
FDA	Agencja ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drugs Administration)
SCP	białko mikrobiologiczne (ang. Single Cell Protein)
NNKT	niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
TAG	triacyloglicerole
CoA	koenzym A
FAD ⁺	dinukleotyd flawinoadeninowy
NAD ⁺	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
FADH	forma zredukowana dinukleotydu flawinoadeninowego
NADH	forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
C/N	stosunek molowy węgla do azotu w podłożu
C/P	stosunek molowy węgla do azotu w podłożu
PEF	pulsacyjne pole elektryczne (ang. pulsed electric field)
US	ultradźwięki (ang. ultrasounds)
HPH	homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. high pressure homogenization)
UFA	nienasycone kwasy tłuszczowe (ang. unsaturated fatty acids)
SFA	nasycone kwasy tłuszczowe (ang. saturated fatty acids)
MUFA	jednonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. monounsaturated fatty acids)
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acids)
VLCFA	bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. very long chain fatty acid)
WWA	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
PDSC	metoda ciśnieniowej różnicowej kalorymetrii skaningowej (ang. pressure differential scanning calorimetry)
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

[P1] Wierzchowska, K.*, Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. Waste and Biomass Valorization, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01516-9>

IF: 3,1; MNiSW₂₀₂₁: 70 pkt.¹

[P2] Wierzchowska, K.*, Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Applied Sciences, 11(24), 11819. doi.org/10.3390/app112411819

IF: 2,838; MNiSW₂₀₂₁: 100 pkt.¹

[P3] Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells? In: Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56) doi.org/10.3390/Foods2022-12959

[P4] Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877. doi.org/10.3390/app122412877

IF: 2,838; MNiSW₂₀₂₂: 100 pkt.¹

[P5] Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688, doi.org/10.1007/s00217-023-04322-w

IF: 3,3; MNiSW₂₀₂₃: 70 pkt.¹

[P6] Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, 105321. doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105321

IF: 4,8 ; MNiSW₂₀₂₄: 70 pkt.¹

Łączna wartość IF:16,876 , liczba punktów MNiSW: 410 pkt.

* autor korespondencyjny

¹ Wartości współczynników Impact Factor poszczególnych publikacji podano w oparciu o dane udostępnione na InCites™ Journal Citation Reports® dn. 23.09.2024 r.; punktację czasopism podano w oparciu o wykazy czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów, stanowiące załączniki do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 stycznia 2024 r. (według roku publikacji).

WSTĘP

Zmiany we współczesnym świecie, będące skutkiem działalności człowieka, stanowią poważne wyzwanie dla przemysłu spożywczego i wszystkich jednostek zaangażowanych w jego funkcjonowanie. Współczesne rozważania, nad tym jak zapewnić dostęp do żywności o pożądanych wartościach odżywczych dla spodziewanej w 2050 roku 10 miliardowej populacji, zmierzają w kierunku zwiększenia produkcji żywności nawet o 60%. Produkcja żywności już dziś jest na tak wysokim poziomie, że możliwości jej zwiększenia upatruje się w żywności pochodzenia mikrobiologicznego. Współcześnie narasta również problem ilości odpadów powstałych w wyniku produkcji żywności, głównie na etapie przetwórstwa. Istnieje więc konieczność integracji produkcji żywności i zasad gospodarki o obiegu zamkniętym.

Drożdże olejogenne, zdolne do kumulacji substancji lipidowych (oleju mikrobiologicznego) w ilości powyżej 20% suchej masy, mogą stanowić zrównoważone źródło żywności. Lipidy otrzymane z biomasy drożdży uważane są za potencjalną alternatywą dla tłuszczów roślinnych czy zwierzęcych. Ze względu na liczne korzyści związane ze spożyciem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, istnieje silna potrzeba opracowania żywności bądź jej składników wzbogaconych w olej mikrobiologiczny, który stanowi źródło tych kwasów.

Cechą charakterystyczną drożdży olejogennych jest możliwość wykorzystania przez nie złożonych źródeł m.in. węgla, co pozwala wykorzystać odpady przemysłu rolno-spożywczego jako tanie substraty do hodowli tych mikroorganizmów. Obecnie brakuje badań dotyczących analizy jakościowej olejów mikrobiologicznych pochodzących z komórek drożdży hodowanych w podłożach odpadowych, co utrudnia ich wykorzystanie w technologii żywności. Brak jest również wiedzy dotyczącej możliwości regulacji biosyntezy lipidów w komórkach z hodowli z hydrofobowymi źródłami węgla. Przemysł spożywczy wciąż nie wykorzystuje olejów mikrobiologicznych pozyskane z komórek drożdży.

Proces zagospodarowania odpadów, poprzez wykorzystanie ich jako składników podłoża w procesach biotechnologicznych z jednoczesną ich waloryzacją poprzez pozyskanie mikrobiologicznych olejów o cennych właściwościach żywieniowych, jest wartym uwagi rozwiązaniem, pozostającym w zgodzie z zasadami zrównoważonego rozwoju.

1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1.1. Mikroorganizmy olejogenne

W przypadku większości mikroorganizmów lipidy stanowią zwykle od 6 do 8% suchej masy komórki [Schulze i wsp. 2014]. Istnieją jednak gatunki posiadające zdolność wewnątrzkomórkowej kumulacji substancji lipidowych powyżej 20% suchej masy komórkowej i klasyfikowane są jako drobnoustroje olejogenne. Do tej szczególnej grupy zalicza się zarówno mikroorganizmy eukariotyczne: pleśnie, drożdże oraz algi, jak i prokariotyczne bakterie, a zgromadzone wewnątrz komórek lipidy, nazywane są olejami mikrobiologicznymi lub olejami organizmów jednokomórkowych (ang. single cell oil - SCO) [Poontawee i wsp. 2023].

Porównując mikroorganizmy olejogenne, bakterie charakteryzuje wysokie tempo wzrostu, jednak tylko nieliczne gatunki posiadają zdolność wewnątrzkomórkowej kumulacji tłuszczu. Ponadto, lipidy są silnie związane z błoną komórkową bakterii, co znacząco utrudnia proces ich ekstrakcji [Bao i wsp. 2021, Qadeer i wsp. 2017]. Produkcja oleju mikrobiologicznego przez mikroalgi związana jest z koniecznością zapewnienia wymagających warunków hodowli. Szczególnie ważna jest odpowiednia intensywność naświetlenia, a trudności wynikają z jej zmienności w ciągu dnia i zależności od aktualnej pory roku [Ratlidge i Cohen 2008]. Rozwiązaniem pozwalającym na częściowe obniżenie kosztów hodowli alg na dużą skalę jest hodowla w otwartych, niesterylnych zbiornikach. Problem stanowi wówczas brak możliwości kontroli parametrów hodowli, co może skutkować obniżeniem wydajności procesu [Yap i Chen 2001, Ratlidge i Cohen 2008].

Hodowla olejogennych drożdży może być prowadzona w bioreaktorach, co sprawia, że jest stosunkowo łatwa do skalowania, a do wzrostu biomasy nie jest wymagane promieniowanie świetlne, jak w przypadku alg [Sawangkeaw i Ngamprasertsith 2013]. Mikroorganizmy te wykazują niskie wymagania pokarmowe, a ich hodowla pozostaje niezależna od klimatu czy sezonowych uwarunkowań, jak ma to miejsce przy przypadku mikroalg. Drożdże olejogenne uważane są za jedno z najlepszych narzędzi do mikrobiologicznej produkcji lipidów ze względu na wysokie tempo wzrostu, przy stosunkowo wysokiej zawartości substancji lipidowych w biomasie [Beopoulos i wsp. 2011]. Poprzez zmianę warunków hodowli możliwa jest zmiana profilu kwasów tłuszczowych w oleju mikrobiologicznym [Bao i wsp. 2021]. Dodatkowo, komórki drożdży są w stanie wykorzystywać do wzrostu zarówno proste, jak i złożone substraty

[Wierzchowska i wsp. 2021, Wen i Li, 2022]. Drożdże charakteryzuje wyższa tolerancja na obecne w środowisku jony metali, w porównaniu do pleśni, oraz większy rozmiar komórek niż u bakterii, co potencjalnie może usprawnić proces ekstrakcji. Ponadto, większość gatunków jest stosunkowo podatna na modyfikacje genetyczne, co stanowi istotny element badań nad poprawą wydajności biosyntezy tłuszczu przez wybrane szczepy [Sreeharsha i Mohan 2020, Wen i Al Makishah 2022].

Obecnie przyjmuje się, że na 1958 znanych gatunków drożdży, około 160 (8,2%) to gatunki olejogenne [Boekhout i wsp. 2022]. Do rodzajów obejmujących największą liczbę gatunków olejogennych zaliczane są: *Candida* (18 gatunków), *Rhodotorula* (12 gatunków), *Lipomyces* (12 gatunków), *Yarrowia* (8 gatunków), *Naganishia* (8 gatunków), *Cyberlindnera* (6 gatunków), *Filobasidium* (6 gatunków), *Rhodospiridiobolus* (6 gatunków), *Trichosporon* (6 gatunków) oraz *Cryptococcus* (6 gatunków) [Poontawe i wsp. 2023, Schulze i wsp. 2014]. Ponadto stwierdzono, że zdolność kumulacji lipidów i profil kwasów tłuszczowych są zależne od szczepu, a wydajność kumulacji SCO może różnić się pomiędzy szczepami w obrębie danego gatunku [Sapsirisuk i wsp. 2022 Polburee i wsp. 2015].

1.2. Olejogenne drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica, modelowy gatunek drożdży olejogennych, w latach sześćdziesiątych XX wieku po raz pierwszy został sklasyfikowany jako *Candida lipolytica* [Groenewald i wsp. 2014], a nazwa gatunku *lipolytica* skojarzona została z wysoką aktywnością lipolityczną mikroorganizmu [Bao i wsp. 2021]. W 1970 roku, na podstawie obserwacji askospor prowadzonych przez Davida Yarrowa, przemianowano nazwę gatunku na *Endomycopsis lipolytica*, a w 1972 r. na *Saccharomycopsis lipolytica*. Od nazwiska badacza, w 1980 roku zaproponowana została nazwa rodzajowa *Yarrowia* [Bao i wsp. 2021].

Gatunek *Y. lipolytica* zaliczany jest do grupy drożdży niekonwencjonalnych, które cechuje potencjał do szerszych i nowych zastosowań biotechnologicznych, w porównaniu z tradycyjnie wykorzystywanymi drożdżami piekarniczymi, winiarskimi czy piwowarskimi, takimi jak *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* [Spencer i wsp. 2002]. Drożdże niekonwencjonalne wykazują lepsze zdolności adaptacyjne w zmiennych warunkach środowiskowych oraz są w stanie metabolizować nietypowe źródła węgla, syntetyzując przy tym wiele unikalnych związków chemicznych [Pawlikowska i Kręgiel 2017].

Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* są w stanie asymilować zarówno substraty hydrofilowe (m.in. glukoza, glicerol, alkohole i octany) jak i hydrofobowe (np. kwasy tłuszczowe, triacyloglicerole i alkany) [Liu i wsp. 2015A]. Szczepy tego gatunku izolowane były z produktów mlecznych (np. jogurty, sery Rokpol i Camembert) [Szczepaniak i Wojtatowicz 2011, Roostita i Fleet 1996], mięsa, suchych fermentowanych kielbas, ryb, sosu sojowego [Patsios i wsp. 2020, Flores i wsp. 2015], sałatki z krewetek [Liu i wsp. 2015], drobiu [Deak i wsp. 2000] oraz środowisk bogatych w węglowodory czy tłuszcze [Hassanshahian i wsp. 2012]. Komórki mają kulisty, elipsoidalny lub wydłużony kształt i są zaliczane do gatunków dimorficznych, zdolnych do przybierania różnych form, od typowo kulistych po pseudogrzybnię, a nawet formy przypominające grzybnię septowaną [Wierzchowska i wsp. 2022]. Gatunek zdolny jest do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (2-32°C) oraz pH (2,9-9,0). Wykazuje także odporność na wysokie zasolenie [Carsanba i wsp. 2020, Zinjarde 2014]. Dzięki zdolności do produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i lipolitycznych, komórki drożdży potrafią metabolizować białka i lipidy [Carsanba i wsp. 2013]. Ich fizjologiczne i biochemiczne właściwości, w tym wysoka zdolność sekrecyjna, czynią je cennymi drobnoustrojami w biotechnologii, w procesach takich jak: biodegradacja, biosynteza czy biotransformacja związków organicznych [Wierzchowska i wsp. 2022]. Drożdże *Y. lipolytica*, w zależności od warunków hodowli i składu podłoża, potrafią produkować liczne metabolity, budzące zainteresowanie badaczy. Opracowano szereg perspektywicznych procesów opartych na wykorzystaniu tych mikroorganizmów do biosyntezy m.in. erytrytolu, związków aromatycznych (np. γ -dekalaktonu) [Zieniuk i wsp. 2020], karotenoidów (np. β -karotenu) [Krzyczkowska i Fabiszewska 2015], kwasów organicznych (np. α -ketoglutazarowego, bursztynowego, cytrynowego i pirogronowego), lipaz (stosowanych w produkcji żywności, oczyszczaniu wody lub jako składnik detergentów) [Zinjarde 2014], białka mikrobiologicznego - SCP (ang. Single Cell Protein), które może stanowić m.in. dodatek do pasz [Juszczuk i wsp. 2013] oraz oleju mikrobiologicznego, będącego źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), cennych zarówno w kontekście żywienia ludzi, jak i zwierząt hodowlanych [Fabiszewska i wsp. 2019]. Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* izolowano ze środowisk silnie zasolonych, morskich oraz zanieczyszczonych ropą naftową [Liu i wsp., 2015]. Co ważne, z punktu widzenia praktycznego wykorzystania gatunku, mikroorganizmy te uzyskały status GRAS (ang. generally recognized as safe), nadany

przez Agencję ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration - FDA). [Zieniuk i Fabiszewska 2019].

1.3. Biosynteza oleju mikrobiologicznego w komórkach drożdży

Olej mikrobiologiczny składa się głównie z lipidów niepolarnych, przede wszystkim triacylogliceroli (TAG) i, w mniejszych ilościach, z estrów steroli. Drożdże olejogenne gromadzą triacyloglicerole nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawierających zwykle 16 lub 18 atomów węgla, choć profil kwasów tłuszczowych zależy od gatunku drożdży, parametrów hodowli czy składu podłoża hodowlanego. Badania dotyczące profilu kwasów tłuszczowych lipidów ekstrahowanych z różnych gatunków drożdży olejogennych wskazują na ich podobieństwo, pod względem składu chemicznego, do olejów roślinnych [Papanikolaou i Aggelis 2011].

Lipidy magazynowe są w wyspecjalizowanych organelach komórkowych, tj. w ciałkach lipidowych zlokalizowanych w cytozolu. U wszystkich eukariotów obserwuje się taką samą budowę ciałek lipidowych [Enshaeieh i wsp. 2013]. Warstwa złożona z połączeń fosfo-, gliko- i sfingolipidów oraz białek otacza rdzeń o charakterze hydrofobowym. Zgromadzone w ciałkach lipidowych TAG wykorzystywane są jako zapasowe źródło energii, szczególnie podczas stresu środowiskowego, spowodowanego m.in. ograniczeniem źródła węgla w podłożu hodowlanym. W zależności od potrzeb metabolicznych komórki, warstwa ta może ulec rozpadowi na skutek aktywności wewnątrzkomórkowych lipaz [Kot i wsp. 2015].

Poznanie mechanizmów towarzyszących wewnątrzkomórkowej biosyntezie mikrobiologicznych lipidów odgrywa kluczową rolę w wydajnej ich produkcji. W komórkach drożdży olejogennych lipidy mogą być wytwarzane na drodze dwóch szlaków: *de novo* (z substratów hydrofilowych) lub *ex novo* (z substratów o charakterze hydrofobowym) [Papanikolaou i Aggelis 2011].

Podstawowym substratem dla obu szlaków jest acetylokoenzym A (acetylo-CoA). W komórkach drożdży nieolejogennych wytwarzany jest on przede wszystkim z pirogronianu w procesie glikolizy, w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę pirogronianową. W komórkach drożdży olejogennych, acetylo-CoA może być dodatkowo pozyskiwany z rozkładu cytrynianu, na skutek zahamowania cyklu Krebsa. W warunkach niedoboru azotu, z powodu obniżenia aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej, dochodzi do zablokowania cyklu Krebsa na poziomie izocytrynianu. Dzięki aktywności enzymu akonitazy, wewnątrzmitochondrialne stężenie izocytrynianu

pozostaje w równowadze z cytrynianem. Gdy stężenie cytrynianu osiągnie wartość krytyczną, jego nadmiar transportowany jest do cytozolu, gdzie ulega rozkładowi, przez ATP-zależną liazę cytrynianową, do szczawioctanu i acetylo-CoA. Ten ostatni może być kierowany do cyklu Krebsa lub zostać wykorzystany w procesie lipogenezy [Abeln i Chuck 2021]. Aktywność ATP-zależnej liazы cytrynianowej uznana jest za kluczową w procesie biosyntezy tłuszczów szlakiem *de novo*. Enzym jest nieaktywny w komórkach drożdży nieolejogennych [Papanikolaou i Aggelis, 2011].

Biosynteza *ex novo* ma miejsce, gdy w podłożu hodowlanym znajdują się hydrofobowe substraty, takie jak wolne kwasy tłuszczowe, triacyloglicerole czy alkany [Lazar i wsp. 2018]. Transport ich może odbywać się bezpośrednio, jak np. w przypadku alkanów, które do komórki wnikają w niezmienionej formie. Obecne w środowisku reszty kwasów tłuszczowych mogą zostać bezpośrednio włączane do syntezowanych w komórkach TAG. Triacyloglicerole, zanim znajdą się wewnątrz komórki, muszą zostać poddane hydrolizie do wolnych kwasów tłuszczowych [Beopoulos i wsp. 2008].

Drożdże *Y. lipolytica* znane są z zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej umożliwiającej hydrolizę TAG obecnych w podłożu hodowlanym. Gatunek ten może wytwarzać także środki powierzchniowo czynne, takie jak zewnątrzkomórkowy emulgator liposan, które zmniejszają rozmiary cząstek hydrofobowego substratu, zwiększając w ten sposób powierzchnię kontaktu z komórką drożdży [Carsanba i wsp. 2018]. Wolne kwasy tłuszczowe, dostępne w podłożu lub pochodzące z acylogliceroli, są aktywnie transportowane do wnętrza komórki, gdzie mogą ulegać enzymatycznym modyfikacjom, w tym zachodzącej w peroksysomach β -oksydacji [Szczepańska i wsp. 2021]. Proces ten składa się z czterech, powtarzających się, reakcji: utlenienia acylo-CoA z udziałem FAD^+ , uwodnienia enoilo-CoA, utlenienia 3-hydroksyacylo-CoA z udziałem NAD^+ oraz tiolizy ketoacylo-CoA. Wspomniane reakcje prowadzą do powstania głównego produktu, czyli cząsteczki acetylo-CoA i skróconej o dwie jednostki węglowe cząsteczki acylo-CoA (cząsteczka kwasu tłuszczowego połączona z koenzymem A). Podczas kolejnych cykli β -oksydacji odłączane są kolejne dwuwęgłowe jednostki, aż do całkowitego rozkładu substratu [Fickers i wsp. 2005]. Proces ten dostarcza energię niezbędną do wzrostu i rozwoju komórek w postaci 1 mola $FADH^+$ i 1 mola $NADH^+$ na każdy 1 mol powstałego acetylo-CoA [Papanikolaou i Aggelis, 2011].

Lipogeneza rozpoczyna się od reakcji karboksylacji dwuwęglowego acetylo-CoA, do trójwęglowej cząsteczki malonylo-CoA, a oba związki dostarczane są do szlaku

syntezy kwasów tłuszczowych jako źródła jednostek węglowych do biosyntezy tłuszczów. Synteza kwasów tłuszczowych odbywa się w serii cyklicznych reakcji kondensacji, czasami określana bywa jako odwrotny szlak β -oksydacji. Obejmuje reakcje katalizowane przez kompleks syntazy kwasów tłuszczowych oraz enzymy katalizujące kolejne reakcje elongacji. W każdym cyklu łańcuch kwasu tłuszczowego wydłuża się o kolejne dwuwęgłowe reszty, aż do powstania szesnasto- lub osiemnastowęglowej cząsteczki, stanowiącej substrat dla elongaz i desaturaz zlokalizowanych na powierzchni retikulum endoplazmatycznego [Abeln i Chuck 2021].

Obok charakteru stosowanego w hodowli źródła węgla, czynnikiem zasadniczo różnicującym oba szlaki jest wpływ stężenia źródła azotu w podłożu. Przyjmuje się, że, w porównaniu do szlaku *de novo*, w szlaku *ex novo* proliferacja komórek i biosynteza lipidów może zachodzić jednocześnie, a limitacja w podłożu źródła azotu nie jest konieczna. Ponadto wiele źródeł donosi, że obecność egzogennych *n*-alkanów i kwasów tłuszczowych hamuje aktywność syntazy kwasów tłuszczowych i ATP-zależnej liazy cytrynianowej (enzymu kluczowego w szlaku *de novo*) [Martínez i wsp. 2015]. A zatem biosynteza *ex novo* lipidów mikrobiologicznych nie może zachodzić w tym samym czasie, co proces *de novo* [Papanikalou i Agelis 2003, Fickes i wsp. 2005]. Jednak w badaniach Fabiszewskiej i wsp. [2019] wykazano, że poziom ekspresji genu kodującego aktywność ATP-zależnej liazy cytrynianowej był porównywalny dla wszystkich hodowli, zarówno tych prowadzonych w podłożach z glukozą, jak i oliwą z oliwek. Lipidowy substrat węglowy w postaci oliwy z oliwek nie hamował transkrypcji genu *ACL* kodującego aktywność ATP-zależnej liazy cytrynianowej. Uzyskane wyniki skłaniają zatem do postawienia hipotezy, że w obecności lipidowych substratów węglowych, synteza lipidów zapasowych zachodzi równolegle z wykorzystaniem dwóch szlaków (*de novo* i *ex novo*), a gen *ACL* nie jest hamowany na poziomie transkrypcji przez kwasy tłuszczowe pobierane przez komórki drożdży [Fabiszewska i wsp. 2019].

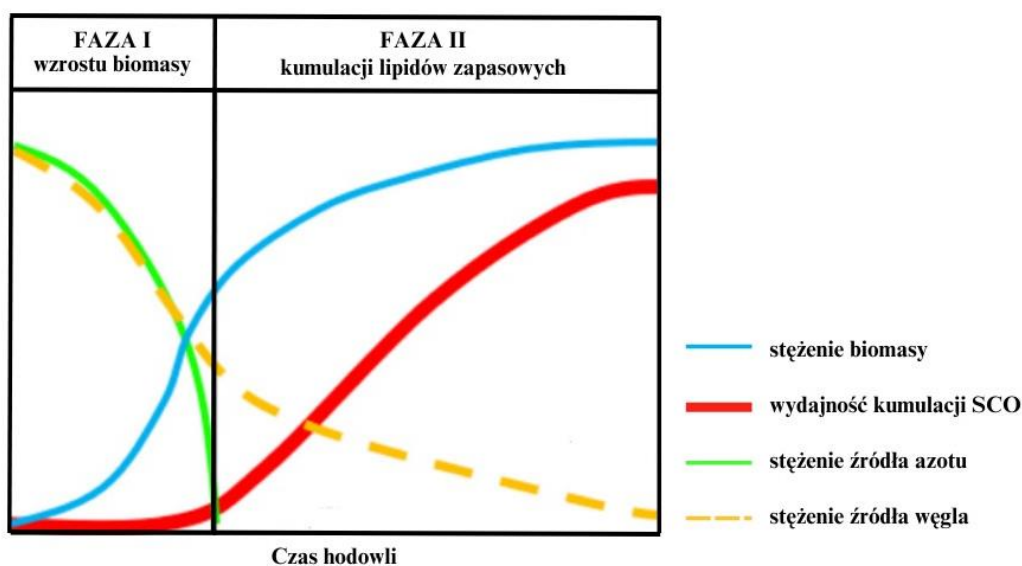
1.4. Hodowla olejogennych drożdży *Y. lipolytica*

Tryb hodowli, pH, temperatura i natlenienie podłoża hodowlanego, a także jego skład, w tym źródło węgla, azotu, stosunek molowy źródła węgla do azotu (C/N) oraz zawartość składników mineralnych, takich jak: magnez, fosfor, cynk, miedź, czy siarka, mogą znacząco wpływać na syntezę i skład lipidów wewnątrzkomórkowych drożdży. Na biosyntezę SCO mogą wpływać również wydzielone do podłoża metabolity, np. kwasy organiczne obniżające pH środowiska wzrostu [Robles-Iglesias i wsp. 2023, Carsanba i wsp. 2018].

Dla wydajnej produkcji mikrobiologicznych lipidów ważne jest uzyskanie biomasy o wysokiej gęstości komórek [Abeln i Chuck 2021]. Drożdże olejogenne gromadzą znaczne ilości SCO w warunkach stresu spowodowanego ograniczonym dostępem do składników odżywczych. Jak podają niektórzy autorzy, kluczową kwestią dla efektywnej kumulacji lipidów szlakiem *de novo* jest ograniczenie dostępu komórek do źródła azotu [Ratledge 2002]. Jednocześnie dostęp komórek drożdży do źródła węgla powinien być nieograniczony, na stale wysokim poziomie [Ratledge i Cohen 2008]. Istnieje pogląd, że wysoki stosunek C/N i C/P w składzie podłoża sprzyja kumulacji lipidów w komórkach drożdży *Y. lipolytica* [Taskin i wsp. 2015]. Przeprowadzono wiele badań nad potencjałem mikroorganizmów olejogennych do biosyntezy wysokiej zawartości lipidów w podłożach z limitacją źródła azotu, magnezu, fosforu, żelaza, cynku itp. [Gill i wsp. 1977, Wu i wsp. 2010, Taskin i wsp. 2015, Bellou i wsp. 2016, Kolouchová i wsp. 2016, Huang i wsp. 2018, Hoarau i wsp. 2020]. Większość prac dotyczyła jednak analizy wpływu limitacji wybranych składników mineralnych na syntezę lipidów szlakiem *de novo*. Nadal niewyjaśnione pozostaje w jaki sposób ograniczenie składników odżywczych wpływa na wydajność kumulacji SCO szlakiem *ex novo* w podłożach zawierających substraty hydrofobowe.

Stosunek molowy C/N jest czynnikiem istotnie wpływającym zarówno na wzrost biomasy, jak i zawartość lipidów w komórkach. Gdy komórki drożdży są hodowane w podłożach o wysokiej zawartości źródła azotu (niski stosunek C/N), dochodzi do gromadzenia biomasy o niskiej zawartości wewnątrzkomórkowych lipidów (Rys. 1) [Fakas 2017]. Po wyczerpaniu, innych niż źródło węgla, składników odżywczych np. azotu lub fosforu, wzrost biomasy jest utrudniony, a nadmiar źródła węgla dostępny w podłożu jest magazynowany w komórkach w postaci lipidów zapasowych. W warunkach podwyższonego stosunku C/N, w podłożu o niskiej zawartości azotu,

aktywność metaboliczna drożdży olejogennych ukierunkowana jest na kumulację lipidów, nie na proliferację komórek, tak jak ma to miejsce w podłożach zasobnych zarówno w źródło węgla jak i azotu. Jak podaje literatura, stosunek $C/N > 20$, sprzyja intensyfikacji kumulacji tłuszczów zapasowych [Carsanba i wsp. 2018, Poontawee et al. 2023]. Wysoka gęstość komórek może być trudna do osiągnięcia także w warunkach wysokiego stosunku C/N [Chang i in., 2015]. Przy $C/N > 70$ wydajność biosyntezy lipidów może spadać [Carsanba i in., 2018].



Rys. 1. Zmiany stężenia biomasy i wydajności kumulacji wewnątrzkomórkowych lipidów podczas hodowli okresowej w warunkach ograniczonej zawartości źródła azotu w podłożu, opracowanie własne, na podstawie [Poontawee i wsp. 2023]

Hodowle mikroorganizmów, także tych olejogennych, prowadzone są w trybie: okresowym (ang. batch culture), okresowym z zasilaniem podłoża (ang. fed-batch culture), a także ciągłym (ang. continuous culture), z ewentualnymi modyfikacjami. Większość badań dotyczących pozyskania oleju mikrobiologicznego przeprowadzono z wykorzystaniem hodowli okresowych lub okresowych z zasilaniem [Vasconcelos i wsp. 2019].

Tryb hodowli okresowej jest najczęściej stosowany w doborze parametrów hodowli, optymalnych dla wzrostu biomasy oraz wydajnej biosyntezy lipidów komórkowych [Saran i wsp. 2017, Awad i wsp. 2019, Carsanba i wsp. 2020, Gorte i wsp. 2020]. Jest to typowy system zamknięty, gdzie zarówno inokulum, jak i wszystkie stosowane substraty wprowadzane są na początku hodowli. Hodowla okresowa cechuje się pewnymi ograniczeniami. Wysokie początkowe stężenie źródła węgla może prowadzić

do wysokiej osmolarności podłoża, co z kolei skutkuje utrudnionym wzrostem biomasy [Singh i wsp. 2020]. Brak ingerencji w przebieg hodowli obniża ryzyko zakażenia, ale nie pozwala na sterowanie zawartością poszczególnych składników podłoża, co może mieć negatywne skutki w postaci niskiego plonu biomasy [Poontawee i wsp. 2023].

Hodowla okresowa z zasilaniem (tzw. półokresowa) zakłada możliwość dodawania substratów podczas fermentacji, bazując na zoptymalizowanych wcześniej parametrach hodowli. W zależności od stosunku C/N można obserwować: intensywny wzrost biomasy, wzmożoną produkcję kwasów organicznych lub konwersję nadmiaru źródła węgla w lipidy komórkowe [Beopoulos i wsp. 2009]. Tryb okresowej hodowli z zasilaniem pozwala dostosowywać skład podłoża do aktualnego zapotrzebowania na substraty, w zależności od fazy wzrostu mikroorganizmu. Umożliwia również ograniczenie hamującego wpływu wysokiego początkowego stężeniu substratów i poprawę wydajności biosyntezy lipidów [Bao i wsp. 2021].

Hodowla ciągła uważana jest za bardziej efektywny tryb hodowli w porównaniu z hodowlami okresowymi, ponieważ pozwala m.in. utrzymać stały, sprzyjający wewnątrzkomórkowej biosyntezie SCO, stosunek C/N w podłożu. Szybkość podawania świeżego podłoża i stosunek C/N to dwa główne czynniki, które należy optymalizować w hodowlach ciągłych, aby osiągnąć wysoką wydajność biosyntezy mikrobiologicznych lipidów [Abghari i Chen 2014]. Tryb ciągły zakłada jednoczesne dostarczanie do bioreaktora świeżego podłoża i odbieranie części hodowli, co pozwala na cykliczne pozyskiwanie biomasy zasobnej w lipidy. Na skutek wydłużonego procesu hodowli, wysoka gęstość komórek może powodować sedymentację biomasy lub tworzenie się biofilmu, a następnie przyczynić się do zatykania układów stosowanej aparatury lub zwiększać ryzyko zanieczyszczenia i tym samym, obniżać wydajności procesu [Bao i wsp. 2021].

1.5. Ekstrakcja oleju mikrobiologicznego z biomasy

W procesie mikrobiologicznej produkcji SCO istotne znaczenie dla jego wydajności ma ekstrakcja lipidów z komórek drożdży. Tylko wydajny proces ekstrakcji, poza strategiami regulacji wewnątrzkomórkowej biosyntezy, może zagwarantować pozyskanie oleju mikrobiologicznego w ilościach dających możliwość jego praktycznego zastosowania w przemyśle. Oddzielenie biomasy od podłoża hodowlanego, a następnie proces ekstrakcji lipidów (tzw. down-stream processing) stanowią czaso- i energochłonne etapy produkcji SCO [Drévillon i wsp. 2019].

Ekstrakcję substancji lipidowych z matryc zwierzęcych, roślinnych, a także biomasy mikroorganizmów można przeprowadzić przy użyciu wielu metod. Franz von Soxhlet opracował metodę ekstrakcji tłuszczów opartą na wykorzystaniu heksanu w roli rozpuszczalnika. Metoda ta jest szeroko stosowana w wielu laboratoriach, choć do jej wad zalicza się stosowanie wysokiej temperatury i dużej ilości rozpuszczalników organicznych, a tym samym ryzyko emisji toksycznych związków podczas procedury [López-Bascón i De Castro 2020]. Metoda Bligha i Dyera oraz metoda Folcha to dwie najbardziej znane metody ekstrakcji lipidów polegające na zastosowaniu mieszaniny chloroformu i metanolu [Breil i wsp. 2017, Holman i wsp. 2019]. Metody te są szeroko stosowane w analityce do ekstrakcji lipidów z wielu produktów spożywczych [Fabiszewska i wsp. 2023].

Komórki drożdży otoczone są błoną cytoplazmatyczną (złożoną m.in. z fosfolipidów, steroli, sfingolipidów) oraz ścianą komórkową (zawierającą m.in. chitynę, glikan, mannoproteiny), które stanowiąc barierę ochronną przed środowiskiem zewnętrznym, pozwalają komórce na utrzymanie homeostazy oraz umożliwiają adaptację do zmiennych warunków środowiska wzrostu [Lipke i Ovalle 1998, Santos i Riezman 2012, Lindberg i wsp. 2013, Walker i wsp. 2019].

W przypadku komórek drożdży, ekstrakcję substancji wewnątrzkomórkowych utrudnia obecność błony komórkowej. Można ją dezintegrować, np. termicznie. Jednak, aby zapobiec zmianom w profilu kwasów tłuszczowych i utlenianiu ekstrahowanego tłuszczu istotne jest utrzymanie umiarkowanej temperatury w całym procesie ekstrakcji [Drévillon i wsp. 2019]. Z tego względu, nadal poszukuje się nowych metod dezintegracji ścian komórkowych mikroorganizmów, które mogłyby znaleźć zastosowanie w ekstrakcji SCO. Pulsacyjne pole elektryczne (ang. pulsed electric field - PEF) to nietermiczna technologia charakteryzującą się krótkim czasem obróbki, w której dostarczenie określonej porcji energii powoduje tworzenie porów w błonie komórkowej. Przyczynia się to do zwiększenia jej przepuszczalności i wycieku na zewnątrz komórki cennych składników obecnych w organellach, takich jak barwniki, aromaty, białka, lipidy i przeciwutleniacze [Naliyadhara i wsp. 2022]. Zastosowanie ultradźwięków (ang. ultrasounds - US) również przyczynia się do przyspieszenia procesu ekstrakcji, wynikającej głównie z mechanicznych efektów kawitacji akustycznej, która poprawia zarówno penetrację materiału przez rozpuszczalnik, jak i uwalnianie produktów wewnątrzkomórkowych poprzez niszczenie ścian komórkowych [Fabiszewska i wsp. 2023]. Homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. high pressure homogenization - HPH)

to nietermiczna metoda o dużym potencjale do dezintegracji komórek mikroorganizmów, w której zawieszona komórkowa tłoczona jest przez pompę wyporową otworem w zespole zaworów pod ciśnieniem. Po opuszczeniu jednostki, prędkość przepływu gwałtownie wzrasta na krótkim odcinku, ciśnienie spada zaś do poziomu atmosferycznego. Przerwanie integralności komórek przypisuje się działaniu naprężeń ścinających płynu [Shene i wsp. 2016].

1.6. Koncepcja wykorzystania produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego w hodowli drożdży *Y. lipolytica*

Odpady i produkty uboczne powstają na wielu etapach łańcucha żywnościowego. Przemysł spożywczy każdego roku generuje około 1,3 miliarda ton szeroko pojętych odpadów, a około 38% odpadów żywnościowych pochodzi z etapu przetwórstwa. Statystyki wskazują, że jest to istotny środowiskowy, etyczny, ale i ekonomiczny problem [Gottardi i wsp. 2021].

Biotechnologiczna waloryzacja odpadów przemysłu rolno-spożywczego jest ściśle związana ze zrównoważonymi technologiami ponownego ich wykorzystania. Odpady powstałe w produkcji żywności mogą być potencjalnie przekształcane w produkty o tzw. wartości dodanej na drodze procesów biotechnologicznych opartych o wykorzystanie niekonwencjonalnych mikroorganizmów, takich jak drożdże *Y. lipolytica* [Wierzchowska i wsp. 2021].

Y. lipolytica to gatunek zdolny do wykorzystania odpadów przemysłowych jako źródeł: węgla, azotu, fosforu i innych niezbędnych do wzrostu składników [Bao i wsp. 2021, Wierzchowska i wsp. 2023]. W ostatnich latach wielokrotnie dyskutowano na temat pozyskania SCO z komórek mikroorganizmów olejogennych na drodze hodowli w podłożach przygotowanych na bazie składników odpadowych. Wielokrotnie analizowano zdolność gatunku do wzrostu i biosyntezy mikrobiologicznych lipidów w warunkach hodowli w różnego typu niskobudżetowych podłożach z dodatkiem m.in. melasy, smarów, oleju sałatkowego, surowego glicerolu, smalcu, łoju baraniego, wołowego czy tłuszczu drobiowego, odpadów posmażalniczych, ścieków powstających w procesie produkcji oliwy z oliwek czy oleju palmowego, ścieków po procesie mycia tuńczyka, solanki oraz mocznika [Wierzchowska i wsp. 2021]. Wciąż jednak brakuje badań dotyczących szeroko zakrojonej analizy jakościowej olejów mikrobiologicznych pochodzących z komórek drożdży hodowanych w podłożach zawierających składniki odpadowe w kontekście ich wykorzystania w technologii żywności.

2. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE

Celem pracy doktorskiej było badanie warunków biosyntezy oleju mikrobiologicznego przez gatunek drożdży olejogennych *Yarrowia lipolytica* w celu pozyskania, z wysoką wydajnością, oleju o pożądanym parametrach jakościowych, z jednoczesną utylizacją wybranych odpadów przemysłowych oraz opracowanie koncepcji wykorzystania otrzymanego oleju mikrobiologicznego w produkcie spożywczym.

Cel pracy realizowany był w oparciu o następujące hipotezy badawcze:

H1: Limitacja źródeł fosforu i/lub azotu w podłożach hodowlanych z hydrofobowym źródłem węgla jest skuteczną metodą stymulacji biosyntezy mikrobiologicznych lipidów w komórkach olejogennych drożdży *Y. lipolytica*.

H2: Dezintegracja komórek biomasy z wykorzystaniem US, PEF, HPH może wspomagać ekstrakcję lipidów z komórek drożdży prowadzoną metodami klasycznymi.

H3: Wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego mogą być wykorzystane jako składniki podłoża w hodowli drożdży olejogennych mającej na celu pozyskanie mikrobiologicznych lipidów o korzystnym składzie chemicznym.

H4: Oleje mikrobiologiczne pozyskane w hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach odpadowych nie zawierają metali ciężkich ani wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ilościach przekraczających limity nałożone odpowiednimi rozporządzeniami.

H5: Olej mikrobiologiczny pozyskany w hodowli drożdży olejogennych w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego może znaleźć zastosowanie jako dodatek do żywności zwiększający jej wartość żywieniową.

3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1. Materiały do badań

Materiał do badań stanowił szczep olejogennych drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych należącej do Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie (Polska). Wykorzystywany szczep drożdży przechowywany był na skosach agarowych z podłożem YPG (ang. Yeast extract – Peptone - Glucose), w warunkach chłodniczych 4°C oraz w podłożu YPG z 20% (v/v) dodatkiem glicerolu w temperaturze -20°C.

W hodowli drożdży olejogennych wykorzystano: glukozę (Chempur, Piekary Śląskie) [P6] i olej rzepakowy tłoczony na zimno (ZT „Kruszwica”, Kruszwica) [P5, P6] oraz następujące produkty odpadowe przemysłu spożywczego:

- jako źródła węgla:
 - [P2, P3, P4, P5, P6] odpadowy olej rzepakowy pozostały po smażeniu ryb – w oleju smażono filety z dorsza w pełnym zanurzeniu w temperaturze 170°C.
 - Odpad pochodził z przedsiębiorstwa „Rekin” w Grajewie, woj. podlaskie (Polska), przed dodaniem do hodowli został przefiltrowany, a stałe pozostałości przetwarzanego surowca usunięto;
 - [P4, P6] melasa – produkt uboczny procesu pozyskania cukru buraczanego w Krajowej Spółce Cukrowej, Oddział „Cukrownia Dobrzelin”. Melasę po dwukrotnym rozcieńczeniu hydrolizowano 98% roztworem kwasu siarkowego. Tak przygotowany substrat składał się w 58% z cukrów redukujących;
- jako częściowy substytut wody:
 - [P5] serwatka kwaśna - odciek po produkcji sera twarogowego, pochodząca od lokalnego producenta, woj. podlaskie (Polska).

3.2. Hodowle olejogennych drożdży

3.2.1. Hodowle inokulacyjne

Hodowle inokulacyjne prowadzono w podłożu YPG (1% ekstrakt drożdżowy, 2% pepton, 2% glukoza - BTL, Łódź, Polska) na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej IKA KS 4000 IC Control (Niemcy) i wytrząsano z prędkością 140 rpm, inkubując w temperaturze 28°C przez 24h.

3.2.2. Hodowle eksperymentalne

Okresowe hodowle wytrząsane w kolbach **[P2]** prowadzono na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej IKA KS 4000 IC Control (Niemcy), przy prędkości obrotowej wytrząsarki 140 rpm. Każda kolba zawierała 200 cm³ sterylnego podłoża. Hodowle prowadzono także w bioreaktorze laboratoryjnym **[P2, P3, P4, P5, P6]** BIOFLO 3000 firmy New Brunswick Scientific (USA) o objętości roboczej 4 dm³, (inokulum 0,025% (v/v)). Podczas hodowli monitorowano w sposób ciągły temperaturę, pH i natlenienie podłoży hodowlanych. Względny stopień natlenienia, wynoszący co najmniej 30% początkowego stężenia tlenu, utrzymywano poprzez regulację sprężonym powietrzem przy przepływie 100 dm³/h/L podłoża i zmiennej prędkości mieszania w zakresie 300 - 600 obr/min. Wszystkie hodowle prowadzono w temperaturze 28°C.

Dla okresowych hodowli wytrząsanych **[P2]**, stosowano mineralne podłoże hodowlane o następujących składzie: 1,5 g/dm³ MgSO₄, 0,16 g/dm³ FeSO₄ x H₂O, 0,15 g/dm³ CaCl₂, 0,08 g/dm³ MnCl₂ x 4H₂O, 0,02 g/dm³ ZnSO₄, gdzie dodatek KH₂PO₄, Na₂HPO₄, i (NH₄)₂SO₄ wraz z czasem hodowli modyfikowano zgodnie z opracowanym planem kwadratów łacińskich 4x4, zgodnie z Tabelą 1. Skład wszystkich podłoży stosowanych w hodowlach prowadzonych w bioreaktorze laboratoryjnym zestawiono w Tabeli 2. Dla każdego wariantu podłoża, hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach. Wszystkie odczynniki nieorganiczne zostały zakupione od Avantor Performance Materials Poland S.A (Gliwice, Polska).

Tabela 1. Plan eksperymentu dla hodowli wytrząsanych drożdży *Y. lipolytica* przygotowany w oparciu o plan kwadratu łacińskiego 4 × 4 **[P2]**

KH ₂ PO ₄ (g/dm ³)	Czas trwania hodowli (dni)				(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/dm ³)
	3	4	5	6	
3	4,0	6,0	8,0	10,0	
7	6,0	8,0	10,0	4,0	
9	8,0	10,0	4,0	6,0	
11	10,0	4,0	6,0	8,0	

Tabela 2. Skład podłoży hodowlanych stosowanych w kolejnych doświadczeniach [g/dm³],

* procentowa ilość wody użytej do przygotowania podłoża zastąpiona serwatką kwaśną

	[P2]				[P3]	[P4]			[P5]				[P6]			
Podłoże Składnik	M1	M2	M3	M4	M5	M1-b	M2-fb	O1-fb	CPO-0	CPO-0,3	PFO-0,2	PFO-0,3	GLU	MOL	CPO	PFO
olej tłoczony na zimno	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	50,0	-	-	-	-	50,0	-
posmażalniczy olej rzepakowy	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	-	-	50,0	-	-	50,0	50,0	-	-	-	50,0
melasa	-	-	-	-	-	50,0	50,0	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-
glukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-
serwatka kwaśna	-	-	-	-	-	-	-	-	0%*	30%*	20%*	30%*	-	-	-	-
pepton	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ekstrakt drożdżowy	-	-	-	-	2,0	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0	8,0	10,0	4,0	2,5	-	-	8	2,5	2,5	-	-	2,5	-	2,5	2,5
KH ₂ PO ₄	3,0	3,0	3,5	7,0	7,0	-	-	3	7,0	7,0	3,0	3,0	7,0	-	7,0	7,0
Na ₂ HPO ₄	1,1	1,1	2,5	2,5	2,5	1,5	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,5	2,5	2,5
MgSO ₄	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	1,5	1,5
FeSO ₄ x H ₂ O	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	-	-	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	-	0,16	0,16
CaCl ₂	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	-	-	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	-	0,15	0,15
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	-	-	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	-	0,08	0,08
ZnSO ₄	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	-	-	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	-	0,02	0,02

W hodowli okresowej z zasilaniem prowadzonej w podłożu M2-fb, dodawano źródło węgla w postaci hydrolizatu melasy po 16, 24, 40 i 48 godzinie hodowli. Okresową hodowlę O1-fb uzupełniano posmażalniczym olejem rzepakowym (20 lub 40 g/cm³) i skoncentrowanym handlowym podłożem mineralnym YNB (ang. Yeast Nitrogen Base) (26,8 g suchego podłoża rozpuszczonego w 250 cm³ wody destylowanej) o następującym składzie: (NH₄)₂SO₄ 5,0 g/cm³, biotyna 2,0 g/cm³, pantotenian wapnia 0,4 g/cm³, kwas foliowy 2,0 g/cm³, inozytol 2,0 g/cm³, kwas nikotynowy 0,4 g/cm³, kwas *p*-aminobenzoowy 0,2 g/cm³, pirydoksyna HCl 0,4 g/cm³, ryboflawina 0,2 g/cm³, tiamina HCl 0,4 g/cm³; H₃BO₃, 0,5 g/cm³; CuSO₄, 0,4 g/cm³; KI, 0,1 g/cm³; FeCl₃, 0,2 g/cm³; MnSO₄ 0,4 g/cm³; Na₂MoO₄, 0,2 g/cm³; ZnSO₄, 0,4 g/cm³; K₃PO₄, 1,0 g/cm³; MgSO₄, 0,5 g/cm³; NaCl, 0,1 g/cm³; CaCl₂, 0,1 g/cm³, każdorazowo odbierając 250 cm³ hodowli z bioreaktora [P4].

3.3. Mikroskopia konfokalna

Do obrazowania morfologii komórek olejogennych drożdży *Y. lipolytica* zastosowano konfokalny laserowy mikroskop skaningowy Olympus Fluoview FV3000 (Olympus Corporation, Japonia). Do barwienia ciałek lipidowych użyto czerwieni nilowej (Nile Red, Sigma-Aldrich). Roztwór czerwieni nilowej przygotowano w etanolu o stężeniu 1 mg/cm³. Obserwacje prowadzono przy długości fali wzbudzenia 488 nm z zastosowaniem obiektywu 63x (imersja olejowa) [P6].

3.4. Oznaczenie stężenia biomasy drożdży

Stężenie biomasy oznaczono metodą termograwimetryczną. Komórki oddzielano od podłoża hodowlanego przez wirowanie przy 8000 obr/min (6869 × g), w temperaturze 4°C przez 10 minut, przemywano wodą destylowaną i suszono w temperaturze 105°C do stałej masy (zawartość wody < 0,5%). Wysuszoną biomasę drożdży ważono, a wyniki wyrażano w gramach suchej masy w przeliczeniu na 1 dm³ podłoża (g_{s.m.}/dm³).

3.5. Ekstrakcja lipidów

Ekstrakcję lipidów komórkowych z suchej biomasy prowadzono w aparacie Soxhleta [P2, P4, P5]. Wysuszoną biomasę ucierano z piaskiem i prowadzono ekstrakcję z użyciem *n*-heksanu jako rozpuszczalnika. Do ekstrakcji lipidów z próbek biomasy pozyskanych podczas wytrząsanych hodowli okresowych [P2] zastosowano metodę ekstrakcji Folcha, traktując wysuszoną biomasę czterokrotnie porcjami mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku 2:1 (10 cm³/g suchej biomasy). Próbkę odwirowano

w wirówce MPW-351R (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska) (10 min, 8000 obr./min, $(6869 \times g)$), każdorazowo zbierając fazę organiczną, którą suszono bezwodnym $MgSO_4$.

Rozpuszczalniki oddzielono od tłuszczu przez destylację pod ciśnieniem bezwzględnym 360 mbar. Destylację przeprowadzono w wyparce Buchi Rotavapor R- 200 (Flawil, Szwajcaria).

Wykorzystanie posmażalniczego oleju rzepakowego w hodowlach oceniano metodą ekstrakcji prostej porcjami heksanu o objętości 10 cm^3 . Do odebranej fazy olejowej dodawano siarczan(VI) magnezu w celu usunięcia pozostałości wody. Po 10 minutach całość przefiltrowano w celu usunięcia środka suszącego. Rozpuszczalnik odparowywano z fazy organicznej, a pozostały olej ważono z dokładnością do jednej setnej grama ($0,01\text{g}$), waga Radwag PS 3500R2.M (Radom, Polska).

W pracy [P3] suchą biomasę mielono, ważono i przenoszono do probówki typu falcon. Na każdy 1 g suchej biomasy dodano 10 cm^3 mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku 2:1 (v/v), przeprowadzając dwukrotną ekstrakcję lipidów zgodnie z metodą Folcha. Próbkę odwirowano (10 min, 8000 obr./min, $(6869 \times g)$). Po odwirowaniu uzyskaną ciecz przesączono na sączku z bibuły filtracyjnej do zważonej kolby okrągłodennej. Procedurę tę powtórzono czterokrotnie. Rozpuszczalnik odparowano.

W przypadku oznaczania zawartości lipidów w zawiesinach po traktowaniu komórek US, PEF lub HPH, procedura była identyczna, jak opisano wyżej. Dodawano 10 cm^3 mieszaniny rozpuszczalników na każde 20 cm^3 zawiesiny.

Aby ocenić wpływ permeabilizacji komórek drożdży, biomasę wytrząsano z heksanem przez 60 minut w temperaturze pokojowej, rozpuszczalnik odparowano, kolejno prowadzono ekstrakcję metodą Folcha.

3.5.1. Niekonwencjonalne metody obróbki biomasy

Komórki drożdży zawieszono w soli fizjologicznej. Powstałe zawiesiny poddano działaniu ultradźwięków przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego Hielscher UP400S (Hielscher, Teltow, Niemcy) przez 10 minut w warunkach przedstawionych w Tabeli 3. [P3]

Tabela 3. Parametry sonikacji.

Nr	Udział biomasy w zawiesinie [% m/v]	Cykl [%] *	Amplituda [μm]
1	10	100	105
2	30	100	105
3	10	100	210
4	30	100	210
5	10	50	105
6	30	50	105
7	10	50	210
8	30	50	210

* procent czasu trwania eksperymentu, który został wykorzystany do sonikacji

Komórki drożdży poddano również działaniu pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) przy parametrach przedstawionych w Tabeli 4. Zmierzono przewodność zawiesiny, a następnie komórki przeniesiono do komory systemu aplikacji PEF Elea GmbH (Quakenbrück, Niemcy) [P3].

Tabela 4. Warunki obróbki drożdży metodą pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF)

Forma biomasy drożdży	liofilizowana	niewysuszona (mokra)
Udział biomasy w zawiesinie [% m/v]	4	4
Przewodność elektryczna zawiesiny [mS/cm]	2,300	0,821
Średnia energia dla powtórzenia PEF [J/g]	420,00	200,00
Napięcie elektryczne [kV]	10	10
Liczba impulsów	600	52

Świeżą biomasę poddano działaniu homogenizacji wysokociśnieniowej. 25% (m/v) zawiesinę komórek drożdży przepuszczono przez wysokociśnieniowy homogenizator Niro Soavi NS 1001 L2 PANDA (GEA, Parma, Włochy) w zmiennych warunkach obróbki wstępnej przedstawionych w Tabeli 5. [P3]

Tabela 5. Warunki obróbki drożdży metodą homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH)

Nr	Ciśnienie [bar]	Czas traktowania biomasy HPH [liczba cykli]
1	300	1
2	300	2
3	150	1
4	700	1
5	1100	10

3.6. Parametry kinetyczne hodowli

Parametry, na podstawie których charakteryzowano hodowle drożdży olejogennych przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Parametry hodowli mikroorganizmów olejogennych wraz z objaśnieniami

Symbol	Jednostka	Wyjaśnienie symbolu	Publikacja
S	g/dm^3	stężenie źródła węgla	[P2, P4, P5, P6]
t	h	czas trwania hodowli	[P2, P4, P5, P6]
X	$\text{g}_{\text{s.m.}} / \text{dm}^3$	stężenie biomasy drożdży w przeliczeniu na jednostkę objętości podłoża	[P2, P4, P5, P6]
L	g/dm^3	zawartość SCO w przeliczeniu na jednostkę objętości podłoża	[P2, P4, P6]
L_{max}	g/dm^3	maksymalne stężenie SCO w przeliczeniu na jednostkę objętości podłoża	[P2, P5]
$Y_{X/S}$	$\text{g}_{\text{s.m.}}/\text{g}$	wydajność konwersji biomasy w przeliczeniu na masę źródła węgla	[P2, P4, P5]
$Y_{L/X}$	$\text{g}/\text{g}_{\text{s.m.}}$	wydajność konwersji SCO w przeliczeniu na masę suchej biomasy	[P2, P5, P6]
$Y_{L/S}$	g/g	wydajność konwersji SCO w przeliczeniu na masę źródła węgla	[P2, P5, P6]
q_{Lv}	$\text{g}/\text{dm}^3/\text{h}$	objętościowa szybkość produkcji lipidów zapasowych	[P2]

3.7. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących

Cukry redukujące analizowano przy użyciu zmodyfikowanej metody chemicznej Jain i wsp. [2020] z wykorzystaniem odczynnika DNS (kwas 3,5-dinitrosalicylowy) reagującego z cukrami redukującymi w podwyższonej temperaturze, tworząc czerwono-brązowy produkt, kwas 3-amino-5-nitrosalicylowy. 1 cm³ DNS i 1 cm³ podłoża inkubowano we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut, szybko schłodzono i dodano 5 cm³ wody dejonizowanej. Stężenie barwnego związku określono przez pomiar absorpcji przy długości fali 540 nm i przeliczano proporcjonalnie na stężenie cukrów na podstawie krzywej wzorcowej [P4].

3.8. Oznaczenie pozostałości źródła azotu w podłożach

W pracy [P2] zawartości azotu w podłożach hodowlanych, po odebraniu biomasy, oznaczono zmodyfikowaną metodą Kjeldahla [2000], z pominięciem etapu mineralizacji próbki. Z 90 cm³ próbki (podłoża hodowlanego) za pomocą 50 cm³ 40% NaOH amoniak oddestylowano (czas destylacji - 4 min) do 25 cm³ 4% kwasu borowego.

Roztwór miareczkowano 0,1 M HCl w obecności wskaźnika Tashiro. Zawartość azotu w próbce przeliczono na stężenie siarczanu(VI) amonu w pożywce.

3.9. Analiza składu pierwiastkowego biomasy drożdży

Wysuszone próbki biomasy drożdży zostały rozdrobnione w moździerz. Całkowitą zawartość C, N i S oznaczono metodą spalania na sucho (Vario MacroCube, Elementar, Niemcy). Całkowitą zawartość P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Al, Mn, Cu, Zn, Ni, Pb, Cr, V, Sr, Ba, Ti i Zr oznaczono metodą atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej - ICP-OES (Avio 200, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) po rozтворzeniu próbek w mieszaninie HNO₃ i HCl (3:1 v/v) przy użyciu systemu roztwarzania mikrofalowego (Milestone Ethos Up, Sorisole, Włochy) [P4, P5].

3.10. Analiza składu kwasów tłuszczowych olejów mikrobiologicznych

FA obecne w lipidach wyekstrahowanych z komórek drożdży derywatyzowano 14% roztworem BF₃ (trifluorek boru) w metanolu, dodawanym w równych objętościach i ogrzewano przez 2 godziny w temperaturze 60°C. Skład kwasów tłuszczowych wyekstrahowanych lipidów oznaczano metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID) w aparacie Agilent Technology 7820 (Santa Clara, CA, USA) z kolumną kapilarną GC Zebron ZB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 m). Jako gaz nośny został użyty azot, przy natężeniu przepływu 35 cm³/min. Zastosowano następujący program temperaturowy: 80°C (2 min) do 200°C (10 min) (5°C/min). Temperatura wtryskiwacza: 250°C; temperatura detektora: 290°C; objętość wtrysku: 1 µL [P2, P4, P5].

Celem analizy składu kwasów tłuszczowych roślinnych analogów sera typu Camembert [P6], FA poddano derywatyzacji do estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) metodą PN-EN ISO:2001 z wykorzystaniem 0,01M roztworu KOH w metanolu [2001]. Analizy wykonano przy użyciu chromatografu GC YL6100 wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) i kolumnę kapilarną BPX70 o średnicy wewnętrznej 0,25 mm × długości 60 m i grubości warstwy 0,25 µm. Program temperaturowy był następujący: 60°C (5 min) do 180°C (10 °C/min), 180°C do 230°C (15 min) (3°C/min), temperatura wtryskiwacza: 225°C; temperatura detektora: 250°C; objętość wtrysku: 2 µL. Jako gazu nośnego użyto azotu. FA zidentyfikowano na podstawie czasu retencji w porównaniu do wzorców. Procentowy udział każdego FA obliczono przy użyciu procedury normalizacji powierzchni.

3.11. Analiza zawartości steroli

Próbki oleju lub wzorce (stigmasterol, cholesterol, ergosterol) zważono i rozpuszczono w 2 cm³ heksanu. Jako wzorzec wewnętrzny dodano 100 µl 5α-cholestanu (10,5 mg / 25 cm³ chloroformu). Analizowane związki derywatyzowano 0,5 cm³ 2 M KOH w metanolu przez 1 godzinę. 1 cm³ górnej warstwy zbierano i przenoszono do szklanej fiolki. Próbkę odparowano w strumieniu azotu i dodano 100 µl odczynnika silylującego (BSTFA + TMCS, 99:1) i 100 µl pirydyny. Przygotowaną próbkę wytrząsano i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej w celu przeprowadzenia procesu derywatyzacji. Kolejno, dodawano 0,2 cm³ heksanu. Rozdział pochodnych steroli przeprowadzono za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas Shimadzu-QP-2010S z użyciem kolumny kapilarnej ZB-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 m) z fazą stacjonarną (5%-fenylo-arylen-95%-dimetylopolisiloksan). Program temperaturowy kolumny: temperatura początkowa 60°C (3 min), 15°C/min do 250°C, 3°C/min do 310°C, 310°C (10 min). Temperatura wtryskiwacza i źródła jonów wynosiła odpowiednio 250°C i 240°C. Gazem nośnym był hel o przepływie 0,7 ml/min. Temperatura interfejsu GC-MS wynosiła 250°C. Energia jonizacji wynosiła 70 eV. Całkowity prąd jonowy (TIC) został użyty do wykrywania steroli (m/z w zakresie 100-600). Analizę jakościową trimetylosililoeterów steroli przeprowadzono na podstawie porównania ich czasu retencji z czasem retencji dostępnych wzorców i widm masowych oraz danych literaturowych. Do ilościowego oznaczenia steroli użyto wzorca wewnętrznego 5α-cholestanu. Każda próbka była analizowana w dwóch powtórzeniach [P4, P5] [Derewiaka i wsp. 2019].

3.12. Analiza stabilności oksydacyjnej wyekstrahowanych lipidów

Analizy ciśnieniowej różnicowej kalorymetrii skaningowej (PDSC) przeprowadzono przy użyciu urządzenia DSC Q20 TA Instrument (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Próbki oleju (3 mg) w aluminiowych naczynkach umieszczono w celi w atmosferze tlenu (natężenie przepływu 50 cm³/min) o ciśnieniu początkowym 1400 kPa. Pomiary przeprowadzono w warunkach izotermicznych w temperaturze 120°C. Czasy indukcji utleniania próbek określono na podstawie czasu początku reakcji utleniania (T_{on}) i maksymalnej szybkości utleniania (T_{max}). Parametry te posłużyły do scharakteryzowania różnych etapów procesu utleniania oleju. Wykresy zostały zarejestrowane i przeanalizowane przy użyciu oprogramowania TA Universal Analysis 2000 [P5].

3.13. Analiza pozostałości rozpuszczalników w olejach mikrobiologicznych

Około 0,3 g oleju mikrobiologicznego przeniesiono do szklanych fiolek o pojemności 20 cm³, fiolki uszczelniono silikonową przegrodą. Do każdej próbki dodano wzorzec wewnętrzny (1,2-dichlorobenzen - 5 µl 0,01% roztworu w metanolu). Proces pobierania próbek przeprowadzono przy użyciu włókna DVB/CAR/PDMS o długości 1 cm, w temperaturze 50°C, z czasem absorpcji 40 minut przez system do mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej - SPME. Następnie włókno wkładano do wtryskiwacza, a desorpcja następowała po 2 minutach w trybie splitless. Sprzęt użyty do analizy to chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas GC/MS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Japonia). Do separacji związków aromatycznych zastosowano kolumnę Stabilwax (30,00 m x 0,25 mm x 0,25 µm, wykonaną z glikolu polietylenowego) firmy Restek. Hel służył jako gaz nośny przy natężeniu przepływu w kolumnie wynoszącym 0,64 ml/min. Program temperaturowy kolumny był następujący: początkowa temperatura 40°C (10 minut), 5°C/min do 200°C, 200°C (2 min), 20°C/min do 220-250°C, 250°C (10 min). Cała analiza trwała 54,5 minuty. Temperatura wtryskiwacza i źródła jonów wynosiła 250°C. Widma masowe zostały uzyskane w trybie uderzenia elektronów o energii 70 eV, przy użyciu pełnego skanowania w zakresie 40-450 m/z. Identyfikacji związków aromatycznych dokonano na podstawie bibliotek widm masowych (NIST 2008, Wiley 175) i danych literaturowych. Wzorzec wewnętrzny, 1,2-dichlorobenzen, został użyty do półilościowej identyfikacji związków lotnych. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone w dwóch powtórzeniach [P6].

3.14. Przygotowanie i analiza wybranych właściwości roślinnych analogów serów dojrzewających

Sporządzona na potrzeby eksperymentu opisanego w pracy [P6], masa bazowa roślinnego analogu sera typu Camembert przygotowana została ze zblendowanych orzechów nerkowca i wody, zmieszanych w stosunku 1:1 i poddana procesowi sterylizacji mikrofalowej. Po procesie sterylizacji do masy ponownie dodano przegotowaną wodę w ilości równej połowie porcji dodanej w pierwszym etapie, uzyskując wilgotność masy 40 - 45%. Po schłodzeniu masy do temperatury pokojowej, na każde 150 g masy, dodano po 1cm³ zawiesiny kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej i pleśni. W celu wzbogacenia masy bazowej analogu w olej mikrobiologiczny, do miazgi dodawano 1 g inaktywowanej termicznie, liofilizowanej biomasy drożdży *Y. lipolytica* (wariant analogu wzbogaconego w biomasę drożdży) lub 1 g oleju

mikrobiologicznego (wariant analogu wzbogaconego w olej ekstrahowany z komórek drożdży). Masę przenoszono w ilości $150 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ do sterylnych plastikowych okrągłych pojemników, w których umieszczano papier do pieczenia (celem ułatwienia późniejszego procesu obracania analogów) i pozostawiano na 5 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie następował okres dojrzewania, wynoszący 14 dni, w temperaturze 12°C . Analogi przewracano, a papier wymieniano raz dziennie przez pierwsze dwa dni, a następnie co 3 dni. Czwartego dnia analogi solono po obu stronach, rozprawdzając $0,5 \text{ g NaCl}$ po każdej stronie.

3.14.1. Kultury starterowe

Komercyjną kulturę starterową pleśni *Geotrichum camemberti* (Cashewbert, Berlin, Niemcy) hodowano w 200 cm^3 podłoża o składzie: $1 \text{ g/dm}^3 \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $1 \text{ g/dm}^3 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $4 \text{ g/dm}^3 \text{ K}_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , 2 g/dm^3 ; NaCl , 1 g/dm^3 ; glukoza, 10 g/dm^3 ; ekstrakt drożdżowy, 1 g/dm^3 ; $57 \text{ cm}^3/\text{dm}^3$ 10% roztworu kwasu cytrynowego. Hodowlę prowadzono przez 72 godziny w 28°C . Biomassę pleśni odsączono z podłoża, przemyto sterylnym roztworem soli fizjologicznej i dodano do masy. Kultura starterowa bakterii składała się ze szczepów *Lactococcus lactis* KKP 3020 i *Streptococcus salivarius* KKP 3251 namnażanych w 24-godzinnej hodowli w 100 cm^3 płynnego podłoża MRS w temperaturze 35°C . Szczepy uzyskano z Kolekcji Kultur Mikroorganizmów Przemysłowych należącej do Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego (IAFB, Warszawa, Polska). Każdy szczep był hodowany oddzielnie. Biomassę bakteryjną przemyto solą fizjologiczną i zawieszono w 10 cm^3 sterylnej soli fizjologicznej.

3.14.2. Oznaczenie suchej masy produktów

W celu oznaczenia suchej masy, odważano po 20 g próbki analogów sera, z każdego wariantu, po 14 dniach dojrzewania. Następnie suszono przez 48 godzin w temperaturze 80°C do uzyskania stałej masy [P6].

3.14.3. Oznaczenie kwasowości miareczkowej

Oznaczanie kwasowości miareczkowej przeprowadzono przy użyciu titratora TitraLab AT1000 Series HACH (Wrocław, Polska), który służy do automatycznego miareczkowania potencjometrycznego. Tytrantem był $0,1 \text{ M NaOH}$, a urządzenie było wyposażone w elektrodę pH. Przed pomiarem, 1 g próbki zawieszono w 50 cm^3 wody destylowanej. Wyniki podano w przeliczeniu na gramy kwasu mlekowego [P6].

3.14.4. Oznaczenie zawartości białka

Całkowitą zawartość białka oznaczono metodą Kjeldahla po mineralizacji 0,5 g próbki. Do przeliczenia ilości titranta 0,1 M HCl zastosowano współczynnik konwersji dla orzechów równy 5,3 [P6].

3.14.5. Oznaczenie zawartości i stabilności oksydacyjnej tłuszczu roślinnych analogów sera

Lipidy ekstrahowano z odwodnionych analogów camemberta, przy użyciu aparatu Soxhleta, a jako rozpuszczalnika użyto *n*-heksanu. Badanie różnicowej kalorymetrii skaningowej (PDSC) przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w sekcji 3.12.

3.14.6. Oznaczenie zawartości cukrów

Zawartość mono- i disacharydów oznaczono metodą DNS, zgodnie z metodyką opisaną w sekcji 3.7. 1 g analogu rozcieńczono wodą destylowaną do objętości 100 cm³. Hydrolizę kwasową przeprowadzono przy użyciu 6,25 cm³ 36% HCl w temperaturze 70°C przez 15 minut. Zawartość cukrów redukujących mierzono dla próbek niezhydrolizowanych. W próbkach poddanych hydrolizie oznaczano sumę cukrów redukujących w grupie monosacharydów oraz obecnych w cząsteczkach disacharydów. Przed oznaczeniem, wszystkie próbki zostały poddane odbiałczeniu przy użyciu roztworów Carreza [P6].

3.14.7. Charakterystyka mikrobiologiczna roślinnych analogów

Całkowitą liczbę drobnoustrojów oznaczono na agarze odżywczym zgodnie z normą EN ISO 4833-1:2013-12 po 72 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C. Bakterie kwasu mlekowego hodowano na podłożu MRS Agar (GRASO Biotech, Polska) przez 48 godzin w temperaturze 35°C. Pleśnie hodowano w temperaturze pokojowej przez 96 godzin w temperaturze 25°C na podłożu DRBC agar z dichloranem, różem bengalskim i chloramfenikolem (GRASO Biotech, Polska). Każdy wariant analogu sera analizowano w dwóch powtórzeniach po 7 i 14 dniach dojrzewania [P6].

3.14.8. Analiza zawartości włókna

Zawartość włókna surowego oznaczono w systemie FibertecMC 8000 (Foss Analytics, Warszawa, Polska). Procentową zawartość włókna surowego oznaczono metodą PN-ISO 5498 (1996) [P6].

3.15. Analiza statystyczna wyników

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.0 set plus **[P2, P5]** i 13.3 **[P3, P4, P6]** (Statsoft, Kraków, Polska). W doświadczeniu przeprowadzonym w hodowlach wytrząsanych zastosowano statystyczną metodę projektowania eksperymentu, tj. plan kwadratów łacińskich 4x4 **[P2]** (Tabela 1). Jako miarę tendencji centralnej przyjęto odchylenie standardowe. Analizy statystyczne powtarzanych pomiarów przeprowadzono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA, a następnie testu porównań wielokrotnych post-hoc Tukeya **[P3, P4, P5, P6]**. Wartości p -value $< 0,05$ uznano za istotne.

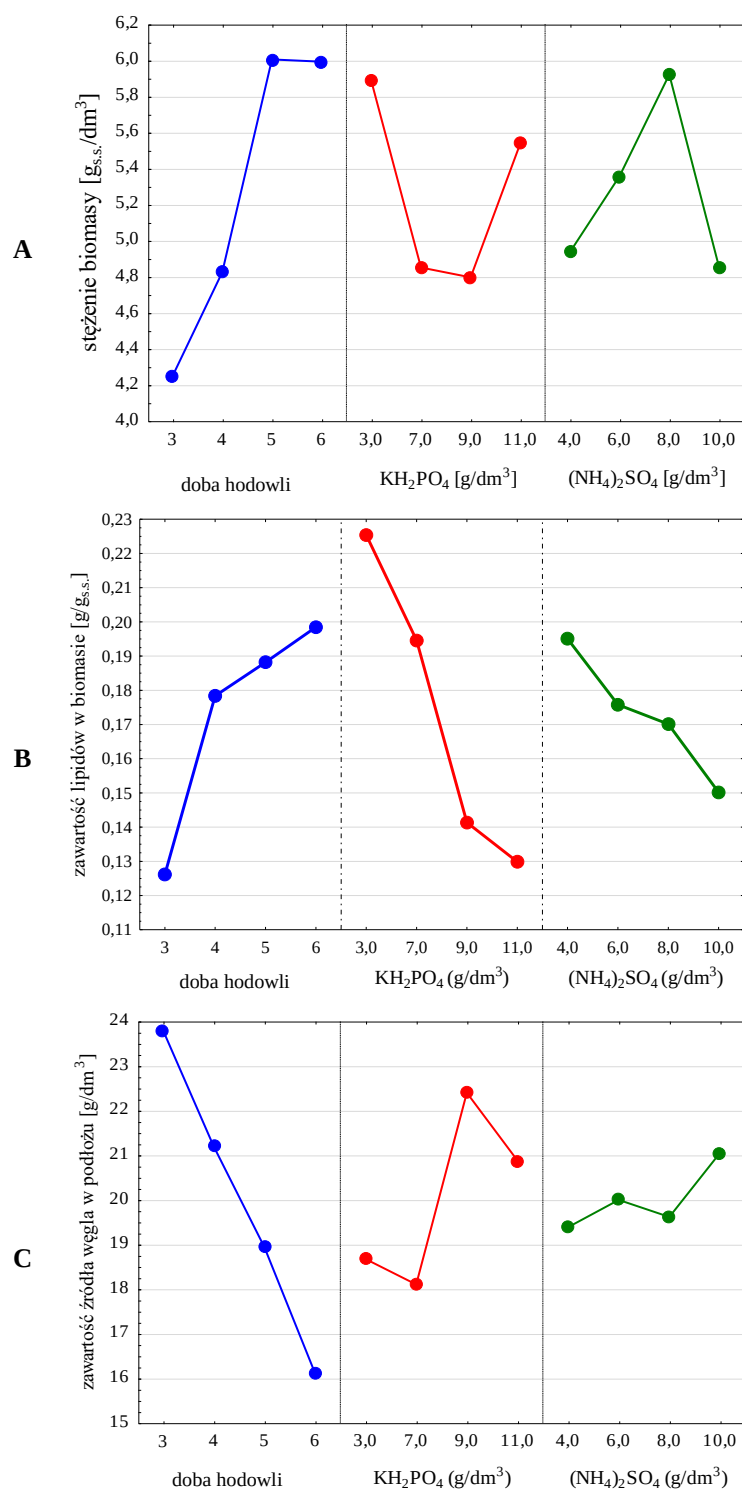
4. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

4.1. Badanie stymulacji biosyntezy *ex novo* lipidów komórkowych metodą limitacji źródeł azotu oraz fosforu

Weryfikacja hipotezy [H1]: Limitacja źródeł fosforu i/lub azotu w podłożach hodowlanych z hydrofobowym źródłem węgla, jest skuteczną metodą stymulacji biosyntezy mikrobiologicznych lipidów w komórkach olejogennych drożdży *Y. lipolytica*.

Aby ocenić wpływ poziomu dodatku źródeł fosforu i azotu, a także czasu trwania hodowli na: wzrost biomasy *Y. lipolytica*, wydajność biosyntezy *ex novo* lipidów komórkowych i wykorzystanie hydrofobowego substratu (posmażalniczego oleju rzepakowego) jako źródła węgla, przeprowadzono hodowlę wytrząsaną w 16 wariantach podłoży, w których stężenia KH_2PO_4 (źródła fosforu) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (źródła azotu) oraz czas trwania hodowli modyfikowano zgodnie ze schematem doświadczenia (Tabela 1) [P2]. Plon biomasy drożdży była ściśle związana tylko z czasem trwania hodowli (p -value = 0,01, Rys. 2A). Wpływ czasu trwania hodowli drożdży był również istotny dla wewnątrzkomórkowej zawartości lipidów. Poziom suplementacji KH_2PO_4 okazał się być istotnym czynnikiem wpływającym na wydajność kumulacji lipidów (p -value = 0,01, rys. 2B). Wyższa wydajność biosyntezy lipidów w komórkach drożdży związana była z niższymi dawkami nieorganicznego źródła fosforu w pożywce, a w przypadku poziomu dodatku źródła azotu w postaci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nie stwierdzono istotnego wpływu w badanym zakresie stężeń. Warto zauważyć, że żaden z trzech analizowanych czynników nie był istotnie związany ze zmianami zawartości źródła węgla w postaci odpadowego oleju posmażalniczego w pożywce, niemniej jednak zmniejszała się ona wraz z czasem (Rys. 2C). Eksperyment miał charakter badań wstępnych.

W celu analizy wpływu wcześniej wybranych czynników przeprowadzono też hodowlę okresowe szczepu drożdży *Y. lipolytica* w bioreaktorze laboratoryjnym. Na podstawie wyników etapu wstępnego wytypowano 4 warianty podłoży hodowlanych o zróżnicowanych stosunkach C/N i C/P. W każdej hodowli analizowano zmiany pH podłoża hodowlanego i tempo zużycia tlenu.



Rys. 2. Zależność pomiędzy (A) stężeniem biomasy, (B) zawartością lipidów komórkowych w biomacie, (C) zawartością odpadowego źródła węgla w podłożu, a stężeniem KH_2PO_4 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oraz czasem hodowli drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 w podłożu z 5% dodatkiem posmażalniczego oleju rzepakowego.

Źródło azotu uważane jest za szczególnie składnik, którego ograniczona ilość stymuluje wydajność procesu lipogenezy w komórkach drożdży olejogennych. Gdy podłoże hodowlane jest ubogie w związki azotowe lub gdy pula azotu została wyczerpana, synteza kwasów nukleinowych i białek jest hamowana, tempo wzrostu biomasy spada, a intensyfikacji ulega biosynteza wewnątrzkomórkowych lipidów [Papanikolaou i Aggelis 2011]. Według Bellou i wsp. [2016], ograniczenie dostępu do źródła azotu jest czynnikiem warunkującym wydajną biosyntezę lipidów komórkowych szlakiem *de novo*. Ciągła hodowla dzikiego szczepu drożdży *Y. lipolytica* ACADC50109 w podłożu z glukozą i przy jednoczesnym ograniczeniu dodatku azotu i magnezu, pozwoliła uzyskać wysoką wydajność kumulacji SCO (na poziomie 47,5%) przy stężeniu biomasy 12,2 g/dm³. Zastosowane podłoże oraz tryb hodowli pozwoliły uzyskać 5,8 g oleju w przeliczeniu na dm³ podłoża. Wydajna kumulacja lipidów była spowodowana niskimi dawkami źródła azotu, w postaci ekstraktu drożdżowego. Zastosowane dawki były jednak na poziomie umożliwiającym wzrost biomasy drożdży. Korelacja ta była związana z utrzymaniem prawidłowego funkcjonowania szlaku pentozowo-fosforanowego, który dostarczał koenzymu NADPH, wykorzystywanego w biosyntezie kwasów tłuszczowych w komórkach. To pokazuje, że zrozumienie fizjologii drożdży olejogennych ma ogromne znaczenie dla wydajnej produkcji SCO [Bellou i wsp 2016].

Istnieją doniesienia, że obecność organicznych źródeł azotu w pożywce, np. ekstraktu drożdżowego, może stymulować mikrobiologiczną syntezę lipidów [Beopoulos i wsp. 2008, Tsigie i wsp. 2011]. Przeprowadzony eksperyment zakładał użycie podłoża zawierającego wyłącznie składniki mineralne, z wyłączeniem źródła węgla, a jedyne źródło azotu stanowił siarczan(VI) amonu - (NH₄)₂SO₄.

Po 63 godzinach okresowej hodowli dzikiego szczepu *Y. lipolytica* KKP 379 w podłożu mineralnym M1, z jednoczesną limitacją źródła fosforu (3,0 g/dm³ KH₂PO₄) i azotu (3,0 g/dm³ (NH₄)₂SO₄), uzyskano najwyższą wydajność wewnątrzkomórkowej kumulacji lipidów - 47,44%. Pomimo bardzo wysokiej zawartości lipidów w komórkach, wynik nie był zadowalający, ze względu na znikomy wzrost biomasy (0,78 g_{s.m.} / dm³), ilość SCO uzyskanego na jednostkę podłoża była niska - 0,37 g/dm³. W hodowli M1, stosunki molowe C/N i C/P wynosiły odpowiednio 71,8 i 114,9. Stosunek molowy C/N = 20 uważany jest za minimalny dla efektu stymulacji kumulacji lipidów w komórkach drożdży [Carsanba i wsp. 2018]. W eksperymencie najniższy zastosowany stosunek C/N w podłożu hodowlanym wynosił 21,5. Zastosowana limitacja podłoża,

zarówno w azot jak i fosfor, przyczyniła się do poprawy wydajności procesu kumulacji lipidów komórkowych, jednak zastosowane dawki tych pierwiastków okazały się zbyt niskie, by umożliwić intensywny wzrost drożdży.

Zwiększenie dawki azotu do 8 g/dm^3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, przy niezmienionej dawce fosforu, pozwoliło na uzyskanie wyższego stężenia biomasy w hodowli M2 było wyższe ($11,80 \text{ g}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$), w porównaniu do hodowli M1, ale wydajność biosyntezy lipidów była ponad dwukrotnie niższa. Ciekawe obserwacje poczyniono, porównując wyniki hodowli w podłożu M2 (8 g/dm^3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $3,0 \text{ g/dm}^3$ KH_2PO_4) i M4 ($4,0 \text{ g/dm}^3$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $7,0 \text{ g/dm}^3$ KH_2PO_4), gdzie zastosowano odwrócone proporcje źródeł fosforu i azotu w podłożach. Wyższy plon biomasy obserwowano w hodowli M2 z większym dodatkiem źródła azotu (M2 - $11,10 \text{ g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$, M4 - $7,45 \text{ g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$), natomiast w przypadku hodowli M4, o wyższym udziale źródła fosforu i limitacji azotu, obserwowano istotnie wyższą wydajność biosyntezy lipidów w komórkach (M2 - $20,90\%$, M4 - $30,07\%$). W kontekście wydajnej biosyntezy SCO, limitacja źródła azotu ma kluczowe znaczenie. Mimo to, ilość oleju mikrobiologicznego możliwa do pozyskania z dwóch porównywanych hodowli była zbliżona (M2 - $2,32 \text{ g/dm}^3$, M4 - $2,24 \text{ g/dm}^3$).

Fosfor to składnik niezbędny do budowy nie tylko kwasów nukleinowych, fosfolipidów, ale także koenzymów uczestniczących bezpośrednio w wielu reakcjach enzymatycznych szlaków metabolicznych drożdży olejogennych [Michalik i wsp. 2014]. Według Wu i wsp. [2010], ograniczenie fosforu może być potencjalnie wykorzystane w regulacji produkcji lipidów przez mikroorganizmy, również w podłożach bogatych w źródło azotu. Na podstawie eksperymentów własnych można stwierdzić, że zwiększony dodatek źródła fosforu do podłoża ubogich w azot może prowadzić do wydajniejszej kumulacji lipidów, bez negatywnego wpływu na wzrost spowodowany limitacją azotu. Zarówno eksperymenty w bioreaktorach, jak i wstępne hodowle wytrząsane podkreśliły rolę fosforu jako składnika podłoża w procesach związanych z podstawowym metabolizmem komórek drożdży, jak i biosyntezą SCO. Innymi słowy, limitacja składników odżywczych stanowi dobre narzędzie dające nowe możliwości regulacji biosyntezy lipidów przez drożdże, które należy uwzględnić wykorzystując złożone materiały odpadowe jako substraty w procesie hodowli.

Przeprowadzone obserwacje pozwoliły na potwierdzenie hipotezy **[H1]**. Limitacja źródeł fosforu i/lub azotu okazała się skuteczną metodą stymulacji biosyntezy mikrobiologicznych lipidów w komórkach drożdży olejogennych w podłożach zawierających lipidowe źródło węgla. Rola fosforu, w połączeniu z kwestią suplementacji

podłoży źródłem azotu, wymaga dalszych badań, szczególnie w kontekście roli tych pierwiastków w szlakach metabolizmu drożdży *Y. lipolytica* towarzyszących wewnątrzkomórkowej biosyntezie lipidów.

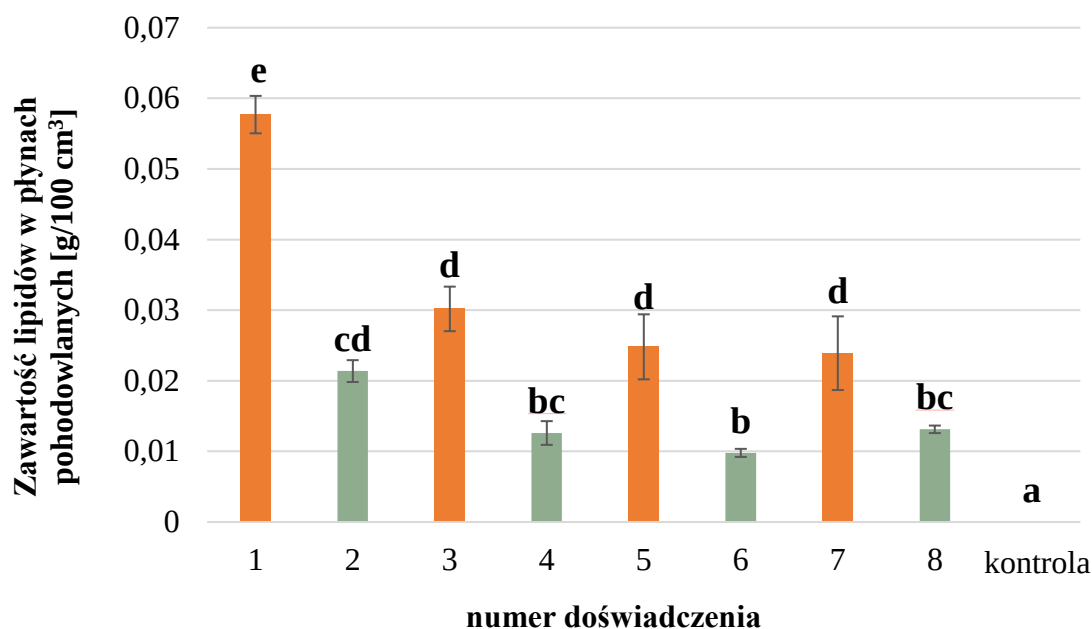
4.2. Analiza wydajności wybranych metod ekstrakcji lipidów komórkowych

Weryfikacja hipotezy [H2]: Traktowanie biomasy z wykorzystaniem US, PEF, HPH może wspomagać ekstrakcję lipidów z komórek drożdży prowadzoną metodami klasycznymi.

Aby zintensyfikować proces ekstrakcji lipidów z komórek mikroorganizmów stosuje się różnego typu metody fizycznej lub chemicznej obróbki wstępnej biomasy. Pozwalają one na przerwanie ciągłości błony i ściany komórkowej oraz ułatwienie penetracji wnętrza komórki przez stosowane podczas ekstrakcji rozpuszczalniki organiczne. Ich skuteczność zależy jednak od rodzaju mikroorganizmów i różni się w zależności od struktury ściany i błony komórkowej [P3]. W celu analizy efektywności tzw. niekonwencjonalnych metod ekstrakcji oleju mikrobiologicznego z komórek drożdży *Y. lipolytica*, dokonano porównania wydajności klasycznej metody ługowania (metoda Folcha) z ekstrakcją wspomaganą pulsacyjnym polem elektrycznym (PEF), falami ultradźwiękowymi (US) oraz homogenizacją wysokociśnieniową (HPH).

Wykorzystując US przeprowadzono również próbę uwolnienia lipidów wewnątrzkomórkowych do fazy ciągłej zawiesiny, testując, czy możliwe jest wydobycie lipidów bez stosowania rozpuszczalników organicznych. W przeprowadzonym eksperymencie, zawiesiny komórek drożdży w wodzie, o stężeniu 10 lub 30%, poddawano działaniu fal ultradźwiękowych o amplitudzie 105 lub 210 μm przez 5 lub 10 minut, zgodnie z planem doświadczenia przedstawionym w Tabeli 3. Zastosowanie sonikacji pozwoliło na uzyskanie wyższego stopienia wydobycia lipidów z komórek drożdży, w stosunku do próbki zawiesiny niepoddanej działaniu ultradźwięków, potwierdzając tym samym rolę sonikacji w dezintegracji struktur komórkowych (Rys. 3) Mimo zastosowania US ilość lipidów przechodzących do fazy ciągłej mieściła się w zakresie jedynie kilku procent. W przypadku próbki kontrolnej, która nie była poddawana działaniu ultradźwięków, olej mikrobiologiczny nie został wykryty w fazie ciągłej zawiesiny. Należy zauważyć, że największy wyciek oleju mikrobiologicznego do zawiesiny (6 g/100 cm³) odnotowano w próbce poddanej 10-minutowej ekspozycji na fale ultradźwiękowe o amplitudzie 105 μm . Wyniki doświadczenia wykazały również,

że proces przebiegał bardziej efektywnie, gdy stężenie komórek w zawieszynie było niższe, na poziomie 10%. Warto zauważyć, że wszystkie próbki poddane sonikacji charakteryzowały się obecnością oleju mikrobiologicznego w zawiesinach, co świadczy o permeabilizacji struktur komórkowych drożdży i uwolnieniu wewnątrzkomórkowych lipidów do środowiska zewnętrznego.



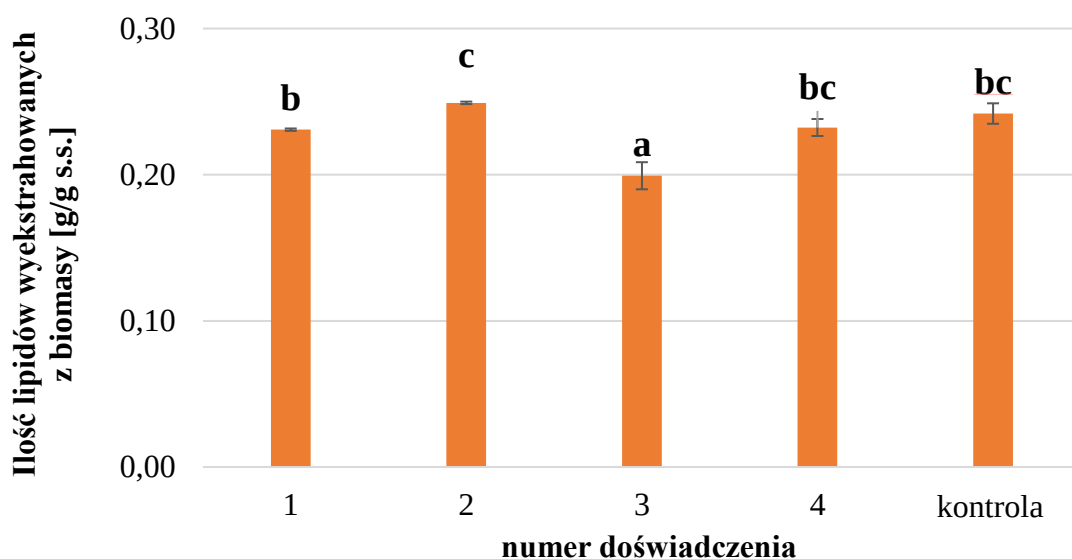
Rys. 3. Zawartość lipidów w fazie ciągłej zawiesziny poddanej obróbce ultradźwiękowej. Parametry doświadczeń przedstawiono w tabeli 3. (kolor pomarańczowy – 10% udział biomasy w zawieszynie, kolor zielony – 30% udział biomasy w zawieszynie).

* Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$).

Wstępne eksperymenty z wykorzystaniem pulsacyjnego pola elektrycznego wykazały, że, im wyższa średnia energia pola, tym wyższa wydajność ekstrakcji oleju mikrobiologicznego z biomasy drożdży, prowadzonej już przy użyciu rozpuszczalników organicznych metodą Folcha ze względu na prawdopodobnie lepszy efekt permeabilizacji struktur komórkowych. W związku z powyższym, korzystne byłoby zastosowanie, najwyższego z badanych, napięcia pola elektrycznego na poziomie 17 kV. Jednak przy tej wartości, system aplikacji impulsów elektrycznych został rozładowany, ze względu na zbyt wysoką przewodność poddawanej obróbce zawiesziny. W kolejnym eksperymencie zastosowano niższe napięcie pola wynoszące 10 kV i średnią energię około 100 J/g roztworu. Zaobserwowano jedynie nieistotne różnice w zawartości oleju mikrobiologicznego ekstrahowanego z biomasy poddanej działaniu PEF (38,17%), jak i próby kontrolnej (41,06%).

Na rys. 4. przedstawiono średnią wydajność ekstrakcji oleju wyekstrahowanego za pomocą rozpuszczalników metodą Folcha z wysuszonej biomasy drożdży *Y. lipolytica* odebranej z zawiesin poddawanych homogenizacji wysokociśnieniowej. Nie wykazano znaczących różnic zarówno pomiędzy kolejnymi eksperymentami, jak i w porównaniu z próbką kontrolną. W ten sposób potwierdzono, że poddanie biomasy działaniu HPH w założonych warunkach, nie spowodowało dodatkowej perforacji struktur komórkowych, pozwalającej na intensyfikację ekstrakcji lipidów z biomasy. Prawdopodobnie rozpuszczalnik użyty do ekstrakcji degraduje błony komórkowe w takim stopniu, że nie obserwuje się dodatkowego efektu wywołanego działaniem HPH.

Oceniono również wyciek oleju mikrobiologicznego do fazy ciągłej zawiesiny komórek drożdży poddanych homogenizacji wysokociśnieniowej. Niewielką ilość oleju mikrobiologicznego (2%), obserwowano tylko dla wariantu, w którym zastosowano ciśnienie 700 barów (Tabela 5). Obróbka za pomocą HPH w założonych warunkach eksperymentu była najprawdopodobniej niewystarczająca do wywołania perforacji struktur komórkowych drożdży *Y. lipolytica* i wycieku lipidów.



Rys. 4. Ilość lipidów wyekstrahowanych z suchej biomasy komórkowej odebranej z zawiesiny poddawanej działaniu HPH. Parametry doświadczeń przedstawiono w tabeli 5. * Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$).

Biorąc pod uwagę niezadowalające wyniki eksperymentów z wykorzystaniem HPH i PEF, w kolejnym etapie zmodyfikowano parametry doświadczeń i ponownie oceniono przydatność metod obróbki wstępnej komórek drożdży. Gdy ekstrakcję poprzedzono obróbką PEF przy średniej energii dostarczonej do próbki zwiększonej ze 100 do 200 J/g,

przy niezmiennionej wartości natężenia na poziomie 10 kV, wydajność ekstrakcji metodą Folcha została istotnie zwiększona z 30,1% do 36,5%. W przypadku HPH i 10-krotnego zastosowania ciśnienia 1100 barów, wydajność ekstrakcji lipidów z biomasy wyniosła 45,7% (Tabela 7). W ten sposób modyfikacja parametrów metod obróbki biomasy (PEF oraz HPH) pozwoliła na istotne zwiększenie wydajności tradycyjnej ekstrakcji, metodą Folcha, potwierdzając postawioną hipotezę [H2].

Tabela 7. Wpływ homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH) oraz pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) jako metod obróbki wstępnej biomasy na wydajność ekstrakcji lipidów z komórek drożdży *Y. lipolytica*

* Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$).

	Ilość wyekstrahowanych lipidów [g/100 g _{s.m.}]		Stopień wymycia lipidów [%]
	Całkowita ilość wyekstrahowanych lipidów (metoda Folcha)	Wymycie lipidów (ekstrakcja heksanem)	
Kontrola	30,1 ± 0,3 ^a	20,2 ± 0,1 ^a	67,1
PEF	36,5 ± 0,1 ^b	26,4 ± 0,1 ^b	72,3
HPH	45,7 ± 0,4 ^c	27,0 ± 0,1 ^b	59,1

Jednak, aby zastosowane techniki skutecznie zwiększały wydajność ekstrakcji, konieczne było dostarczenie większej ilości energii oraz wydłużenie czasu obróbki. W badaniu Drévillon i wsp. [2019], wykorzystanie PEF również zwiększało wydajność ekstrakcji oleju mikrobiologicznego z suchej biomasy. W jednym z badań, średnia ilość lipidów wewnątrzkomórkowych możliwych do ekstrakcji z suchej biomasy po zastosowaniu PEF wzrosła z 19,8% do 29,4% [Drévillon i wsp. 2019].

Z kolei przy zastosowaniu homogenizacji pod ciśnieniem 2000 barów, przy 15 przepływach próbki przez homogenizator, wydajność ekstrakcji lipidów z komórek drożdży *Saitozyma podzolica* DSM 27192, po ekstrakcji metodą Folcha, wyniosła 37,8% [Gorte i wsp. 2020]. W badaniu własnym, zastosowanie łagodniejszych parametrów HPH jako sposobu wsparcia klasycznej metody ekstrakcji, pozwoliło na uzyskanie wyższej wydajności. Istnieją również badania, w których zastosowano homogenizację wysokociśnieniową w stosunku do 15% zawiesiny komórek drożdży *Y. lipolytica* JMY5578. Zawiesinę biomasy przepuszczono przez homogenizator 20 razy pod ciśnieniem 1500 barów. Zastosowana obróbka pozwoliła uzyskać wydajność ekstrakcji oleju z wysuszonej biomasy na poziomie 83,9% - w porównaniu do kontroli 19,8% [Drévillon i wsp. 2019]. Może to wskazywać, że warunki homogenizacji

wysokociśnieniowej zastosowane w badaniu własnym były zbyt łagodne, aby degradować struktury komórkowe drożdży i w konsekwencji zwiększyć wydajność wewnątrzkomórkowej ekstrakcji oleju metodą Folcha.

Sonikacja uważana jest za skuteczną metodę uwalniania białek z biomasy mikroorganizmów, na skutek permeabilizacji i wysokiego stopnia rozluźnienia ściany i błony komórkowej drożdży [Kapturowska i wsp. 2014]. W badaniu Fabiszewskiej i wsp. [2023] analizowano stężenie białka w fazie ciągłej po różnych procesach, mających na celu dezintegrację komórek drożdży *Y. lipolytica*, w tym PEF, HPH, US oraz metod wykorzystujących szklane kulki, Triton czy Tween 80. Najwyższą zawartość białka uzyskano po zastosowaniu PEF (0,443 mg/ml) i US (0,430 mg/ml). W przypadku pozostałych metod, w tym HPH, nie odnotowano istotnych różnic w porównaniu z próbką kontrolną, którą stanowiła woda redestylowana. Obserwacje mikroskopowe autorów potwierdziły, że najwyższy stopień dezintegracji komórek drożdży *Y. lipolytica* odnotowano w przypadku zastosowania PEF i US [Fabiszewska i wsp. 2023]. W badaniu własnym, stopień permeabilizacji struktury błony i ściany komórkowej oceniano poprzez porównanie ilości lipidów możliwych do wymycia z odebranej z zawiesiny biomasy drożdży, jedynie po przemyciu heksanem, w stosunku do ilości lipidów wyekstrahowanych metodą Folcha. Wyniki wyrażono jako stopień wymycia lipidów (%) (Tabela 7). W przypadku obróbki PEF, uzyskano większy stopień wymycia lipidów (72,3%), niż gdy biomasę poddano działaniu HPH (59,1%). Potwierdzałoby to obserwacje poczynione przez Fabiszewską i wsp. [2023], że PEF w większym stopniu wpływał na permeabilizację i/lub dezintegrację błony i ściany komórkowej, co ułatwiło penetrację komórek przez rozpuszczalnik.

4.3. Hodowle drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego

Ważnym wyzwaniem, w prowadzeniu zrównoważonej hodowli drożdży olejogennych, jest zapewnienie optymalnych warunków, zarówno dla wzrostu mikroorganizmów, jak i wydajnej biosyntezy wewnątrzkomórkowych lipidów. Pomocna jest charakterystyka substratów wykorzystywanych jako źródła węgla w podłożu hodowlanym, na podstawie której należy odpowiednio dobrać dawki pozostałych składników podłoża hodowlanego. W szczególności, jeśli jako substraty, tak jak w niniejszej pracy, planowane do wykorzystania są odpady przemysłu rolno-spożywczego o złożonym składzie.

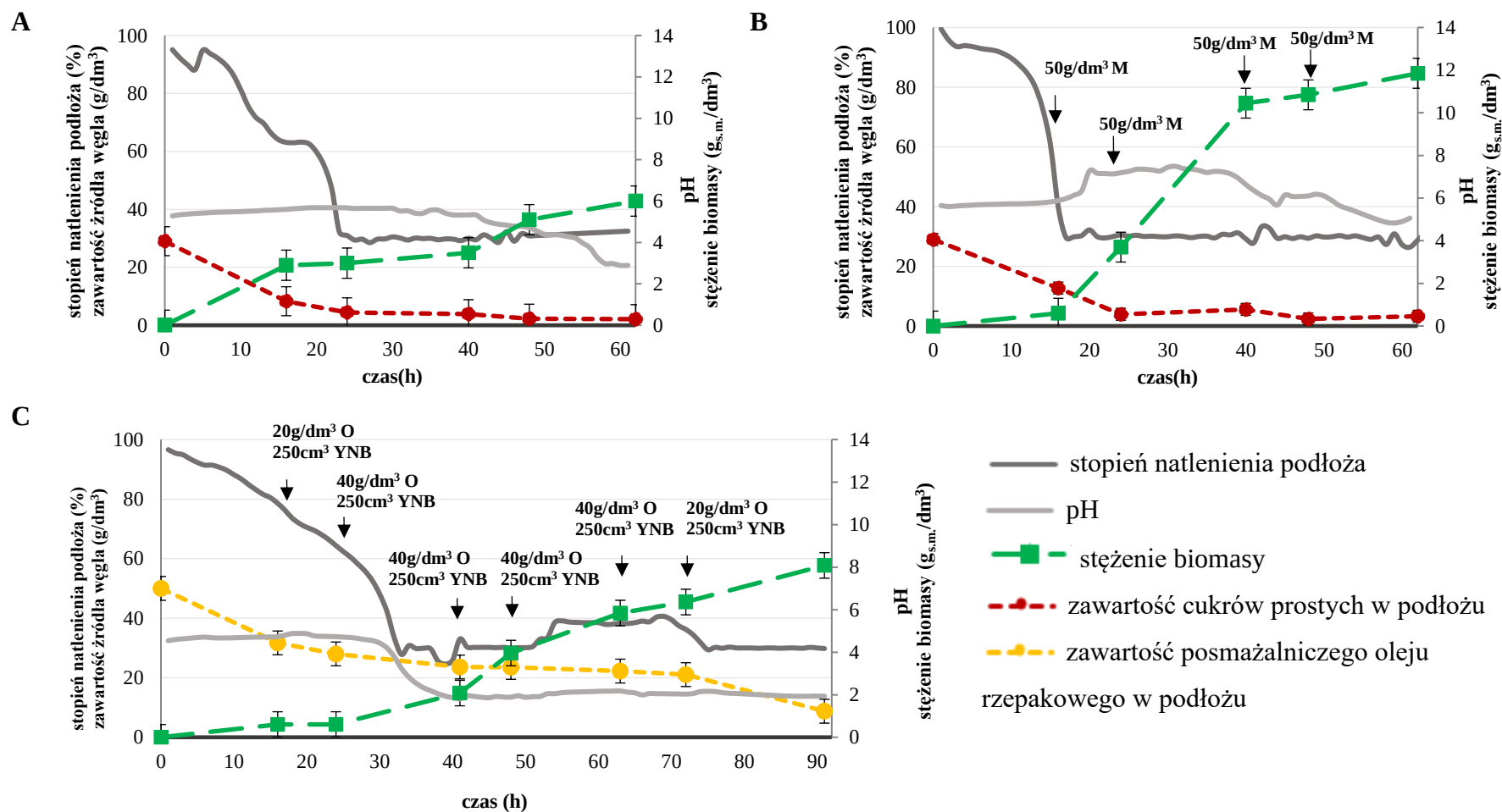
W kolejnym eksperymencie prowadzonym w ramach pierwszego etapu badań, ocenie poddano wpływ trybu hodowli oraz zastosowanych substratów na wzrost szczepu *Y. lipolytica* KKP 379 i jego zdolność do wewnątrzkomórkowej biosyntezy lipidów. Zbadano możliwość wykorzystania wybranych hydrofilowych (melasa, serwatka) i hydrofobowych (posmażalniczy olej rzepakowy) produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego jako źródeł składników energetycznych i odżywczych, niezbędnych do hodowli drożdży olejogennych.

4.3.1. Wpływ warunków hodowli na wzrost drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających substraty o charakterze odpadowym

W podłożach M1-b i M2-fb hydrolizat melasy był jedynym źródłem węgla i głównym źródłem składników mineralnych. Melasa to brązowy odciek, będący produktem ubocznym oddzielania kryształów sacharozy w końcowym etapie produkcji cukru. Przy produkcji 1 tony cukru powstaje około 0,38 tony melasy. Ten gęsty i lepki syrop składa się, w przybliżeniu, z 20% wody i 80% suchej masy. Melasa zawiera duże ilości sacharozy i cukrów redukujących (20-60%), a także mniejsze ilości soli nieorganicznych, związków azotowych, witamin oraz substancji barwiących. Ze względu na swój skład melasa od lat wykorzystywana jest jako tani substrat do przygotowania podłoży do hodowli drożdży [Chauhan i wsp. 2011, Zhang i wsp. 2020].

W przypadku okresowej hodowli w podłożu M1-b początkowe stężenie hydrolizatu melasy jako źródła węgla okazało się niewystarczające do zaspokojenia potrzeb metabolicznych drożdży. Niska zawartość cukrów w podłożu utrudniała wzrost biomasy, w wyniku czego po 62 godzinach hodowli jej stężenie wyniosło ostatecznie $6,0 \text{ g}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$ (Rys. 5A). Początkowa zawartość zhydrolizowanej melasy w podłożu wynosiła $50 \text{ g}/\text{dm}^3$, co odpowiadało $29 \text{ g}/\text{dm}^3$ cukrów prostych. Drożdże zużyły niemal całą dostępną pulę źródła węgla w podłożu, a końcowa zawartość cukrów prostych w podłożu spadła do $2,7 \text{ g}/\text{dm}^3$.

W okresowej hodowli z zasilaniem, podłoże M2-fb, uzupełniano źródłem węgla w 16, 24, 40 i 48 godzinie procesu, każdorazowo dodając hydrolizat melasy w ilości $50 \text{ g}/\text{dm}^3$ (Rys. 5B). Suplementacja podłoża hydrolizatem melasy pozwoliła uzyskać stężenie biomasy na poziomie $11,85 \text{ g}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$. Po 62 godzinach okresowej hodowli drożdży w podłożu suplementowanym melasą, zawartość cukrów prostych w płynie hodowlanym spadła do $3,28 \text{ g}/\text{dm}^3$.



Rys. 5. Zmiany wartości pH, stopnia natlenienia podłoża, pH, stężenia biomasy szczepu *Y. lipolytica* KKP 379 oraz zawartości cukrów redukujących w hodowlach (a) M1-b i (b) M2-fb z hydrolizatem melasy (M) jako hydrofilowym źródłem węgla i zawartości hydrofobowego źródła węgla w podłożu (c) O1-fb z posmażalniczym olejem rzepakowym (O), uzupełnianym podłożem YNB.

Według Thevenieau i Nicoud [2013], substraty wykorzystywane jako źródła węgla stanowią 60-75% kosztów biosyntezy SCO. Z ekonomicznego punktu widzenia, koszty te można zredukować, wykorzystując organiczne odpady przemysłowe, w tym te pochodzące z przemysłu spożywczego. W czasie okresowej hodowli z zasilaniem M2- fb, drożdże zutylizowały łącznie blisko 567 g cukrów prostych z odpadowej melasy, co daje $141,72 \text{ g}_{\text{cukrów prostych}}/\text{dm}^3$ podłoża hodowlanego. Zastosowany tryb hodowli, oprócz środowiskowego aspektu utylizacji melasy jako produktu ubocznego procesu produkcji cukru, w sposób znaczący może pozwolić na obniżenie kosztów hodowli olejogennych drożdży.

Hodowlę O1-fb przeprowadzono w podłożu, w którym źródłem węgla dla komórek drożdży *Y. lipolytica* był posmażalniczy olej rzepakowy. W przeciwieństwie do hodowli prowadzonych w podłożach z melasą, hodowla ta trwała 90 godzin. Dwa razy dziennie odbierano 250 cm^3 podłoża hodowlanego, a następnie uzupełniano je określoną ilością hydrofobowego źródła węgla oraz 250 cm^3 sterylnego stężonego podłoża YNB (Rys. 5C). Zastosowane warunki hodowli oraz skład podłoża pozwoliły na uzyskanie stężenia biomasy w hodowli równej $8,08 \text{ g}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$. Drożdże efektywnie wykorzystywały odpadowe źródło węgla — pod koniec hodowli w podłożu pozostało jedynie $8,76 \text{ g}/\text{dm}^3$ posmażalniczego oleju. W trakcie procesu do hodowli O1-fb dodano łącznie 1 dm^3 ($250 \text{ g}/\text{dm}^3$) odpadowego oleju posmażalniczego, co podkreśla potencjał drożdży *Y. lipolytica* do mikrobiologicznej utylizacji hydrofobowych odpadów.

Olejogenny szczep *Y. lipolytica* KKP 379 hodowano także w podłożach z posmażalniczym olejem rzepakowy, olejem rzepakowym tłoczonym oraz dodatkiem kwaśnej serwatki. Będąc w zgodzie z zasadami zrównoważonego rozwoju i celami stawianymi przez Organizację Narodów Zjednoczonych, koncepcja przedstawiona w artykule [P5] zakładała wykorzystanie serwatki jako częściowego substytutu wody wodociągowej, stosowanej do przygotowania podłoża hodowlanego, celem ograniczenia jej zużycia w procesie hodowli mikroorganizmów olejogennych i produkcji oleju mikrobiologicznego. W innych pracach zespołu badaczy z Katedry Chemii Instytutu Nauk o Żywności SGGW, w roli substytutu wody wykorzystanej do hodowli drożdży z gatunku *Y. lipolytica*, zastosowano solankę. Autorom rozwiązania, decyzją Urzędu patentowego Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 28.03.2023 r. udzielono patentu na wynalazek pt.: „Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych” (PK/8286/RWAK).

Na skład serwatki wpływa wiele czynników, np. faza laktacji, sposób hodowli bydła czy przechowywanie mleka [Rocha-Mendoza i wsp. 2021]. Serwatka składa się w około 93% z wody i zawiera 55% składników odżywczych obecnych w mleku oraz około 20% całkowitej zawartości białka. Jej żółto-zielony kolor wynika z obecności ryboflawiny (witaminy B12). Jednym z głównych składników serwatki jest laktoza, której zawartość waha się w granicach 70–75% całkowitej suchej masy [Jelicic i wsp. 2008, Pires i wsp. 2021]. Drożdże *Y. lipolytica* nie są zdolne do wykorzystania laktozy, głównego dwucukru obecnego w serwatce [Jach i Malm 2022]. Laktoza, nie była więc uznawana za źródło węgla w hodowli drożdży, podobnie jak związki hydrofobowe, które w serwatce stanowiły tylko 0,2% m/v. Serwatkę można było jednak uznać za dodatkowe źródło azotu, ze względu na udział białka - 1,4% m/v.

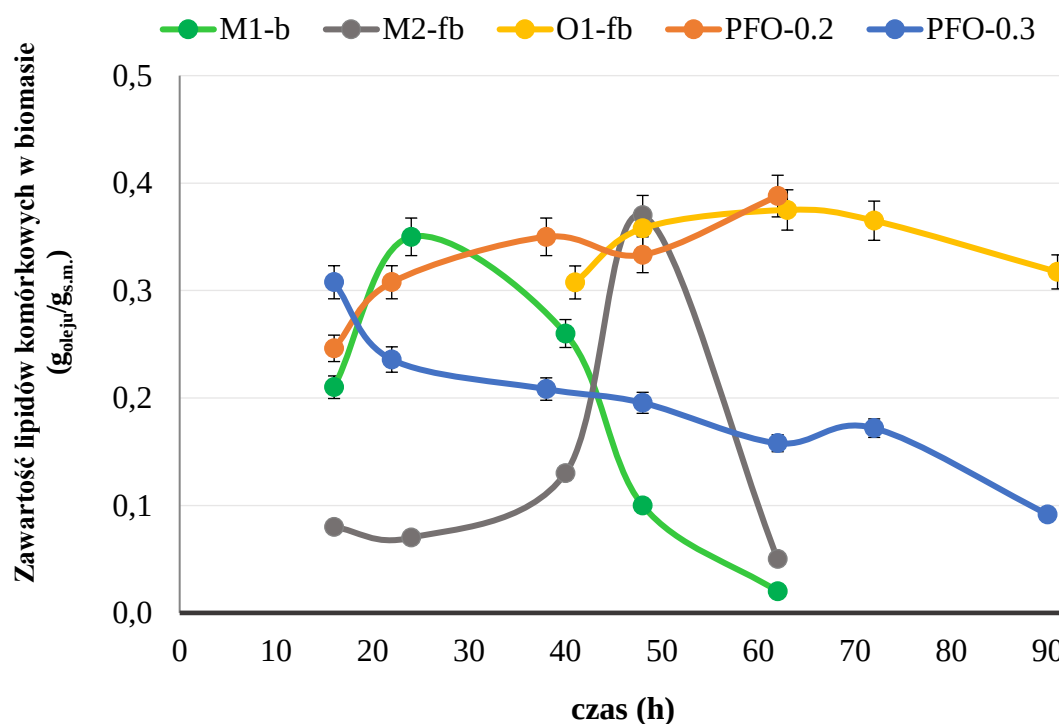
62-godzinna hodowla drożdży w podłożu z olejem rzepakowym tłoczonym na zimno i 30 % dodatkiem serwatki kwaśnej (CPO-0.3) pozwoliła na uzyskanie najwyższego stężenia biomasy, na poziomie 37,44 g_{s.m.}/dm³. Szczep efektywnie wykorzystywał hydrofobowe źródło węgla od początku hodowli. Jego stężenie w podłożu zostało zredukowane z 50 do 24,67 g/dm³ w ciągu pierwszych 16 godzin. Tak wysoki przyrost biomasy był prawdopodobnie związany z wysokim dodatkiem serwatki do podłoża hodowlanego. Podłoże hodowlane wzbogacone zostało poprzez dodatek (NH₄)₂SO₄ i KH₂PO₄. W przypadku hodowli drożdży w podłożu CPO-0 z olejem tłoczonym na zimno, bez dodatku serwatki, stężenie biomasy było o prawie 40% niższe (25,44 g_{s.m.}/dm³).

Po 90 godzinach okresowej hodowli w podłożu PFO-0,3, końcowe stężenia biomasy wyniosło 22,1 g_{s.m.}/dm³. Drożdże efektywnie metabolizowały przy tym lipidowe źródło węgla, wykorzystując całą dostępną pulę odpadowego substratu. W hodowli PFO-0,2, znaczna części lipidowego źródła węgla pozostała niewykorzystana (30,22 g/dm³), co znalazło odzwierciedlenie w niższym przyroście biomasy drożdży (9,89 g_{s.m.}/dm³). Słabszy wzrost drożdży był prawdopodobnie związany z niższym udziałem serwatki w podłożu hodowlanym.

4.3.2. Wpływ warunków hodowli na wydajność kumulacji lipidów komórkowych drożdży *Y. lipolytica*

Dla poszczególnych wariantów hodowli, obserwowano również zmiany zawartości lipidów w komórkach na różnych etapach hodowli szczepu *Y. lipolytica* KKP 379 (Rys. 6). W każdej z analizowanych hodowli, tj. M1-b, M2-fb, O1-fb, PFO-0,2 i PFO- 0,3

wydajność kumulacji SCO osiągnęła wartość ponad 30 % suchej masy komórek, co jest zadowalającym wynikiem. Co ważne, dynamika biosyntezy lipidów mikrobiologicznych różniła się pomiędzy poszczególnymi wariantami. W przypadku podłoży, w których zastosowano hydrolizat melasy (M1-b i M2-fb), wydajność biosyntezy SCO była najwyższa w pierwszej i drugiej dobie hodowli. W przypadku hodowli w podłożu O1-fb, z lipidowym źródłem węgla, maksymalną wydajność kumulacji zaobserwowano w trzeciej dobie hodowli. W hodowli w podłożu M1-b, już po 24 godzinach udział lipidów w biomase wynosił 35 %. W kolejnych godzinach obserwowano spadek zawartości oleju mikrobiologicznego w biomase. Prawdopodobnie podłoże w okresowej hodowli M1-b okazało się zbyt ubogie w źródło węgla i inne składniki niezbędne do pokrycia zapotrzebowania komórek związanego ze wzrostem. Ten rodzaj limitacji zmusił komórki do gromadzenia wewnątrzkomórkowych lipidów, już w logarytmicznej fazie wzrostu. W podłożu M2-fb, maksimum wydajności biosyntezy lipidów przypadło na 48 godzinę hodowli, gdy zawartość SCO w komórkach osiągnęła 37 %. Po tym czasie, podobnie jak w przypadku hodowli M1-b, obserwowano spadek wydajności kumulacji lipidów.



Rys. 6. Zmiany zawartości lipidów w komórkach drożdży w czasie hodowli okresowej (M1-b) i okresowej z dozowaniem źródła węgla (M2-fb) w podłożach z melasą oraz okresowej hodowli z wymianą części podłoża z rzepakowym olejem posmażalniczym (O1-fb).

Spadek zawartości wewnątrzkomórkowych lipidów w biomacie podczas hodowli w podłożu z melasą można tłumaczyć mobilizacją komórkowych rezerw energetycznych w postaci SCO, ze względu na brak niezbędnych do wzrostu składników w podłożu. W przypadku obu hodowli drożdży, finalnie odnotowano spadek zawartości lipidów komórkowych w końcowej fazie eksperymentu. Skład podłoży nie zaspokajał zwiększonego zapotrzebowania biomasy na źródło węgla, co również skutkowało eksploatacją zasobów komórkowych.

Inny mechanizm zaobserwowano w hodowli w podłożu O1-fb. W 40 godzinie doświadczenia zawartość SCO w biomacie wynosiła 31,73% i utrzymywała się na stosunkowo wysokim poziomie do końca hodowli, osiągając maksimum wydajności w 63 godzinie (37,50%). W przypadku tej hodowli, maksymalna ilość oleju mikrobiologicznego, którą można było pozyskać z hodowli wynosiła 2,48 g/dm³ pod koniec eksperymentu.

Mimo iż większą ilość SCO (4,01 g/dm³) uzyskano w okresowej hodowli w podłożu M2-fb zasilanym melasą, to, z praktycznego punktu widzenia, lepszy rezultat uzyskano w okresowej hodowli w podłożu O1-fb zasilanym posmażalniczym olejem rzepakowym i porcjami świeżego podłoża YNB, ponieważ zawartość lipidów w komórkach została utrzymana na wysokim poziomie (ponad 30%) przez dłuższy czas trwania hodowli, w komercyjnym procesie taki wynik pozwalałby na cykliczne odbieranie biomasy stale zasobnej w SCO. Uzyskane wyniki wyraźnie podkreślają rolę dokarmiania zastosowanego podczas hodowli okresowej w poprawie wydajności procesu pozyskania oleju mikrobiologicznego na drodze hodowli drożdży olejogennych w podłożach zawierających substraty o charakterze odpadowym.

Zmiany zawartości lipidów zapasowych w komórkach analizowano także w przypadku okresowych hodowli w podłożach z posmażalniczym olejem rzepakowym i 20% (PFO-0,2) oraz 30% (PFO-0,3) dodatkiem serwatki. Największy udział lipidów komórkowych w biomacie z podłoża PFO-0,3 odnotowano w 16 godzinie hodowli (30,77%). W kolejnych godzinach obserwowano jednak spadek zawartości lipidów do 9,17%, co odpowiadało końcowemu stężeniu 2,02 g/dm³. Po 62 godzinach hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożu PFO-0,2, zawartość lipidów komórkowych osiągnęła najwyższy wynik, spośród omawianych wariantów hodowli, - 38,79%.

Wyższą końcową wydajność biosyntezy SCO w hodowli PFO-0,2 można wyjaśnić wyższym stosunkiem C/N w podłożu na skutek niższego dodatku serwatki, w porównaniu do hodowli PFO-0,3. Po raz kolejny zastosowanie niższych dawek azotu

i fosforu w podłożu hodowlanym skutkowało poprawą wydajności mikrobiologicznej biosyntezy lipidów.

Projektując skład podłoży zakładających wykorzystanie serwatki kwaśnej, bazowano na wynikach doświadczeń opisanych w sekcji 4.1. dotyczących wpływu limitacji źródeł azotu oraz fosforu na wydajność biosyntezy SCO. W podłożach PFO-0,2 i PFO-0,3 nie zastosowano dodatku źródła azotu w postaci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Zastosowano również obniżony dodatek źródła fosforu tj. KH_2PO_4 . (Tabela 2). Skład podłoża PFO-0,2 z niższym dodatkiem serwatki, sprzyjał wydajnej kumulacji SCO w komórkach. Stężenie lipidów komórkowych w hodowli wynosiło $3,84 \text{ g/dm}^3$. Zastosowanie 20% dodatku serwatki, jako źródła azotu w hodowli, okazało się być poziomem stymulującym wydajną biosyntezę wewnątrzkomórkowych i jednocześnie umożliwiającym wzrost biomasy. Niższy stosunek C/N w podłożu PFO-0,3 o większym udziale serwatki (30%), a tym samym większej zawartości azotu, nie sprzyjał kumulacji lipidów zapasowych.

Spostrzeżenia z opisywanych doświadczeń są zgodne z wynikami eksperymentu zespołu Taskin i wsp. [2015]. Zdaniem autorów, zastosowanie serwatki w podłożu hodowlanym wymaga ograniczenia lub wyeliminowania dodatkowych źródeł fosforu i azotu. W wyniku hodowli drożdży *Y. lipolytica* w kwaśnej serwatce autorzy dowiedli, że fosforan potasu, jako dodatkowe źródło fosforu, na wszystkich badanych poziomach stężeń ($0\text{--}2 \text{ g/dm}^3$) znacząco obniżyły wydajność kumulacji wewnątrzkomórkowych lipidów. W eksperymencie Taskina i wsp. [2015] w podłożu z serwatką, bez dodatkowego źródła azotu, uzyskano stężenie lipidów wynoszące $3,16 \text{ g/dm}^3$. Przeprowadzono wiele eksperymentów [Wu i wsp. 2010, Kolouchová i wsp. 2016, Huang i wsp. 2018, Hoarau i wsp. 2020], które wykazały, że w warunkach ograniczenia związków mineralnych i jednoczesnego nieograniczonego dostępu do źródła węgla, drożdże olejogenne gromadzą większe ilości lipidów w komórkach. Niniejszy eksperyment z wykorzystaniem serwatki w hodowli olejogennych drożdży *Y. lipolytica* jest kolejnym przykładem potwierdzającym to spostrzeżenie.

4.4. Analiza biomasy i wyekstrahowanych z niej olejów mikrobiologicznych pozyskanych na drodze hodowli z wybranymi odpadami przemysłu spożywczego

Kolejny etap badań miał na celu charakterystykę olejów mikrobiologicznych ekstrahowanych z drożdży *Y. lipolytica* hodowanych w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego. W tym celu przeprowadzono analizy zawartości składników odżywczych o potencjalnie prozdrowotnym działaniu, np. steroli, nienasyconych kwasów tłuszczowych, jak i zawartości wybranych ksenobiotyków, m.in. benzo[a]pirenu oraz metali ciężkich w wyekstrahowanych lipidach mikrobiologicznych. Dokonano także oceny czystości SCO pod względem braku pozostałości zastosowanych do ekstrakcji, rozpuszczalników.

Tym samym poddano weryfikacji hipotezę **[H3]**: Wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego mogą być wykorzystane jako substraty w hodowli drożdży olejogennych, mającej na celu pozyskanie mikrobiologicznych lipidów o korzystnym składzie.

4.4.1. Analiza profilu kwasów tłuszczowych lipidów mikrobiologicznych

W celu określenia wpływu warunków hodowli olejogennych drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 na końcowy skład olejów mikrobiologicznych zestawiono ze sobą wyniki składu kwasów tłuszczowych dla lipidów mikrobiologicznych pozyskanych z hodowli w podłożach z hydrofilowymi (melasą, glukozą) oraz hydrofobowymi (posmażalniczym olejem rzepakowym, rzepakowym olejem tłoczonym na zimno) źródłami węgla, a także serwatką w roli źródła azotu i częściowego substytutu wody (Tabela 8) **[P4, P5]**.

Można stwierdzić, że niezależnie od zastosowanych substratów i warunków hodowli, pozyskane oleje mikrobiologiczne składały się przede wszystkim z nienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. unsaturated fatty acids - UFA), których udział wahał się od 59,71 do 93,34 %. Szczep drożdży *Y. lipolytica* preferencyjnie kumulował nienasycone kwasy: oleinowy (C18:1) i linolowy (C18:2).

Tabela 8. Profil kwasów tłuszczowych (%) olejów mikrobiologicznych wyekstrahowanych z biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 z hodowli okresowej w podłożu (M1-b) i okresowej hodowli z dozowaniem źródła węgla (M2-fb) w podłożach z melasą oraz hodowli z wymianą części podłoża z dodatkiem rzepakowego oleju posmażalniczego (O1-fb), okresowej hodowli z olejem rzepakowym tłoczonym na zimno (CPO), okresowej hodowli z glukozą (GLU) oraz okresowych hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym (PFO) i 20% (PFO-0,2) oraz 30% (PFO- 0,3) dodatkiem serwatki kwaśnej

* Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$).

	[P4]		[P5]			[P6]		
	M1-b	M2-fb	CPO-0,3	PFO-0,2	PFO-0,3	GLU	CPO	PFO
C14:0	-	-	1,35 ± 0,03 ^a	0,81 ± 0,16 ^{ab}	0,82 ± 0,25 ^{ab}	-	-	-
C16:0	11,67 ± 0,66 ^b	13,69 ± 0,81 ^b	4,47 ± 0,71 ^a	19,22 ± 2,48 ^c	17,09 ± 0,06 ^{ab}	20,84 ± 1,51 ^c	5,71 ± 1,43 ^a	4,45 ± 0,72 ^a
C16:1	-	-	-	-	-	3,83 ± 0,57 ^a	0,78 ± 0,48 ^a	4,41 ± 0,82 ^a
C18:0	5,51 ± 1,66 ^b	4,65 ± 2,60 ^b	4,13 ± 2,72 ^b	9,97 ± 2,60 ^c	4,86 ± 0,13 ^b	8,62 ± 1,47 ^c	1,48 ± 0,12 ^a	0,74 ± 0,54 ^a
C18:1	52,65 ± 0,50 ^a	44,43 ± 1,72 ^a	71,60 ± 3,58 ^b	41,67 ± 4,40 ^a	52,94 ± 7,09 ^a	51,71 ± 1,73 ^a	62,16 ± 2,04 ^b	65,14 ± 0,68 ^b
C18:2	22,49 ± 1,90 ^b	30,75 ± 1,23 ^c	14,71 ± 1,51 ^a	15,61 ± 0,52 ^a	18,41 ± 0,43 ^a	13,14 ± 0,61 ^a	21,07 ± 0,21 ^b	18,04 ± 0,83 ^a
C18:3	7,68 ± 2,66 ^c	6,48 ± 1,89 ^c	0,77 ± 0,18 ^a	2,09 ± 0,51 ^{ab}	4,83 ± 0,90 ^b	1,86 ± 0,51 ^{ab}	8,24 ± 0,58 ^c	5,75 ± 0,67 ^b
C20:0	-	-	5,10 ± 0,59 ^a	9,68 ± 2,35 ^b	0,57 ± 0,19 ^a	-	0,17 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,09 ^a
C20:1	-	-	-	-	-	-	0,44 ± 0,09 ^a	1,03 ± 0,07 ^b
C22:0	-	-	0,65 ± 0,32 ^a	0,60 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,18 ^a	-	-	-
C22:1	-	-	0,20 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,10 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	-	-	-
C24:1	-	-	0,58 ± 0,32 ^b	0,12 ± 0,04 ^{ab}	0,08 ± 0,08 ^a	-	-	-
UFA	82,82 ± 5,06 ^c	81,66 ± 4,84 ^c	87,86 ± 5,23 ^c	59,71 ± 5,57 ^a	76,41 ± 5,64 ^{ab}	70,54 ± 0,04 ^b	92,25 ± 1,19 ^d	93,34 ± 0,02 ^d
MUFA	52,65 ± 0,50 ^a	44,43 ± 1,72 ^a	72,38 ± 3,89 ^b	42,01 ± 4,54 ^a	53,17 ± 6,98 ^a	55,54 ± 1,16 ^a	63,33 ± 1,65 ^{ab}	70,58 ± 0,06 ^b
PUFA	30,17 ± 4,56 ^b	37,23 ± 3,12 ^c	19,15 ± 1,34 ^a	17,70 ± 1,03 ^a	23,24 ± 1,33 ^a	15,00 ± 1,12 ^a	29,31 ± 0,37 ^b	23,79 ± 0,16 ^a
SFA	17,18 ± 2,32 ^b	18,34 ± 3,41 ^b	15,70 ± 2,89 ^b	40,28 ± 7,31 ^d	23,60 ± 0,32 ^c	29,46 ± 0,04 ^c	7,36 ± 1,27 ^a	5,63 ± 0,09 ^a

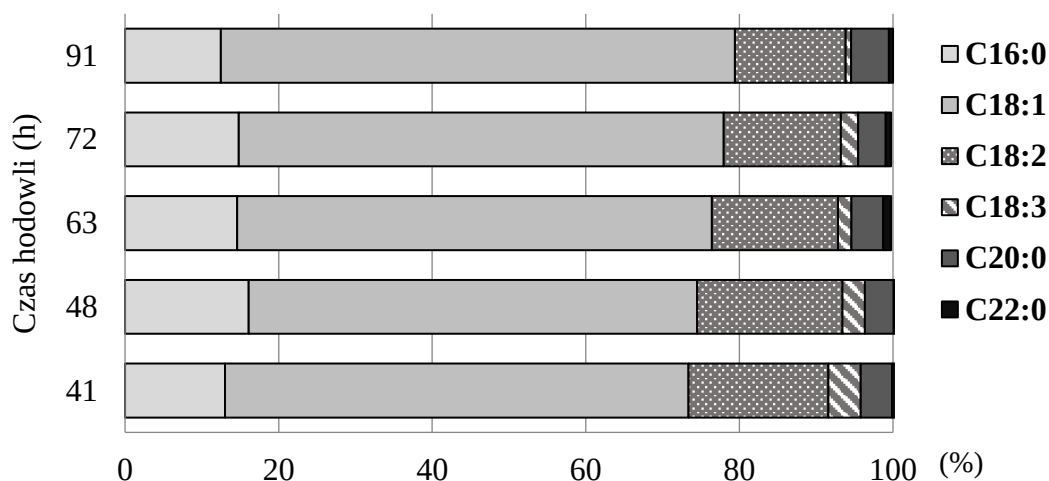
Papanikolaou i Aggelis [2003] wykazali, że komórki badanego gatunku drożdży preferencyjnie kumulowały kwas C18:1 oraz C18:2 w porównaniu do nasyconych kwasów: palmitynowego (C16:0) i stearynowego (C18:0), niezależnie od początkowych stężeń tych kwasów w substratach wyjściowych. Może to wynikać m.in. z wyższego powinowactwa białkowych nośników do kwasów tłuszczowych posiadających wiązania podwójne.

Lipidy komórkowe pozyskane z biomasy hodowanej w podłożu z glukozą charakteryzowały się wyższym udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych (ang. saturated fatty acids – SFA) (29,46 %), aniżeli oleje mikrobiologiczne pozyskane z hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym (5,63 %) czy rzepakowym olejem tłoczonym na zimno (7,36 %). Oleje mikrobiologiczne z hodowli w podłożach zawierających hydrofobowe źródła węgla były bardziej zróżnicowane pod względem składu kwasów tłuszczowych, w porównaniu do lipidów komórkowych z hodowli w podłożach z cukrami. Co więcej, cechą charakterystyczną olejów mikrobiologicznych syntezowanych szlakiem *ex novo*, okazał się szczególnie wysoki udział frakcji nienasyconej.

Lipidy komórkowe z hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym (PFO) oraz rzepakowym olejem tłoczonym na zimno (CPO) wyróżniały się największym udziałem kwasu oleinowego, który stanowił odpowiednio 62,16 i 65,14 %, przy niewielkim udziale frakcji nasyconej, 7,36 % dla SCO z hodowli z olejem posmażalniczym i 5,63 % dla oleju z hodowli z olejem tłoczonym na zimno. Dodatek serwatki do podłoży zawierających oleje roślinne, skutkował wyższym udziałem frakcji nasyconej w wyekstrahowanych olejach mikrobiologicznych. W SCO z hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym i 20 % dodatkiem serwatki (PFO-0,2), udział SFA wyniósł aż 40,28 %.

Dokonując analizy składu pozyskanych lipidów mikrobiologicznych w kontekście ich potencjalnego wykorzystania jako cennych żywieniowo dodatków do żywności, należy wziąć pod uwagę zawartość kwasów linolowego i linolenowego. Kwas C18:3 z grupy kwasów omega-3 był obecny w każdym z analizowanych olejów mikrobiologicznych, ale największym udziałem C18:3 charakteryzowały się lipidy mikrobiologiczne pozyskane z hodowli z melasą (M1-b – 7,68 % i M2-fb – 6,48 %) oraz olejem rzepakowym tłoczonym na zimno (CPO - 8,24 %). Natomiast najwyższym procentowym udziałem kwasu C18:2 odznaczał się olej z hodowli z melasą, w którym C18:3 stanowił 30,75 % wszystkich kwasów tłuszczowych.

W przypadku oleju mikrobiologicznego z okresowej hodowli z wymianą części podłoża i cyklicznie uzupełnianej posmażalniczym olejem rzepakowym (O1-fb), zmiany w profilu kwasów tłuszczowych analizowano w czasie (Rys. 7). Szczególnie istotne wydają się zmiany udziału wielonienasyconych kwasów: linolowego i linolenowego (C18:3) w ogólnym profilu kwasów tłuszczowych. Można stwierdzić, że ich udział zmniejszał się wraz z czasem hodowli. Najwyższą zawartość kwasu C18:2 odnotowano w drugiej dobie hodowli (18,88 %), podobnie jak kwasu C18:3 (4,20 %). Z uwagi na fakt, iż lipidy komórkowe pełnią m.in. funkcję tłuszczów zapasowych, komórki mogą mobilizować te zasoby na bieżące potrzeby metabolizmu, a profil kwasów tłuszczowych może zmieniać się w czasie, zwłaszcza udział nienasyconych kwasów tłuszczowych, stąd tak ważna jest stała suplementacja hodowli źródłem węgla.



Rys. 7. Zmiany w składzie kwasów tłuszczowych lipidów komórkowych w czasie trwania okresowej hodowli w podłożu O1-fb zasilanej rzepakowym olejem posmażalniczym i z wymianą części podłoża

Lipidy komórkowe odgrywają również istotną rolę w ochronie komórki przed stresem środowiskowym, a płynność błon cytoplazmatycznych jest regulowana poprzez kontrolowanie poziomu steroli oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych. Zmiana składu lipidów to jeden z mechanizmów wypracowanych przez komórki aby przetrwać w warunkach stresowych. Płynność błony komórkowej drożdży wzrasta, gdy zawiera ona nienasycone kwasy tłuszczowe, ponieważ nienasycone wiązania osłabiają oddziaływania hydrofobowe między cząsteczkami [Turanlı-Yıldız i wsp. 2017, Qi i wsp. 2019].

Badania wykazały, że udział kwasów tłuszczowych o bardzo długich łańcuchach węglowych (ang. very long chain fatty acid, VLCFA), o minimum 20 atomach węgla (C20:0, C20:1, C22:1, C24:1) nie został stwierdzony w SCO z hodowli z cukrami. VLCFA zazwyczaj występują w niewielkich ilościach w olejach mikrobiologicznych szczepów typu dzikiego. Biosynteza VLCFA może być związana z wydłużaniem kwasów tłuszczowych o 16 i 18 atomach węgla [Rigouin et al. 2018, Gajdoś 2020]. Część kwasów tłuszczowych może być też bezpośrednio asymilowana z lipidowych substratów, bądź może zostać bezpośrednio skumulowana w ciałkach lipidowym jako produkty pośrednie rozkładu acylo-CoA w β -oksydacji, na skutek tzw. nieuszczelności cyklu [Beopoulos i wsp. 2008].

W badaniu Fabiszewskiej i wsp. [2021], do hodowli szczepu *Y. lipolytica* KKP 379 wykorzystano odpady przemysłu rybnego. W olejach mikrobiologicznych, pozyskanych na drodze hodowli drożdży w podłożach z dodatkiem olejowego odpadu po przemysłowym procesie wędzenia ryb, obecne były VLCFA, takie jak C20:0, C20:1, C22:1, C24:1. Ponadto autorzy stwierdzili udział kwasu eikozapentaenowego (C20:5) i kwasu dokozaheksanowego (C22:6) [Fabiszewska i wsp. 2021]. Kontrolowanie profilu kwasów tłuszczowych oleju mikrobiologicznego poprzez dobór substratów o mniej lub bardziej nasyconych frakcjach lipidowych wydaje się być obiecującym rozwiązaniem, dającym możliwość uzyskania lipidów komórkowych o różnorodnym składzie. Uzyskane profile kwasów tłuszczowych, zwłaszcza dla SCO z hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym o wysokim udziale UFA podkreślają potencjalną wartość żywieniową mikrobiologicznych lipidów z hodowli drożdży w podłożach wykorzystujących odpady.

4.4.2. Analiza zawartości steroli w wyekstrahowanych olejach mikrobiologicznych

We wszystkich analizowanych próbkach lipidów komórkowych zidentyfikowano sześć głównych steroli [P4, P5]: β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol - fitosterole typowe dla olejów roślinnych, ergosterol, dehydroergosterol – drożdżowe metabolity, oraz cholesterol, w niewielkich ilościach [Tabela 9, Tabela 10].

Najniższą całkowitą zawartość steroli - 3,25 mg/g oleju odnotowano dla lipidów mikrobiologicznych z hodowli w podłożu O1-fb, w której źródło węgla stanowił posmażalniczy olej rzepakowy. W SCO pozyskanym na drodze tejże hodowli, dominowały fitosterole, w szczególności β -sitosterol (44,29 %) i kampesterol (25,22 %). Ergosterol (13,86 %) i dehydroergosterol (12,67 %) występowały w mniejszej ilości,

a udział stigmasterolu i cholesterolu stanowił zaledwie 2,96 % i 1,02 % całkowitej sumy steroli w wyekstrahowanym oleju mikrobiologicznym.

W próbce SCO z okresowej hodowli drożdży w podłożu M1-b z melasą, całkowita zawartość steroli wynosiła 8,34 mg/g, podczas gdy w oleju mikrobiologicznym pozyskanym z hodowli w podłożu M2-fb zawartość steroli wyniosła aż 68,40 mg/g, z czego 87,94 % stanowił ergosterol. Ergosterol dominował w ogólnym profilu steroli w obu wariantach hodowli z melasą (M1-b i M2-fb). W hodowli M2-fb, zawartość ergosterolu wynosiła 60,16 mg/g.

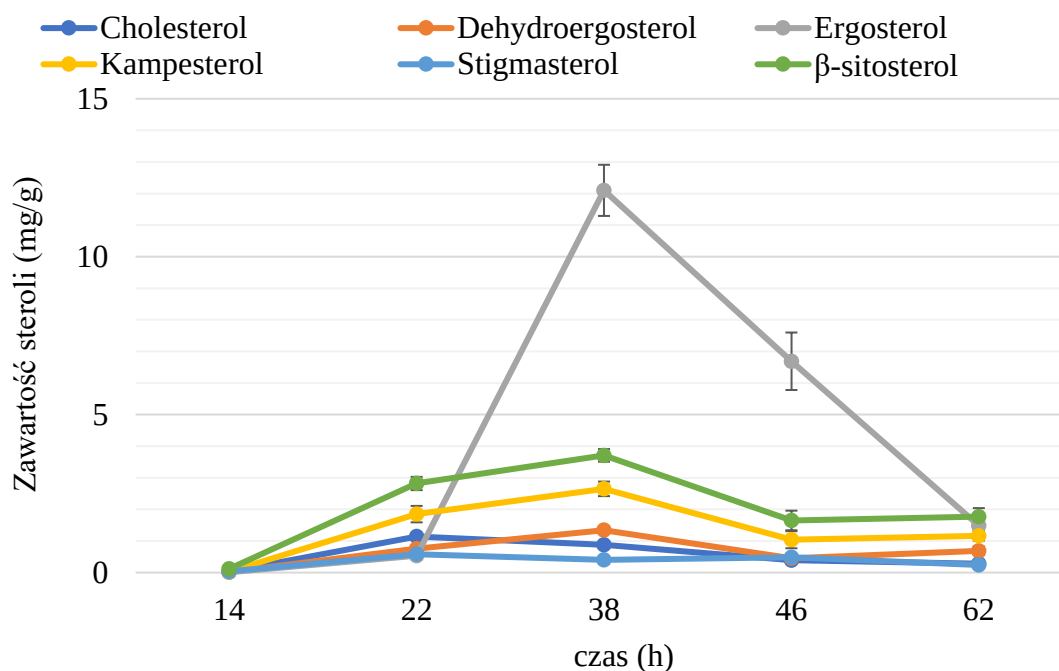
Aby wytłumaczyć tak wysoką zawartość, należy podkreślić rolę wstępnej obróbki wykorzystanego substratu. Hydroliza kwasowa melasy i następujący po niej proces neutralizacji, spowodowały wzrost ciśnienia osmotycznego podłoża wzrostowego. Proces obróbki wstępnej przyczynił się do wysokiego stężenia soli. Podobnie, zastosowany tryb hodowli mógł wpływać na różnice w zawartości steroli między kulturami. Dodatkowo zastosowanie okresowego uzupełniania podłoża hodowlanego hydrolizatem melasy mogło przyczynić się do nagromadzenia soli jako produktów reakcji hydrolizy. W związku z tym, wysokie ciśnienie osmotyczne podłoża hodowlanego mogło okazać się czynnikiem stresującym dla drożdży.

Tabela 9. Zawartość głównych steroli w olejach mikrobiologicznych wyekstrahowanych z biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 z okresowej hodowli (M1-b), hodowli okresowej z dozowaniem źródła węgla (M2-fb) w podłożach z melasą oraz hodowli z wymianą części podłoża z dodatkiem rzepakowego oleju posmażalniczego (O1-fb) * Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$)

	M1		M2		O1	
	%	mg / g	%	mg / g	%	mg / g
Cholesterol	5,34 ± 0,50 ^c	0,45 ± 0,13 ^b	0,32 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,04 ^a	1,02 ± 0,26 ^b	0,04 ± 0,02 ^a
Dehydroergosterol	6,51 ± 0,31 ^b	0,4 ± 0,08 ^a	1,85 ± 0,24 ^a	1,26 ± 0,11 ^b	12,67 ± 1,28	0,42 ± 0,23 ^a
Ergosterol	57,95 ± 2,58 ^b	5,00 ± 1,33 ^a	87,94 ± 0,91	60,16 ± 3,33 ^b	13,86 ± 1,74 ^a	0,40 ± 0,00 ^c
Kampesterol	10,24 ± 0,91 ^b	0,90 ± 0,10 ^a	2,15 ± 0,17 ^a	1,47 ± 0,05 ^b	25,22 ± 3,22 ^c	0,84 ± 0,49 ^a
Stigmasterol	2,67 ± 0,53 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	2,90 ± 0,38 ^a	1,98 ± 0,17 ^b	2,96 ± 0,57 ^a	0,12 ± 0,09 ^a
β-sitosterol	18,25 ± 3,81 ^b	1,50 ± 0,02 ^a	4,86 ± 0,16 ^a	3,32 ± 0,04 ^b	44,29 ± 0,38 ^c	1,44 ± 0,69 ^a
Σ		8,34 ± 1,66		68,40 ± 3,75		3,25 ± 1,55

Tabela 10. Zawartość głównych steroli w olejach mikrobiologicznych wyekstrahowanych z biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 z okresowej hodowli z olejem rzepakowym tłoczonym na zimno (CPO) oraz okresowych hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym i 20% (PFO-0,2) oraz 30% (PFO-0,3) dodatkiem serwatki kwaśnej * Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$)

	CPO-0		CPO-0.3		PFO- 0,2		PFO-0,3	
	%	mg / g	%	mg / g	%	mg / g	%	mg / g
Cholesterol	0,38 ± 0,3 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,05 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	4,88 ± 0,82 ^{ab}	0,28 ± 0,01 ^{ab}	5,61 ± 0,42 ^b	0,39 ± 0,00 ^{ab}
Dehydroergosterol	14,01 ± 5,4 ^a	1,04 ± 0,45 ^{bc}	1,40 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,03 ^{ab}	12,03 ± 1,00 ^a	0,69 ± 0,14 ^{abc}	8,36 ± 0,21 ^a	0,58 ± 0,22 ^{abc}
Ergosterol	49,90 ± 0,76 ^d	3,71 ± 0,25 ^{bc}	54,62 ± 0,09 ^{de}	7,08 ± 1,42 ^c	26,09 ± 0,20 ^b	1,49 ± 0,15 ^{ab}	37,80 ± 0,28 ^c	2,61 ± 0,22 ^{ab}
Kampesterol	13,88 ± 4,04 ^a	1,03 ± 0,25 ^{ab}	40,15 ± 0,14 ^b	5,20 ± 1,04 ^c	20,36 ± 0,10 ^a	1,16 ± 0,15 ^{ab}	18,93 ± 0,82 ^a	1,33 ± 0,05 ^{ab}
Stigmasterol	2,95 ± 0,23 ^a	0,22 ± 0,03 ^{ab}	1,47 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,04 ^{ab}	4,13 ± 0,27 ^a	0,24 ± 0,04 ^{ab}	4,76 ± 2,21 ^a	0,33 ± 0,00 ^{ab}
β-sitosterol	18,89 ± 2,07 ^{ab}	1,40 ± 0,08 ^b	2,17 ± 0,31 ^a	0,28 ± 0,09 ^a	30,97 ± 1,00 ^{bcd}	1,77 ± 0,27 ^b	26,92 ± 1,05 ^{bc}	1,86 ± 0,07 ^{bc}
Σ		7,43 ± 0,38^{bc}		12,96 ± 2,63^c		5,70 ± 0,69^{ab}		6,90 ± 0,54^{bc}



Rys. 8. Zawartość głównych steroli (mg/g) w lipidach komórkowych drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 z hodowli PFO-0,2 z posmażalniczym olejem rzepakowym i 20% dodatkiem serwatki

Omawiane wyniki dotyczą profilu steroli w SCO ekstrahowanych z biomasy pod koniec hodowli. Chcąc sprawdzić, jak profil ten zmienia się w czasie, przeanalizowano zmiany zawartości poszczególnych steroli komórkowych na różnych etapach hodowli PFO-0,2. Wraz z rozpoczęciem procesu hodowli zawartość steroli wzrastała (Rys 7.). Najwyższą ilość steroli, w przeliczeniu na masę wyekstrahowanego oleju mikrobiologicznego, (21,08 mg/g) odnotowano po 38 h (Rys. 8). Dominującym związkiem był ergosterol w ilości 12,10 mg/g. W kolejnych godzinach zawartość tego związku w ekstrahowanym oleju znacząco spadała.

Sterole, podobnie jak kwasy tłuszczowe, pełnią funkcję regulacyjną w globalnej płynności i przepuszczalności błony komórkowej. Komórki są w stanie zwiększyć syntezę steroli i SFA, w odpowiedzi na warunki środowiska wzrostu. Więcej SFA i mniej steroli zwiększa płynność struktury dwuwarstwy fosfolipidowej [Qi i wsp. 2019, Girardi Piva i wsp. 2022]. Dlatego główną rolą ergosterolu, jako grzybowego odpowiednika cholesterolu, jest stabilizacja komórki i ochrona jej przed szkodliwymi czynnikami, takimi jak niedotlenienie, ciśnienie osmotyczne lub obecność toksycznych składników w podłożu [Liu i wsp. 2019, Ta i wsp. 2022]. Zakłócenie integralności komórki wiąże się z modyfikacją składu błony, a także zaburzeniami metabolicznymi, co utrudnia wzrost biomasy i zmniejsza przeżywalność komórek [Sandoval i Papoutsakis 2016, Qian i wsp.

2020]. Jak wiadomo, acetylo-CoA jest niezbędną jednostką dla metabolizmu komórkowego, biosyntezy lipidów komórkowych, w tym ergosterolu. Dlatego redukcja zawartości steroli między 38 a 62 h w hodowli PFO-0,2, przy jednoczesnej wydajnej kumulacji lipidów komórkowych, może być wyjaśniona konkurencyjnością lipogenezy i szlaku biosyntezy ergosterolu, który rozpoczyna się od kondensacji dwóch cząsteczek acetylo-CoA. Warto dodać, że dla nadprodukcji ergosterolu przez drożdże, dostęp do tlenu jest również parametrem krytycznym [Liu 2019, Qian et al. 2020].

Zawartość steroli w konwencjonalnych olejach roślinnych zależy od wielu czynników. Na przykład, Kraljić i wsp. [2013] udowodnili, że kondycjonowanie rzepaku w wysokiej temperaturze zwiększyło zawartość steroli o 16%, w porównaniu z olejami tłoczonymi na zimno. Zawartość steroli we wszystkich analizowanych olejach rzepakowych mieściła się w zakresie 5,9-8,2 mg/g. Podobnie w badaniach Rękas i wsp. [2017] analizowane próbki oleju rzepakowego zawierały 5,7-6,6 mg/g steroli ogółem. Opierając się na przytoczonych doniesieniach literaturowych opisujących skład olejów roślinnych, należy podkreślić potencjał SCO jako źródła związków bioaktywnych, takich jak sterole, których zawartość była podobna lub wyższa przy zintensyfikowanej biosyntezie ergosterolu drożdży, w porównaniu do olejów konwencjonalnych.

Ergosterol, jako prowitamina D, był szeroko badany pod kątem pozytywnego wpływu na organizm ludzki. Podstawą teorii dotyczącej prozdrowotnego działania ergosterolu było ogromne znaczenie witaminy D dla funkcjonowania całego organizmu, w tym zdrowia kości czy prawidłowego funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego i odpornościowego, ale także płodności [Cito et al. 2020, Jiang et al. 2020]. Badania *in vitro* wykazały selektywną cytotoksyczność połączenia ergosterolu i lipofilowych kationów trifenylofosfoniowych (TPP⁺) między zdrowymi komórkami śródbłonna żołądka (GES) i komórkami nowotworowymi, a także hamujący wpływ na komórki raka piersi (MCF-7) i wątroby (HepG2) [Ren i wsp. 2023]. Ponadto niezwykle interesujące wydają się badania Tiwari i in. [2022] podkreślające obiecującą rolę bioaktywnych składników, w tym ergosterolu, jako nutraceutyków o działaniu przeciwwirusowym względem COVID-19. Dlatego też SCO o wysokiej zawartości ergosterolu może stanowić naturalną formułę o prozdrowotnym potencjale.

Uzyskane rezultaty hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających melasę, posmażalniczy olej rzepakowy oraz serwatkę, w tym parametry charakteryzujące wzrost biomasy oraz wydajność biosyntezy lipidów wewnątrzkomórkowych, a także analiza jakościowa oraz ilościowa składu olejów mikrobiologicznych potwierdziły

hipotezę [H3]. Drożdże efektywnie utylizowały zastosowane substraty, produkując przy tym znaczne ilości oleju mikrobiologicznego, bogatego zarówno w nienasycone kwasy tłuszczowe, jak i sterole. Potwierdza to możliwość wykorzystania wybranych odpadów przemysłu rolno-spożywczego jako substratów w hodowli drożdży olejogennych mającej na celu pozyskanie mikrobiologicznych lipidów o korzystnym składzie.

4.4.3. Analiza składu pierwiastkowego biomasy drożdży *Y. lipolytica* pod kątem zawartości metali ciężkich - kadmu, ołowiu i rtęci

Weryfikacja hipotezy [H4]: Oleje mikrobiologiczne pozyskane podczas hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających substraty odpadowe nie zawierają metali ciężkich ani wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ilościach przekraczających limity nałożone odpowiednimi rozporządzeniami.

Biomasa drożdży *Y. lipolytica* uważana jest za źródło wielu składników odżywczych, co stanowi o potencjale jej wykorzystania jako składnika wzbogacającego dietę człowieka, zwłaszcza wegetarian, wegan czy sportowców [Jach i Malm 2022]. W celu oceny wpływ wykorzystania produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego w hodowli drożdży olejogennych na jakość biomasy i ekstrahowanego z niej oleju mikrobiologicznego, analizie poddano skład pierwiastkowy uprzednio wysuszonej biomasy drożdży (Tabela 11).

Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr. 2019/760, zgodnie z Rozp. (UE) 2015/2283, zezwala na wprowadzenie na rynek wysuszonej i termicznie inaktywowanej biomasy drożdży *Y. lipolytica* jako nowej żywności do stosowania w suplementach żywnościowych zdefiniowanych w dyrektywie 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, z wyłączeniem suplementów żywnościowych dla niemowląt i małych dzieci. Jednak dopiero rozporządzenie nr. 2020/1822 z dnia 2 grudnia 2020 r., zezwalające na wprowadzenie na rynek zawierającej chrom biomasy drożdży *Y. lipolytica* jako nowej żywności, uregulowało kwestię zawartości metali ciężkich (kadmu, rtęci i ołowiu) w biomasie.

Tabela 11. Skład pierwiastkowy suchej biomasy *Y. lipolytica* z hodowli w podłożach z melasą (M1-b, M2-fb), hodowli z dodatkiem rzepakowego oleju posmażalniczego (O1-fb), olejem rzepakowym tłoczonym na zimno (CPO-0), a także hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym i 20% PFO-0,2) oraz 30% (PFO-0,3) dodatkiem serwatki kwaśnej * Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$)

Pierwiastek			CPO-0	CPO-0,3	PFO-0,2	PFO-0,3	M1-b	M2-fb	O1-fb
C	węgiel	g/kg	393,60 ± 1,00 ^a	544,25 ± 11,45 ^c	553,38 ± 0,64 ^c	542,50 ± 2,80 ^c	447,87 ± 6,80 ^b	376,26 ± 0,99 ^a	601,12 ± 2,45 ^d
N	azot		46,26 ± 0,10 ^b	22,72 ± 0,00 ^a	12,16 ± 10,71 ^a	23,41 ± 0,35 ^a	65,56 ± 0,42 ^c	43,21 ± 0,42 ^b	20,78 ± 0,22 ^a
K	potas		47,22 ± 0,01 ^f	11,48 ± 0,22 ^a	27,31 ± 0,18 ^e	20,25 ± 0,28 ^c	25,63 ± 0,50 ^d	47,54 ± 0,38 ^f	16,48 ± 0,19 ^b
Na	sód		18,05 ± 0,14 ^b	71,62 ± 1,44 ^c	1,12 ± 0,03 ^a	0,40 ± 0,01 ^a	18,47 ± 0,47 ^b	16,89 ± 0,14 ^b	0,46 ± 0,09 ^a
P	fosfor		12,51 ± 0,10 ^b	14,46 ± 0,31 ^c	16,47 ± 0,47 ^d	17,16 ± 0,10 ^d	9,84 ± 0,07 ^a	11,96 ± 0,15 ^b	10,05 ± 0,20 ^a
S	siarka		8,18 ± 0,58 ^b	2,12 ± 0,05 ^a	2,91 ± 0,01 ^a	3,04 ± 0,03 ^a	13,61 ± 0,02 ^c	8,76 ± 0,05 ^b	2,04 ± 0,48 ^a
Ca	wapń		3,61 ± 0,26 ^e	0,25 ± 0,10 ^{ab}	2,37 ± 0,03 ^d	0,79 ± 0,05 ^{bc}	0,87 ± 0,05 ^c	2,13 ± 0,10 ^d	0,08 ± 0,00 ^a
Mg	magnez		0,63 ± 0,00 ^a	1,91 ± 0,01 ^d	6,08 ± 0,04 ^d	3,95 ± 0,06 ^c	0,69 ± 0,01 ^{ab}	0,65 ± 0,00 ^b	0,84 ± 0,02 ^b
Fe	żelazo		0,14 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,04 ^b	0,56 ± 0,03 ^{cd}	0,65 ± 0,01 ^d	0,46 ± 0,00 ^{bc}	0,20 ± 0,01 ^a	0,59 ± 0,02 ^d
Mn	mangan		0,17 ± 0,00 ^d	0,11 ± 0,00 ^b	0,30 ± 0,00 ^g	0,23 ± 0,00 ^f	0,14 ± 1,12 ^c	0,20 ± 0,08 ^e	0,05 ± 0,00 ^a
Zn	cynk		0,15 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,00 ^{de}	0,20 ± 0,00 ^{ef}	0,17 ± 0,00 ^{cd}	0,21 ± 0,02 ^f	0,09 ± 0,00 ^a
Al	glin	mg/kg	26,75 ± 3,35 ^a	43,75 ± 39,65 ^a	59,66 ± 17,49 ^a	62,20 ± 21,20 ^a	19,25 ± 4,03 ^a	7,98 ± 1,23 ^a	55,47 ± 20,02 ^a
Ti	tytan		1,80 ± 0,43 ^a	4,09 ± 2,31 ^{ab}	8,12 ± 0,13 ^b	2,04 ± 0,02 ^a	3,41 ± 0,74 ^{ab}	1,09 ± 0,02 ^a	2,03 ± 0,02 ^a
Cr	chrom		6,37 ± 0,02 ^b	2,67 ± 0,52 ^a	2,56 ± 0,10 ^a	2,29 ± 0,24 ^a	10,71 ± 0,27 ^c	3,12 ± 0,25 ^a	2,29 ± 0,10 ^a
Cu	miedź		1,62 ± 0,08 ^{ab}	0,94 ± 0,08 ^a	5,96 ± 0,15 ^c	2,84 ± 0,57 ^b	6,90 ± 0,02 ^c	5,77 ± 0,20 ^c	0,79 ± 0,10 ^a
Ni	nikiel		9,39 ± 0,30 ^c	5,14 ± 1,36 ^b	4,77 ± 0,02 ^{ab}	1,08 ± 0,82 ^a	15,08 ± 0,78 ^d	2,54 ± 0,22 ^{ab}	1,08 ± 0,10 ^a
Pb	olów		0,95 ± 0,31 ^a	0,88 ± 0,34 ^a	1,63 ± 0,05 ^a	0,90 ± 0,27 ^a	1,13 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,01 ^a	1,20 ± 0,06 ^a
V	wanad		1,01 ± 0,01 ^d	0,23 ± 0,14 ^{ab}	0,51 ± 0,01 ^{bc}	0,03 ± 0,02 ^a	0,62 ± 0,04 ^c	0,53 ± 0,05 ^c	0,14 ± 0,01 ^a
Zr	cyrkon		1,94 ± 0,01 ^c	0,69 ± 0,17 ^a	2,17 ± 0,08 ^c	0,44 ± 0,05 ^a	3,94 ± 0,08 ^d	1,27 ± 0,09 ^b	1,30 ± 0,02 ^b
Co	kobalt		0,41 ± 0,01 ^b	0,15 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	2,43 ± 0,06 ^d	2,23 ± 0,02 ^c	0,01 ± 0,00 ^a
Sr	stront		12,18 ± 0,33 ^d	0,61 ± 0,16 ^a	5,43 ± 0,43 ^c	0,93 ± 0,08 ^a	2,77 ± 0,13 ^b	6,46 ± 0,23 ^c	0,40 ± 0,10 ^a
Ba	bar		1,19 ± 0,06 ^b	0,89 ± 0,27 ^{ab}	2,27 ± 0,01 ^c	0,45 ± 0,01 ^{ab}	0,54 ± 0,04 ^{ab}	0,77 ± 0,05 ^{ab}	0,34 ± 0,02 ^a
Li	lit		0,39 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^a

W składzie biomasy olejogennych drożdży *Y. lipolytica* hodowanych w podłożach odpadowych dominowały następujące pierwiastki: węgiel, azot, potas, sód, fosfor i siarka (Tabela 11). W próbkach biomasy nie odnotowano wspomnianych metali ciężkich w ilościach przekraczających limity określone rozporządzeniem nr 2020/1822 zezwalającym na wprowadzenie na rynek biomasy drożdży *Y. lipolytica* zawierającej chrom jako nowej żywności. W analizowanych próbkach biomasy drożdży nie zidentyfikowano kadmu ani rtęci. Każda z próbek zawierała ołów w ilości zawartej w zakresie 0,88-1,63 mg/kg, podczas gdy w rozporządzeniu nr 2020/1822 uznana za bezpieczną zawartość tego pierwiastka wynosi 3,0 mg/kg. Po publikacji artykułów [P4] i [P5], z dniem 29 lipca 2024 r. weszło w życie rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 2024/2044, zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/2470 w odniesieniu do warunków stosowania nowej żywności - biomasy drożdży *Y. lipolytica*. W specyfikacji biomasy dodano górne limity dotyczące zanieczyszczenia ołowiem, rtęcią, kadmem i arsenem, które dla każdego z tych pierwiastków wynoszą 0,1 mg/kg. Rozporządzenie dotyczy jednak biomasy drożdży *Y. lipolytica*, w składzie której zawartość tłuszczu mieści się w zakresie 7–10 g/100 g. W związku z powyższym, można stwierdzić, że wciąż brakuje odpowiednich regulacji w odniesieniu do zastosowania biomasy zawierającej wyższe stężenie lipidów.

Omawiany gatunek jest nie tylko źródłem cennych UFA, białka, steroli, ale także witamin z grupy B i składników mineralnych. Korzystną cechą biomasy *Y. lipolytica* jest niskie stężenie sodu [Jach i Malm 2022]. Biomasa uzyskana z hodowli w podłożu PFO-0,2 (1,12 g/kg) i PFO-0,3 (0,40 g/kg) miała znacznie niższą zawartość sodu, w porównaniu z tą uzyskaną w podłożach CPO-0 i CPO-0.3, ale także z wynikami przedstawionymi przez Czech i wsp. [2016], w których zawartość sodu wahała się w zakresie 12,81-19,38 g/kg. Co istotne, na skutek zastosowanego trybu hodowli i cyklicznego uzupełniania podłoża M2-fb hydrolizatem melasy, biomasa zawierała znacznie więcej sodu (16,89 g/kg), niż wariant okresowej hodowli M1-b z melasą, bez dokarmiania (0,46 g/kg). Próbki biomasy z hodowli z kwaśną serwatką zawierały więcej fosforu (16,47-17,16 g/kg) w porównaniu do pozostałych, analizowanych wariantów. Najwyższą ilość sodu stwierdzono w biomase z hodowli z olejem rzepakowym tłoczonym na zimno i 30 % dodatkiem serwatki (71,62 g/kg). Biomasa z hodowli w podłożach z melasą zawierała więcej Cr, N, S i Cu. Była jednak mniej zasobna w składniki mineralne, takie jak P, Ca, Mg, Fe i Al, w porównaniu z biomasą z podłoża z serwatką kwaśną, co podkreśla niewykorzystany potencjał produktu

ubocznego przemysłu mleczarskiego. Czech i wsp. [2016] analizowali efekty karmienia prosiąt biomasą drożdży *Y. lipolytica* hodowanych w podłożach z glicerolem pochodzącym z produkcji biopaliwa. Biomasa szczepu KKP 379 zawierała więcej P, Mg, Zn, Fe, Mn niż biomasa wyprodukowana z glicerolu odpadowego [Merska i wsp. 2015, Czech i wsp. 2016]. Skład podłoża PFO-0,2 skutkował próbkami biomasy o najwyższej zawartości Mg (6,08 g/kg), Cu (5,96 mg/kg) i Ba (2,27 mg/kg). Biomasa drożdży hodowanych w podłożu z serwatką i CPO lub PFO zawierała więcej K, P, Mg, Zn i Fe w porównaniu do biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystywanych w badaniu Czech i wsp.[2016], która zawierała: K - 1,34 g/ kg, P - 10,02 g/kg, Mg - 1,48 g/kg, Zn - 30,93 mg/kg i Fe - 101,07 mg/kg. Czech i wsp. [2016] wykazali, że drożdże *Y. lipolytica* produkowane z odpadowego glicerolu są dobrym źródłem minerałów, w tym Ca (3,04 - 5,48 g/kg), Zn (57,97 - 82,57 mg/kg), Na (12,81 - 19,38 g/kg), Mn (12,03 - 18,21 mg/kg), S (3,53 - 6,21 g/kg), K (19,10-25,14 g/kg) i Mg (1,82 - 2,04 g/kg), a także cennych aminokwasów (tyrozyny, tryptofanu, leucyny, lizyny, waliny czy glicyny).

4.4.4. Analiza zawartości wielopierścienowych węglowodorów aromatycznych oraz pozostałości rozpuszczalników organicznych w SCO pozyskanym na drodze hodowli drożdży *Y. lipolytica* z wybranymi odpadami

Porównując profil kwasów tłuszczowych lipidów mikrobiologicznych pozyskanych z olejogennych drożdży *Y. lipolulica* do olejów roślinnych, SCO uważane są za dobre substytuty olejów roślinnych. Jednak, ze względu na charakter wykorzystanych substratów odpadowych, konieczna jest analiza związków mogących stanowić zagrożenie dla zdrowia potencjalnych konsumentów. Analiza zawartości WWA wykazała (Tabela 12), że SCO otrzymane na drodze hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach z melasą oraz posmażalniczym olejem rzepakowym spełniały wymagania stawiane olejom i tłuszczom wprowadzanym do obrotu dla konsumentów końcowych lub stosowanych jako składniki żywności w zakresie najwyższych dopuszczalnych poziomów zanieczyszczeń procesowych, takich jak benzo[a]piren oraz suma benzo[a]pirenu - B[a]P, benzo[a]antracenu - B[a]A, benzo[b]fluorantenu - B[b]F chryzenu - Chry, zawarte w Rozporządzeniu Komisji Europejskiej (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 roku.

Tabela 12. Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) ($\mu\text{g/kg}$) w olejach mikrobiologicznych ekstrahowanych z biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 hodowanych w podłożach z melasą, olejem rzepakowym tłoczonym na zimno i olejem rzepakowym po smażeniu

* Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$).

	WWA ($\mu\text{g/kg}$)	źródło węgla w podłożu hodowlanym		
		melasa	rzepakowy olej tłoczony na zimno	posmażalniczy olej rzepakowy
Naf	naftalen	$81,98 \pm 1,98^c$	$9,13 \pm 1,08^a$	$20,62 \pm 2,38$
Acy	acenaftylen	$8,24 \pm 0,64^b$	$0,68 \pm 0,07^a$	$1,47 \pm 0,16^a$
Ace	acenaften	$12,59 \pm 1,04^b$	$1,80 \pm 0,17^a$	$3,49 \pm 0,43^a$
Fluo	flluoren	$32,02 \pm 2,02^b$	$3,14 \pm 0,34^a$	$4,56 \pm 0,21^a$
Phe	fenantren	$34,68 \pm 2,68^b$	$7,54 \pm 0,51^a$	$12,04 \pm 1,30^a$
Ant	antracen	$2,07 \pm 0,07^b$	$0,64 \pm 0,09^a$	$0,60 \pm 0,04^a$
Car	karbazol	$1,86 \pm 0,06^b$	$0,17 \pm 0,02^a$	$1,31 \pm 0,18^b$
Flua	fluoranten	$7,47 \pm 0,37^c$	$1,55 \pm 0,17^a$	$3,13 \pm 0,11^b$
Pyr	piren	$29,94 \pm 1,44^c$	$3,30 \pm 0,31^a$	$7,98 \pm 0,44^b$
B[a]A	benzo[a]antracen	$1,71 \pm 0,11^b$	$0,52 \pm 0,05^a$	$1,28 \pm 0,09^b$
Chry	chryzen	$5,26 \pm 0,46^b$	$0,84 \pm 0,06^a$	$1,77 \pm 0,24^a$
B[b]F	benzo[b]fluoranten	$0,99 \pm 0,09^b$	$0,30 \pm 0,02^a$	$0,46 \pm 0,04^a$
B[k]F	benzo[k]fluoranten	$2,62 \pm 0,12^b$	$0,69 \pm 0,09^a$	$1,16 \pm 0,14^a$
B[j]F	benzo[j]fluoranten	$1,55 \pm 0,05^b$	$0,46 \pm 0,05^a$	$0,94 \pm 0,08^c$
B[a]P	benzo[a]piren	$0,92 \pm 0,12^b$	$0,38 \pm 0,06^a$	$0,61 \pm 0,06^{ab}$
IndP	indeno[1,2,3-cd]piren	$0,63 \pm 0,14^a$	$0,35 \pm 0,04^a$	$0,51 \pm 0,04^a$
DB[ah]A	dibenz[a,h]antracen	$0,52 \pm 0,02^b$	$0,07 \pm 0,01^a$	$0,49 \pm 0,05^b$
DB[ghi]P	benzo[g,h,i]perylen	$1,53 \pm 0,33^a$	$0,93 \pm 0,03^a$	$0,66 \pm 0,05^a$
Σ		$226,60 \pm 11,74^b$	$32,48 \pm 3,19^a$	$63,07 \pm 6,02^a$

Maksymalny poziom B[a]A określony w rozporządzeniu wynosi $2 \mu\text{g/kg}$. Zawartość B[a]A w analizowanych SCO mieściła się w zakresie $0,52$ - $1,71 \mu\text{g/kg}$, przy czym SCO z hodowli z olejem tłoczonym na zimno zawierał najmniejszą ilość tego związku. Podobnie, wytyczne dotyczące zawartości czterech wskazanych rozporządzeniem WWA: B[a]P, Chry, B[b]F i B[a]A, których zawartość nie powinna przekraczać $10 \mu\text{g/kg}$ oleju, również zostały spełnione (Tabela 13). Suma tych czterech związków, dla SCO z hodowli w podłożu melasowym, wynosiła $8,95 \mu\text{g/kg}$, a dla hodowli z hydrofobowym

źródłem węgla zawartość związków była niższa i wynosiła odpowiednio 2,04 µg/kg i 4,12 µg/kg dla SCO uzyskanych z drożdży hodowanych na podłożu z olejem tłoczonym na zimno i olejem posmażalniczym. Najwyższą całkowitą zawartość WWA odnotowano w oleju mikrobiologicznym z hodowli z melasą - 226,60 µg/kg, co jest kilkukrotnie wyższą wartością w porównaniu do wyników uzyskanych dla olejów mikrobiologicznych z hodowli w podłożach z rzepakowym olejem tłoczonym na zimno (32,48 µg/kg) i posmażalniczym olejem rzepakowym (63,07 µg/kg).

Tabela 13. Ocena jakości olejów mikrobiologicznych ekstrahowanych z biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 hodowanych w podłożach z melasą, olejem rzepakowym tłoczonym na zimno lub olejem rzepakowym posmażalniczym w zakresie kryteriów Unii Europejskiej dla olejów i tłuszczów wprowadzanych do obrotu

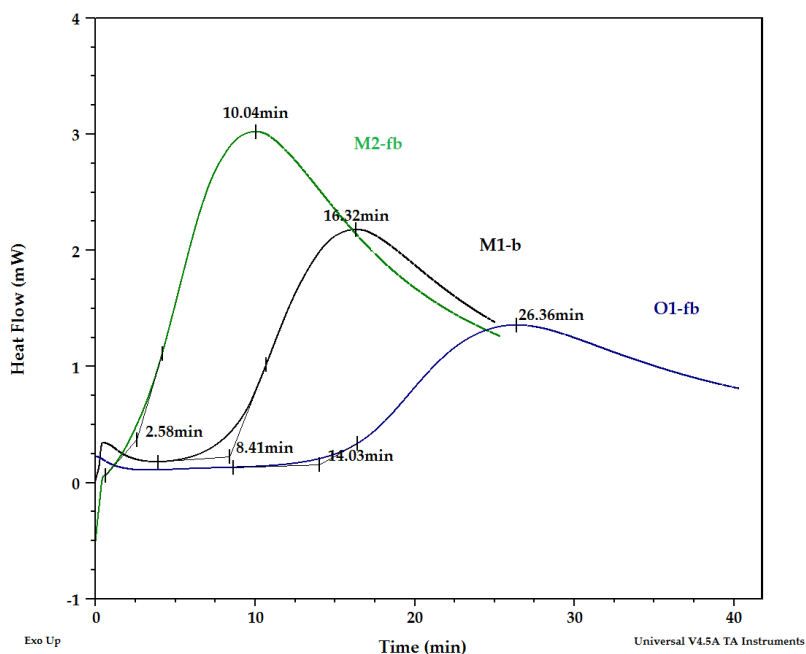
	maksymalny poziom/limit pozostałości	źródło węgla w hodowli			źródło
		melasa	rzepakowy olej tłoczony na zimno	posmażalniczy olej rzepakowy	
B[a]P	2,0 µg/kg	0,92 µg/kg	0,38 µg/kg	0,61 µg/kg	[A]
B[a]P + Chry + B[b]F + B[a]A	10,0 µg/kg	8,95 µg/kg	2,04 µg/kg	4,12 µg/kg	[A]
heksan	1,0 mg/kg	-	0,00139 mg/kg	0,0007 mg/kg	[B]
[A] Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 [B] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/32/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych państw członkowskich dotyczących rozpuszczalników do ekstrakcji stosowanych w produkcji środków spożywczych i składników żywności					

Szereg przeprowadzonych doświadczeń i analiz pozwolił pozytywnie zweryfikować hipotezę **[H4]**. Oleje mikrobiologiczne, pozyskane podczas hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach z melasą oraz posmażalniczym olejem rzepakowym, nie zawierały metali ciężkich ani wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ilościach przekraczających limity nałożone odpowiednimi rozporządzeniami. Dodatkowo, rozpatrując możliwość wykorzystania SCO jako potencjalnego dodatku do żywności, przeanalizowano zawartości pozostałości heksanu stosowanego jako rozpuszczalnik w procesie ekstrakcji oleju mikrobiologicznego z biomasy drożdży. Zgodnie z wymogami Unii Europejskiej, dopuszczalna zawartość heksanu stosowanego w produkcji tłuszczów i olejów, nie powinna przekraczać 1 mg/kg tłuszczu lub oleju

[Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/32/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r.]. Dla SCO z hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym oraz olejem tłoczonym na zimno, wynosiła odpowiednio 0,0007 mg/kg i 0,00139 mg/kg, spełniając tym samym wymagania dotyczące maksymalnych limitów pozostałości heksanu w ekstrahowanych tłuszczach i olejach (Tabela 13).

4.4.5. Ocena stabilności oksydacyjnej wyekstrahowanych olejów mikrobiologicznych

Oceny stabilności oksydacyjnej wybranych olejów mikrobiologicznych, pozyskanych na drodze hodowli z melasą, posmażalniczym olejem rzepakowym i rzepakowym olejem tłoczonym na zimno, przeprowadzono metodą ciśnieniowej różnicowej kalorymetrii skaningowej (ang. pressure differential scanning calorimetry – PDSC) w temperaturze 120°C w warunkach izotermicznych. Metoda umożliwia pomiar czasu potrzebnego do uzyskania temperatury rozpoczęcia utleniania analizowanej próbki tłuszczu (T_{on}), oraz maksymalny czas utlenienia próbki (T_{max}). Oba parametry odpowiadają różnym etapom utleniania, a wyższe wartości T_{max} są skorelowane z wyższą stabilnością oksydacyjną analizowanych olejów. Krzywe PDSC dla lipidów komórkowych z hodowli w podłożach M1-b, M2-fb i O1-fb przedstawiono na rys. 9.



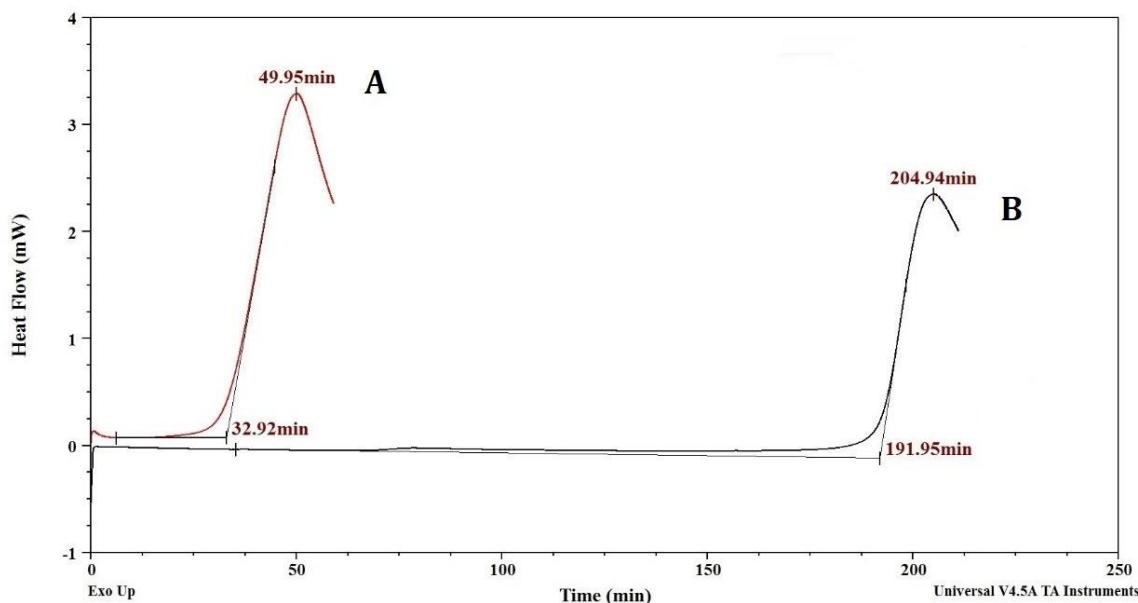
Rys. 9. Krzywe PDSC – graficzne przedstawienie czasu indukcji utleniania T_{on} i T_{max} próbek SCO z hodowli w podłożach M1-b, M2-fb i O1-fb. [P4]

Olej mikrobiologiczny z okresowej hodowli zasilanej melasą (M2-fb) był najbardziej podatny na utlenienie w zastosowanych warunkach. Proces utleniania rozpoczął się już w 2,58 minucie pomiarów, a maksimum zostało osiągnięte w 10,04 min. Nieco lepsze rezultaty uzyskano dla oleju z hodowli w podłożu M1-b. Największą stabilność, spośród trzech analizowanych olejów opisanych w pracy **[P4]** zaobserwowano dla SCO z hodowli w podłożu cyklicznie uzupełnianym posmażalniczym olejem rzepakowym (O1-fb), gdzie $T_{\max} = 26,36$ min.

Oleje o wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, do których zaliczyć można oleje mikrobiologiczne, uważa się za szczególnie podatne na utlenianie. Stabilność oksydacyjna jest jednym z najważniejszych parametrów oceny jakości olejów. Utlenianie kwasów tłuszczowych pod wpływem obróbki cieplnej, zastosowanych warunków ekstrakcji lub podczas ich przechowywania skutkuje pogorszeniem jakości analizowanych tłuszczów [Symoniuk i wsp. 2017].

Ekstrahowane oleje były mniej stabilne w porównaniu z np. konwencjonalnym olejem rzepakowym, dla którego $T_{\max}$ mierzony w temperaturze 120°C mieścił się w zakresie 66,61 - 74,78 min [Raczyk i wsp. 2016]. W przeprowadzonym badaniu parametr $T_{\max}$ wahał się od 10,04 - 26,36 min dla analizowanych próbek. Podobną stabilność oksydacyjną zaobserwowano dla oleju lnianego ($T_{\max} = 21,20 - 24,72$ min), szczególnie bogatego w kwas linolenowy, oleinowy i linolowy [Ciemniewska-Żytkiewicz i wsp. 2014]. W pracy **[P6]** opisano także wyniki analizy PDSC dla SCO wyekstrahowanego z biomasy hodowanej z olejem rzepakowym tłoczonym na zimno, dla którego $T_{\max}$ wyniósł 49,95 min (Rys. 10A). Analizując dostępną literaturę, stwierdzono, że podczas analiz stabilności oksydacyjnej oleju słonecznikowego w temperaturze 120°C, maksymalny czas indukcji wyniósł 33,4 min [Kowalski et al. 2004]. Wyniki badań Ciemniewskiej-Żytkiewicz i wsp. [2014] dla oleju rzepakowego (82,41 - 98,4 min), oliwy z oliwek (134,15 - 134,47 min) i oleju z orzechów laskowych (119,95 - 191,06 min), w tych samych warunkach analizy, były wyższe, ale nadal niższe niż wartość maksymalnego czasu indukcji utleniania dla SCO z okresowej hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym olejem (Rys. 10B), dla którego zaobserwowano najwyższy $T_{\max}$ (204,94 min), a także najwyższą stabilność oksydacyjną. Szybkość utleniania zależy od kilku czynników, w tym od składu kwasów tłuszczowych, obecności prooksydantów, przeciwutleniaczy lub dostępu światła i tlenu podczas przechowywania. W eksperymencie opisanym w pracy **[P6]**, oleje miały podobny udział nienasyconych kwasów tłuszczowych – około 92 % wszystkich kwasów tłuszczowych,

ale olej z hodowli w podłożu z rzepakowym olejem tłoczonym na zimno zawierał dwa razy więcej steroli (7,16 mg/g). Planując kolejne eksperymenty, mające na celu pozyskanie olejów mikrobiologicznych o wysokiej jakości, należy podkreślić potrzebę zidentyfikowania związków, które mogą warunkować stabilność oksydacyjną SCO.



Rys. 10. Krzywe PDSC – graficzne przedstawienie czasu indukcji utleniania T_{on} i T_{max} olejów mikrobiologicznych z hodowli z olejem rzepakowym tłoczonym na zimno **(A)** i olejem rzepakowym po smażeniu **(B)**.

T_{on} – czas rozpoczęcia utleniania w danych warunkach temperaturowych;

T_{max} – maksymalny czas utlenienia próbki

4.5. Wykorzystanie biomasy drożdży olejogennych, jak i wyekstrahowanego z niej oleju mikrobiologicznego w roli dodatku do produktu spożywczego

Weryfikacja hipotezy **[H5]**: Olej mikrobiologiczny pozyskany w hodowli drożdży olejogennych w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego może znaleźć zastosowanie jako dodatek do żywności.

Pierwszym krokiem pozwalającym na realne wykorzystanie biomasy drożdży *Y. lipolytica* jako żywności/dodatku do żywności, było zatwierdzenie przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) możliwości stosowania biomasy hodowanej w podłożach zawierające odpady przemysłowe (np. odpady biopaliwowe) jako nowej żywności w suplementach diety dla populacji ogólnej w wieku powyżej 3 lat. Proponowany maksymalny dzienny poziom spożycia wynosi 3 g/dzień dla dzieci w wieku od 3 do 9 lat i 6 g/dzień dla kategorii wiekowej 10 lat i więcej [Jach i Malm

2022]. Dodatkowo, rozporządzenie nr 2024/2044 określa warunki stosowania wysuszonej i dezaktywowanej termicznie biomasy drożdży *Y. lipolytica* w m.in. zamiennikach posiłków do kontroli masy ciała dla dorosłych, żywności specjalnego przeznaczenia medycznego, produktach mlecznych, serach i produktach serowych, produktach do smarowania na bazie orzechów, produktach zbożowych, chlebie, kawie, zupach i wielu innych.

Na podstawie wyników kolejno przeprowadzonych doświadczeń, dokonano wyboru formy, w jakiej olej mikrobiologiczny pozyskany z drożdży *Y. lipolytica*, mógłby zostać wykorzystany jako dodatek do wybranego produktu spożywczego. Biorą pod uwagę najwyższy udział nienasyconych kwasów tłuszczowych, wysoką czystość pod kątem pozostałości rozpuszczalników, spełnione wymogi prawne dotyczące pozostałości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, zdecydowano, aby wykorzystać olej mikrobiologiczny pozyskany z okresowej hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym (PFO). Został on dodany do roślinnego analogu sera dojrzewającego typu Camembert. Dodatkowo, podążając za bieżącymi trendami i regulacjami prawnymi dotyczącymi wykorzystania biomasy drożdży *Y. lipolytica* jako nowej żywności, rozpatrzono również możliwość wykorzystania nie tylko wyekstrahowanego z komórek oleju mikrobiologicznego, ale całej, wysuszonej i dezaktywowanej termicznie, wytypowanej biomasy zasobnej w olej mikrobiologiczny.

Roślinne analogi sera camembert przygotowano w 3 wariantach: z biomasą drożdży olejogennych, olejem mikrobiologicznym oraz bezdrożdżowych dodatków (kontrola). Dodatek oleju mikrobiologicznego, jak i biomasy nie wpłynął znacząco na wygląd analogów roślinnych. Mimo to, można zauważyć, że produkt z dodatkiem biomasy charakteryzował się nieco bardziej zwartą strukturą (Rys. 11).

	Kontrola (wariant bez dodatków)	Produkt z dodatkiem oleju mikrobiologicznego	Produkt z dodatkiem biomasy drożdży
Dzień 2			
Dzień 4			
Dzień 7			
Dzień 14			

Rys. 11. Roślinne analogi sera typu Camembert z orzechów nerkowca w 3 wariantach: bez dodatków, z olejem mikrobiologicznym lub z dodatkiem biomasy drożdży po 2, 4, 7 i 14 dniach dojrzewania * Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$).

Zarówno w przypadku wariantu kontrolnego, jak i wariantów z dodatkami, obserwowano niezakłócony rozwój mikroflory z kultur starterowych (Tabela 14). Po 14 dniach dojrzewania zawartość białka (11,13 g/100 g), włókna (4,56 g/100 g) i suchej masy produktu (39,18 g/100 g) były najwyższe w analogu z dodatkiem biomasy drożdży. Należy zauważyć, że analog wzbogacony w SCO charakteryzował się najwyższą zawartością tłuszczu (14,36 g/100 g). Zawartość węglowodanów (1,11 - 1,40 g/100 g) była na podobnym poziomie we wszystkich produktach.

Tabela 14. Charakterystyka wybranych parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych roślinnych analogów sera typu Camembert z orzechów nerkowca w 3 wariantach: bez dodatków, z olejem mikrobiologicznym lub z dodatkiem biomasy drożdży, po 14 dniach dojrzewania *Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice między próbkami ($p < 0,05$)

g/100g produktu	Kontrola	Produkt z dodatkiem SCO	Produkt z dodatkiem biomasy
	Dzień 14	Dzień 14	Dzień 14
Analiza fizykochemiczna			
Sucha masa	35,89 ± 0,51 ^a	34,90 ± 0,49 ^a	39,18 ± 0,44 ^b
Tłuszcz	14,00 ± 1,07 ^a	14,36 ± 0,39 ^b	13,28 ± 0,39 ^a
Mono- i disacharydy	1,40 ± 0,00 ^b	1,36 ± 0,00 ^b	1,11 ± 0,00 ^a
Cukry redukujące	0,54 ± 0,00 ^c	0,39 ± 0,00 ^a	0,43 ± 0,00 ^b
Włókno surowe	1,50 ± 0,40 ^a	1,50 ± 0,41 ^a	1,79 ± 0,37 ^a
Białko	10,05 ± 0,31 ^a	10,05 ± 0,36 ^a	11,13 ± 0,36 ^b
Kwas mlekowy	0,46 ± 0,08 ^a	0,46 ± 0,01 ^a	0,58 ± 0,09 ^b
Charakterystyka mikrobiologiczna produktu			
Ogólna liczba bakterii [jtk/cm ³]	8,68 ± 0,1 ^a	8,70 ± 0,1 ^a	8,87 ± 0,1 ^a
Liczba pleśni [jtk/cm ³]	6,71 ± 0,1 ^a	6,85 ± 0,2 ^a	6,85 ± 0,1 ^a
Liczba bakterii mlekowych [jtk/cm ³]	8,76 ± 0,1 ^a	8,71 ± 0,1 ^a	8,85 ± 0,1 ^a

Wyniki dotyczące składu analogu sera typu Camembert z mikrobiologicznymi dodatkami w formie biomasy oraz wyekstrahowanego z niej oleju mikrobiologicznego, porównano z oryginałem mleczarskim. Zgodnie z charakterystyką produktu, ser dojrzewający typu Camembert powinien zawierać średnio: 52 g suchej masy 20 g

białka i 24 g tłuszczu na 100 g produktu. Zaproponowany w niniejszej pracy roślinny analog charakteryzował się mniejszym udziałem suchej masy, a więc niższą zawartością białka i tłuszczu, w porównaniu do oryginału mlecznego. Ser typu Camembert charakteryzował się brakiem błonnika oraz zawartością cholesterolu na poziomie 0,72 mg/g. Tłuszcz w serze Camembert zawierał 66,4% SFA, 30,4% MUFA i 3,2% PUFA [FoodData Central (usda.gov)]. Z perspektywy żywieniowej i oczekiwań konsumentów korzystna byłaby niska zawartość cholesterolu i UFA, w tym wysoką zawartość PUFA, tak jak miało to miejsce w przypadku zaproponowanej receptury analogów.

Olej mikrobiologiczny z drożdży *Y. lipolytica* hodowanych w podłożu z posmażalniczym olejem rzepakowym, wykorzystany w roli dodatku do żywności, był podobny pod względem składu chemicznego do oleju z orzechów nerkowca. Profil kwasów tłuszczowych roślinnych analogów sera Camembert charakteryzował się wysokim udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA), głównie C18:1 (57,50 - 59,37 %) i C18:2 (19,20 - 20,45 %). Wybrany olej mikrobiologiczny cechował się podobne proporcje C18:1 (65,14 %) i C18:2 (18,04 %), ale nasycone kwasy tłuszczowe (SFA) stanowiły tylko 5,63 %, podczas gdy procent SFA tłuszczu nerkowców był bliski 20 %. Dodatek SCO nie zmienił korzystnego składu produktu pod względem nienasyconych, w tym wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co jest pozytywnym aspektem.

Oceniono również jakość lipidów obecnych w analogach sera Camembert. Dodatek oleju mikrobiologicznego spowodował wzrost stabilności oksydacyjnej frakcji tłuszczowej produktu ($T_{\max}=159,57$ min), w porównaniu do produktu kontrolnego bez tego dodatku ($T_{\max}=129,94$ min) (Tabela 15). Zmiany zaobserwowano jednak po 7 dniach dojrzewania. Gdy analogi wzbogacono biomasą drożdży oleistych, produkt był bardziej podatny na utlenianie ($T_{\max}=101,16$ min), ale, podobnie, tylko w pierwszym tygodniu procesu dojrzewania. Po 14 dniach przechowywania nie zaobserwowano istotnego wpływu dodatków na zmianę stabilności oksydacyjnej frakcji lipidowej produktów, które, prawdopodobnie ze względu na dłuższy okres przechowywania, były bardziej podatne na utlenianie, niezależnie od składu. Wartości $T_{\max}$ utleniania mieściły się w zakresie 101,08,- 107,57 min. Można stwierdzić, że dodatek SCO lub biomasy drożdży olejogennych do roślinnej alternatywy sera Camembert nie wpłynął na stabilność produktu końcowego.

Tabela 15. Parametry stabilności oksydacyjnej frakcji lipidowej roślinnych analogów sera typu Camembert z orzechów nerkowca w 3 wariantach: bez dodatków, z olejem mikrobiologicznym lub z dodatkiem biomasy drożdży, po 14 dniach dojrzewania.

* średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się istotnie ($\alpha=0,05$).

T_{on} – czas rozpoczęcia utleniania w danych warunkach temperaturowych;

T_{max} – maksymalny czas utlenienia próbki

Dzień	Wariant roślinnego analogu	T_{on} [min]	T_{max} [min]
7	kontrola	$115,80 \pm 0,21^b$	$129,94 \pm 0,96^b$
	produkt z olejem mikrobiologicznym	$146,17 \pm 1,51^c$	$159,57 \pm 1,33^c$
	produkt z biomasą drożdży	$87,95 \pm 4,5^a$	$101,16 \pm 3,24^a$
14	kontrola	$88,99 \pm 4,65^a$	$101,08 \pm 3,31^a$
	produkt z olejem mikrobiologicznym	$89,90 \pm 5,55^a$	$101,51 \pm 5,86^a$
	produkt z biomasą drożdży	$95,07 \pm 3,07^a$	$107,57 \pm 5,03^a$

Przyszłe prace badawcze powinny być prowadzone w kierunku wykorzystania bogatej w tłuszcz biomasy drożdżowej, ponieważ jej dodatek do żywności zwiększa zawartość również białka. Zmniejszenie zawartości tłuszczu w roślinnych analogach sera z porostem pleśni nie powinno być celem, biorąc pod uwagę smak i wartość odżywczą mlecznego oryginału.

Szereg przeprowadzonych eksperymentów pozwolił na pozytywne zweryfikowanie hipotezy **[H5]**. Olej mikrobiologiczny pozyskany z drożdży olejogennych z gatunku *Y. lipolytica* hodowanych w podłożach zawierających wybrane odpady przemysłu rolno-spożywczego, może znaleźć zastosowanie jako dodatek do żywności. Maksymalny poziom dodatku suszonej i dezaktywowanej termicznie biomasy drożdży *Y. lipolytica* do serów i produktów serowych wynosił 10 g/kg oraz 30 g/kg dla produktów do smarowania na bazie orzechów. W produkcie zaproponowanym w niniejszej pracy zastosowano dodatek biomasy drożdży olejogennych wynosił 10 g/kg [Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 2024/2044]. W przyszłości warto byłoby rozważyć inne poziomy dodatki i przeanalizować ich wpływ na końcową jakość produktu.

5. SPOSTRZEŻENIA I WNIOSKI

Przeprowadzone badania umożliwiły zweryfikowanie i potwierdzenie założonych hipotez badawczych. Jednocześnie wyniki wskazały na zasadność wykorzystania wybranych odpadów przemysłu rolno-spożywczego, tj. melasy, posmażalniczego oleju rzepakowego i serwatki, jako substratów i źródeł składników niezbędnych do wzrostu olejogennych drożdży z gatunku *Y. lipolytica*. Na podstawie analizy zebranych wyników sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Jednoczesna limitacja źródeł fosforu i azotu w hodowli drożdży olejogennych sprzyjała biosyntezie *ex novo* lipidów w komórkach. Najwyższą wydajność lipidów wewnątrzkomórkowych - 47,44 % uzyskano w okresowej hodowli szczepu *Y. lipolytica* KKP 379, w podłożu mineralnym z jednoczesną limitacją źródła fosforu ($3,0 \text{ g/dm}^3 \text{ KH}_2\text{PO}_4$) i źródła azotu ($3,0 \text{ g/dm}^3 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$) oraz z posmażalniczym olejem rzepakowym jako źródła węgla.
2. Eksperymenty prowadzone w skali bioreaktora laboratoryjnego, jak i w skali hodowli wytrząsanych podkreśliły rolę azotu i fosforu jako składników podłoża, których limitacja ma istotny wpływ na podstawowy metabolizm komórek drożdży olejogennych oraz poprawę wydajności biosyntezy SCO. Podczas hodowli w podłożach o odwróconych proporcjach tych dwóch pierwiastków (tj. z limitacją azotu i bez limitacji fosforu oraz z limitacją źródła fosforu i bez ograniczenia dodatku źródła azotu), możliwa do pozyskania z hodowli ilość oleju mikrobiologicznego była zbliżona. W związku z powyższym, limitacja źródła fosforu wydaje się być dobrą strategią wydajnej kumulacji lipidów, w przypadku wykorzystania w podłożu hodowlanym odpadów przemysłowych zasobnych w azot.
3. Zastosowanie dezintegracji komórek za pomocą US, PEF oraz HPH, w badanym zakresie parametrów, okazało się nieskuteczną metodą wydobycia lipidów komórkowych drożdży. Zastosowanie tych metod jako formy wstępnej obróbki biomasy drożdży *Y. lipolytica* istotnie zwiększyło wydajność tradycyjnej metody ekstrakcji z udziałem rozpuszczalnika 30,1 % do 36,5% (PEF) oraz do 45,7% (HPH).
4. Dobór substratów (w tym odpadów przemysłu spożywczego) i trybu hodowli wpływały na wydajność kumulacji lipidów komórkowych drożdży *Y. lipolytica*. Tryby hodowli: z dozowaniem źródła węgla w trakcie hodowli lub okresową wymianą części podłoża hodowlanego okazały się procesami pozwalającym

- na pozyskanie większych ilości lipidów komórkowych ($4,01 \text{ g/dm}^3$ i $2,48 \text{ g/dm}^3$), w porównaniu z prostym trybem okresowym ($1,05 \text{ g/dm}^3$).
5. Wykorzystane substraty w różny sposób wpływały na zawartość wybranych pierwiastków w biomasie, jak również steroli oraz na profil kwasów tłuszczowych w pozyskanych olejach mikrobiologicznych. Możliwość profilowania składu zwiększa potencjał wykorzystania biomasy drożdży olejogennych, jak i ekstrahowanego z niej oleju mikrobiologicznego jako składników produktów spożywczych.
 6. SCO pozyskany w okresowej hodowli z zasilaniem podłoża melasą, charakteryzował się najwyższą zawartością steroli ($68,40 \text{ mg/g}$), z czego $87,94 \%$ stanowił ergosterol ($60,16 \text{ mg/g}$).
 7. Spośród lipidów pozyskanych z hodowli w podłożach z przemysłowymi odpadami, olej mikrobiologiczny z okresowej hodowli w podłożu z posmażalniczym olejem rzepakowym, odznaczał się najwyższym udziałem UFA ($93,34\%$) w ogólnym profilu kwasów tłuszczowych oraz był najbardziej stabilny oksydacyjnie, także w porównaniu z olejami roślinnymi.
 8. Oleje mikrobiologiczne pozyskane w hodowli drożdży *Y. lipolytica* w podłożach zawierających melasę i posmażalniczy olej, nie zawierały metali ciężkich ani wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ilościach przekraczających dopuszczalne normy. Dlatego mogą znaleźć zastosowanie jako dodatek do żywności, np. do roślinnych analogów serów dojrzewających.
 9. Jako dodatek do roślinnego analogu sera dojrzewającego typu Camembert, zaproponowano olej mikrobiologiczny pozyskany z okresowej hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym oraz całą, wysuszoną i dezaktywowaną termicznie biomasą drożdży *Y. lipolytica*, zasobną w wytypowany olej mikrobiologiczny. Zdecydowały o tym: najwyższy udział nienasyconych kwasów tłuszczowych, wysoka czystość pod kątem pozostałości rozpuszczalników oraz spełnione wymogi prawne dotyczące pozostałości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.
 10. Dodatek biomasy drożdży olejogennych z hodowli z posmażalniczym olejem rzepakowym do zaproponowanego roślinnego analogu sera typu Camembert z orzechów nerkowca, wpłyną na wzrost zawartości białka w produkcie końcowym. Dodatek oleju mikrobiologicznego podwyższył nieznacznie udział tłuszczu w produkcie, nie zmieniając jednak jego korzystnego profilu kwasów tłuszczowych.

6. SPIS LITERATUREY

1. Abeln, F., Chuck, C. J. (2021). The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial cell factories*, 20, 1-31. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01712-1>
2. Abghari, A., Chen, S. (2014). *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid-based biofuel and bioproducts. *Frontiers in Energy Research*, 2, 21. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00021>
3. AOAC. International Official Methods of Analysis, 17th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2000; Volume 2.
4. Awad, D., Bohnen, F., Mehlmer, N., Brueck, T. (2019). Multi-factorial-guided media optimization for enhanced biomass and lipid formation by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 54. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00054>
5. Bao, W., Li, Z., Wang, X., Gao, R., Zhou, X., Cheng, S., Zheng, L. (2021). Approaches to improve the lipid synthesis of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111386>
6. Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Mizerakis, P., Aggelis, G. (2016). High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *Journal of Biotechnology*, 234, 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.001>
7. Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribe Larrea, J. L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in lipid research*, 48(6), 375-387. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>
8. Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M. T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot T., Nicaud, J. M. (2008). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, 74(24), 7779-7789. <https://doi.org/10.1128/AEM.01412-08>
9. Beopoulos, A., Nicaud, J. M., Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1193-1206. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>
10. Boekhout, T., Amend, A. S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan C.S., Turchetti, B., Vu, D., Wang Q., Yurkov, A. (2022). Trends in

- yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, 114(1), 491-537.
<https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
11. Breil, C., Abert Vian, M., Zemb, T., Kunz, W., Chemat, F. (2017). “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 708.
<https://doi.org/10.3390/ijms18040708>
 12. Carsanba E, Papanikolaou S, Fickers P, Erten H. (2020). Lipids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose in batch cultures. *Microorganisms*, 8, 1–14.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8071054>
 13. Carsanba, E., Papanikolaou, S., Erten, H. (2013). Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 1230–1243
<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>
 14. Carsanba, E., Papanikolaou, S., Erten, H. (2018). Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Critical reviews in biotechnology*, 38(8), 1230-1243. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>
 15. Chang, Y. H., Chang, K. S., Lee, C. F., Hsu, C. L., Huang, C. W., Jang, H. D. (2015). Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corn cob hydrolysate as carbon source. *Biomass and bioenergy*, 72, 95-103.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.11.012>
 16. Chauhan, M. K., Chaudhary, S., Kumar, S. (2011). Life cycle assessment of sugar industry: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(7), 3445-3453.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.04.033>
 17. Cito, G., Cocci, A., Micelli, E., Gabutti, A., Russo, G. I., Coccia, M. E., Natali, A. (2020). Vitamin D and male fertility: an updated review. *The world journal of men's health*, 38(2), 164. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190057>
 18. Czech, A., Smolczyk, A., Ognik, K., Kiesz, M. (2016). Nutritional value of *Yarrowia lipolytica* yeast and its effect on growth performance indicators in piglets. *Annals of Animal Science*, 16(4), 1091-1100. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0034>
 19. Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R. (2000). Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10), 4340–4344 <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4340-4344.2000>

20. Derewiaka, D., Stepnowska, N., Bryś, J., Ziarno, M., Ciecierska, M., Kowalska, J. (2019). Chia seed oil as an additive to yogurt. *Grasas y Aceites*, 70(2), e302-e302. <https://doi.org/10.3989/gya.0705182>
21. Dré villon, L., Koubaa, M., Nicaud, J. M., Vorobiev, E. (2019). Cell disruption pre-treatments towards an effective recovery of oil from *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast. *Biomass and Bioenergy*, 128, 105320. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105320>
22. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/32/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych państw członkowskich dotyczących rozpuszczalników do ekstrakcji stosowanych w produkcji środków spożywczych i składników żywności <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/32/2023-02-16>
23. Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I., Madani, M. (2013). Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Candida gali* and *Yarrowia lipolytica* M7. *Journal of cell and molecular research*, 5(1), 17-23. <https://doi.org/10.22067/jcmr.v5i1.16611>
24. Fabiszewska, A. U., Zieniuk, B., Kozłowska, M., Mazurczak-Zieniuk, P. M., Wołoszynowska, M., Misiukiewicz-Stępień, P., Nowak, D. (2021). Studies on upgradation of waste fish oil to lipid-rich yeast biomass in *Yarrowia lipolytica* batch cultures. *Foods*, 10(2), 436. <https://doi.org/10.3390/foods10020436>
25. Fabiszewska, A., Misiukiewicz-Stępień, P., Paplińska-Goryca, M., Zieniuk, B., Białecka-Florjańczyk, E. (2019). An insight into storage lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules*, 9(11), 685. <https://doi.org/10.3390/biom9110685>
26. Fabiszewska, A., Pakulska, A., Zieniuk, B., Wierzchowska, K., Jasińska, K., Małajowicz, J., Nowak, D. (2023). Unconventional Extraction Methods of Oleaginous Yeast Cell Pretreatment and Disruption. *Applied Sciences*, 13(24), 13135. <https://doi.org/10.3390/app132413135>
27. Fakas, S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 292-302. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600040>
28. Fickers, P., Benetti, P. H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S., Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia*

- lipolytica*, and its potential applications. FEMS yeast research, 5(6-7), 527-543.
<https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
29. Flores, M., Corral, S., Cano-García, L., Salvador, A., Belloch, C. (2015). Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 212, 16–24 <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>
 30. Folch, J., Lees, M., Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Journal of biological chemistry, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
 31. FoodData Central (usda.gov), <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/172178/nutrients>
 32. Gajdoš, P., Hambalko, J., Slaný, O., Čertík, M. (2020). Conversion of waste materials into very long chain fatty acids by the recombinant yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Letters, 367(6), fnaa042. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa042>
 33. Gill, C. O., Hall, M. J., Ratledge, C. (1977). Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. Applied and environmental microbiology, 33(2), 231-239. <https://doi.org/10.1128/aem.33.2.231-239.1977>
 34. Girardi Piva, G., Casalta, E., Legras, J. L., Tesnière, C., Sablayrolles, J. M., Ferreira, D., Mouret, J. R. (2022). Characterization and role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during white wine alcoholic fermentation. Fermentation, 8(2), 90. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020090>
 35. Gorte, O., Kugel, M., Ochsenreither, K. (2020). Optimization of carbon source efficiency for lipid production with the oleaginous yeast *Saitozyma podzolica* DSM 27192 applying automated continuous feeding. Biotechnology for biofuels, 13, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01824-7>
 36. Gottardi, D., Siroli, L., Vannini, L., Patrignani, F., Lanciotti, R. (2021) Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. Trends Food Sci Technol 115:74–86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.025>
 37. Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W., Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Critical reviews in microbiology, 40(3), 187-206. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>

38. Hassanshahian, M., Tebyanian, H., Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. Mar. Pollut. Bull. 64(7), 1386–1391
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.04.020>
39. Hoarau, J., Petit, T., Grondin, I., Marty, A., Caro, Y. (2020). Phosphate as a limiting factor for the improvement of single cell oil production from *Yarrowia lipolytica* MUCL 30108 grown on pre-treated distillery spent wash. Journal of Water Process Engineering, 37, 101392. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101392>
40. Holman, B. W., Bailes, K. L., Meyer, R. G., Hopkins, D. L. (2019). Effect of modified Soxhlet (Soxtec) and Folch extraction method selection on the total lipid determination of aged beef. Journal of food science and technology, 56, 3957-3961.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03878-4>
41. Huang, X., Luo, H., Mu, T., Shen, Y., Yuan, M., Liu, J. (2018). Enhancement of lipid accumulation by oleaginous yeast through phosphorus limitation under high content of ammonia. Bioresource technology, 262, 9-14.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.063>
42. Jach, M. E., Malm, A. (2022). *Yarrowia lipolytica* as an alternative and valuable source of nutritional and bioactive compounds for humans. Molecules, 27(7), 2300.
<https://doi.org/10.3390/molecules27072300>
43. Jain, A., Jain, R., Jain, S., Jain, A., Jain, R., Jain, S. (2020). Quantitative analysis of reducing sugars by 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNSA method). Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques, 181-183. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43
44. Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, L. (2008). Whey based beverages-new generation of dairy products. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, 58(3), 257-274. <https://www.researchgate.net/publication/228631581>
45. Jiang, Q., Zhang, M., Mujumdar, A. S. (2020). UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms: Effect of different drying conditions. Trends in Food Science Technology, 105, 200-210.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.011>
46. Juszczuk, P., Tomaszewska, L., Kita, A., Rymowicz, W. (2013). Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. Biores. Technol. 137, 124–213 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.010>

47. Kapturowska, A. U., Stolarzewicz, I. A., Krzyczkowska, J., Białecka-Florjańczyk, E. (2012). Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. Ultrasonics sonochemistry, 19(1), 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.015>
48. Kolouchová, I., Maťátková, O., Sigler, K., Masák, J., Řezanka, T. (2016). Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. Folia microbiologica, 61, 431-438. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0454-y>
49. Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I. (2015). Drożdże jako potencjalne źródło tłuszczu mikrobiologicznego. Postępy mikrobiologii, 54, 364-373
50. Kraljić, K., Škevin, D., Pospíšil, M., Obranović, M., Neđeral, S., Bosolt, T. (2013). Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperatures. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90(4), 589-599. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2195-7>
51. Krzyczkowska, J., Fabiszewska, A.U. (2015). *Yarrowia lipolytica* – niekonwencjonalne drożdże w biotechnologii. Postępy Mikrobiologii 54, 33–43
52. Lazar, Z., Liu, N., Stephanopoulos, G. (2018). Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. Trends in biotechnology, 36(11), 1157-1170. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.007>
53. Lindberg, L., Santos, A. X., Riezman, H., Olsson, L., Bettiga, M. (2013). Lipidomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* reveals critical changes in lipid composition in response to acetic acid stress. PloS one, 8(9), e73936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073936>
54. Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. Journal of bacteriology, 180(15), 3735-3740. <https://doi.org/10.1128/jb.180.15.3735-3740.1998>
55. Liu, H.H., Ji, X.J., Huang, H. (2015A). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. Biotechnol. Adv. 33, 1522–1546 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>
56. Liu, J. F., Xia, J. J., Nie, K. L., Wang, F., Deng, L. (2019). Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2673-2>

57. Liu, X., Lv, J., Xu, J., Zhang, T., Deng, Y., He, J. (2015). Citric acid production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b yeast when grown on waste cooking oil. Appl. Biochem. Biotechnol. 175(5), 2347–2356 <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1430-0>
58. López-Bascón, M. A., De Castro, M. L. (2020). Soxhlet extraction. In Liquid-phase extraction (pp. 327-354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>
59. Martínez, E. J., Raghavan, V., González-Andrés, F., Gómez, X. (2015). New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. International journal of molecular sciences, 16(5), 9385-9405. <https://doi.org/10.3390/ijms16059385>
60. Michalik, B., Biel, W., Lubowicki, R., Jacyno, E. (2014). Chemical composition and biological value of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol. Canadian Journal of Animal Science, 94(1), 99-104. <https://doi.org/10.4141/cjas2013-052>
61. Naliyadhara, N., Kumar, A., Girisa, S., Daimary, U. D., Hegde, M., Kunnumakkara, A. B. (2022). Pulsed electric field (PEF): Avant-garde extraction escalation technology in food industry. Trends in Food Science & Technology, 122, 238-255. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.019>
62. Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. European Journal of Lipid Science and Technology, 113(8), 1031-1051. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>
63. Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2003). Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. European Journal of Lipid Science and Technology, 105(11), 651-655. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300858>
64. Patsios, S.I., Dedousi, A., Sossidou, E.N., Zdragas, A. (2020). Sustainable animal feed protein through the cultivation of *Yarrowia Lipolytica* on agro-industrial wastes and by-products. Sustainability 12(4), 1398 <https://doi.org/10.3390/su12041398>
65. Pawlikowska E., Kręgiel D. 2017: Niekonwencjonalne drożdże Metschnikowia pulcherrima i ich zastosowanie w biotechnologii. Postępy mikrobiologii, 56, 405-415
66. Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., Pereira, C. D. (2021). Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. Foods, 10(5), 1067. <https://doi.org/10.3390/foods10051067>
67. Polburee, P., Yongmanitchai, W., Lertwattanasakul, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., Limtong, S. (2015). Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels

- of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal biology*, 119(12), 1194-1204. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.002>
68. Polburee, P., Yongmanitchai, W., Lertwattanasakul, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., Limtong, S. (2015). Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal biology*, 119(12), 1194-1204. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.002>
 69. Poontawee, R., Lorliam, W., Polburee, P., Limtong, S. (2023). Oleaginous yeasts: Biodiversity and cultivation. *Fungal Biology Reviews*, 44, 100295. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.11.003>
 70. Qadeer S, Khalid A, Mahmood S, Anjum M, Ahmad Z. Utilizing oleaginous bacteria and fungi for cleaner energy production. *J Clean Prod* 2017;168:917–28. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.093>
 71. Qi, Y., Liu, H., Chen, X., Liu, L. (2019). Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains. *Metabolic Engineering*, 53, 24-34.
 72. Qian, Y. D., Tan, S. Y., Dong, G. R., Niu, Y. J., Hu, C. Y., Meng, Y. H. (2020). Increased campesterol synthesis by improving lipid content in engineered *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16), 7165-7175. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10743-4>
 73. Raczky, M., Popis, E., Kruszewski, B., Ratusz, K., Rudzinska, M., Physicochemical quality and oxidative stability of linseed and camelina cold-pressed oils from retail outlets. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2016, 118, 834–839.
 74. Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 1047-1050. <https://doi.org/10.1042/bst0301047>
 75. Ratledge, C., Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils?. *Lipid Technology*, 20(7), 155-160. <https://doi.org/10.1002/lite.200800044>
 76. Rękas, A., Siger, A., Wroniak, M., Ścibisz, I., Derewiaka, D., Anders, A. (2017). Dehulling and microwave pretreatment effects on the physicochemical composition and antioxidant capacity of virgin rapeseed oil. *Journal of food science and technology*, 54, 627-638. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2486-y>

77. Ren, W., Wu, J., Wang, J., Wang, H., Han, Y., Lin, Y., Bu, M. (2023). Mitochondria-targeted ergosterol peroxide derivatives: synthesis, anticancer properties and their preliminary mechanism of inhibiting MCF-7 cell proliferation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 34(10), 1420-1431. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230054>
78. Rigouin, C., Croux, C., Borsenberger, V., Ben Khaled, M., Chardot, T., Marty, A., Bordes, F. (2018). Increasing medium chain fatty acids production in *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering. *Microbial cell factories*, 17, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0989-5>
79. Robles-Iglesias, R., Naveira-Pazos, C., Fernández-Blanco, C., Veiga, M. C., Kennes, C. (2023). Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 171, 113043. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113043>
80. Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., García-Cano, I. (2021). Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1262-1275. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>
81. Roostita, R., Fleet, G. H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *International journal of food microbiology*, 28(3), 393-404. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00018-6)
82. Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 <http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>
83. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2019/760 z dnia 13 maja 2019 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/760/oj
84. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/1822 z dnia 2 grudnia 2020 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek zawierającej chrom biomasy drożdży (*Yarrowia lipolytica*) jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2020/1822/oj

85. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2024/2044 z dnia 29 lipca 2024 r. zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/2470 w odniesieniu do warunków stosowania nowej żywności biomasa drożdży *Yarrowia lipolytica* http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2024/2044/oj
86. Sandoval, N. R., Papoutsakis, E. T. (2016). Engineering membrane and cell-wall programs for tolerance to toxic chemicals: Beyond solo genes. *Current opinion in microbiology*, 33, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.005>
87. Santos, A. X., Riezman, H. (2012). Yeast as a model system for studying lipid homeostasis and function. *FEBS letters*, 586(18), 2858-2867. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.033>
88. Sapsirisuk, S., Polburee, P., Lorliam, W., Limtong, S. (2022). Discovery of oleaginous yeast from mountain forest soil in Thailand. *Journal of Fungi*, 8(10), 1100. <https://doi.org/10.3390/jof8101100>
89. Sapsirisuk, S., Polburee, P., Lorliam, W., Limtong, S. (2022). Discovery of oleaginous yeast from mountain forest soil in Thailand. *Journal of Fungi*, 8(10), 1100. <https://doi.org/10.3390/jof8101100>
90. Saran, S., Mathur, A., Dalal, J., Saxena, R. K. (2017). Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, 188, 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.09.051>
91. Sawangkeaw, R., Ngamprasertsith, S. (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.04.007>
92. Schulze, I., Hansen, S., Großhans, S., Rudsuck, T., Ochsenreither, K., Sylatk, C., Neumann, A. (2014). Characterization of newly isolated oleaginous yeasts- *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express*, 4, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0024-0>
93. Shene, C., Monsalve, M. T., Vergara, D., Lienqueo, M. E., Rubilar, M. (2016). High pressure homogenization of *Nannochloropsis oculata* for the extraction of intracellular components: Effect of process conditions and culture age. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(4), 631-639.a
94. Singh, G., Sinha, S., Kumar, K. K., Gaur, N. A., Bandyopadhyay, K. K., Paul, D. (2020). High density cultivation of oleaginous yeast isolates in 'mandi' waste for enhanced lipid production using sugarcane molasses as feed. *Fuel*, 276, 118073. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118073>

95. Spencer, J., Ragout de Spencer, A., Lalue, C. (2002). Non-conventional yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 147-156. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>
96. Sreeharsha, R. V., Mohan, S. V. (2020). Obscure yet promising oleaginous yeasts for fuel and chemical production. *Trends in biotechnology*, 38(8), 873-887. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.004>
97. Szczepaniak, G., Wojtatowicz, M. (2011). Dobór szczepów *Yarrowia lipolytica* i *Debaryomyces hansenii* do szczepionki wspomagającej proces dojrzewania sera. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 6(79), 192–203
98. Szczepańska, P., Hapeta, P., Lazar, Z. (2022). Advances in production of high-value lipids by oleaginous yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(1), 1-22. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1922353>
99. Ta, T. M. N., Romero-Guido, C., Phan, T. H., Tran, H. D., Dinh, H. T., Waché, Y. (2022). Encapsulation of flavours into *Yarrowia lipolytica* active yeast cells. Fluorescence study of the lipid droplets morphology and steryl/sterol balance during the shock. *AIMS Biophysics*, 9(3), 257-270. <https://doi.org/10.3934/biophy.2022022>
100. Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M. N., Arslan, N. P. (2015). Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), 595-605. <https://doi.org/10.1002/bbb.1560>
101. Thevenieau, F., Nicaud, J. M. (2013). Microorganisms as sources of oils. *Ocl*, 20(6), D603. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013034>
102. Tiwari, A., Singh, G., Choudhir, G., Motiwale, M., Joshi, N., Sharma, V., Singour, P. K. (2022). Deciphering the potential of pre and pro-vitamin D of mushrooms against Mpro and PLpro proteases of COVID-19: an in silico approach. *Molecules*, 27(17), 5620. <https://doi.org/10.3390/molecules27175620>
103. Tsigie, Y. A., Wang, C. Y., Truong, C. T., Ju, Y. H. (2011). Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource technology*, 102(19), 9216-9222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.047>
104. Turanlı-Yıldız, B., Benbadis, L., Alkim, C., Sezgin, T., Akşit, A., Gökçe, A., Francois, J. M. (2017). In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells triggers diploidization. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(3), 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.04.012>

105. Turanlı-Yıldız, B., Benbadis, L., Alkım, C., Sezgin, T., Akşit, A., Gökçe, A., Francois, J. M. (2017). In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells triggers diploidization. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(3), 309-318.
106. Van der Walt J.P., von Arx J.A. (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen nov. *Anton. Leeuw.* 46, 517–521
107. Vasconcelos, B., Teixeira, J. C., Dragone, G., Teixeira, J. A. (2019). Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 3651-3667. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09742-x>
108. Walker, C., Ryu, S., Trinh, C. T. (2019). Exceptional solvent tolerance in *Yarrowia lipolytica* is enhanced by sterols. *Metabolic engineering*, 54, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.03.003>
109. Wen, L., Li, X. Y. (2022). Production of intracellular lipids from thermally hydrolyzed waste sludge by oleaginous yeast for energy and resource recovery. *Energy Conversion and Management*, 252, 115129. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.115129>
110. Wen, Z., Al Makishah, N. H. (2022). Recent advances in genetic technology development of oleaginous yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(17), 5385-5397. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12101-y>
111. Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01516-9>
112. Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology*, 101(15), 6124-6129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.111>
113. Zhang, S., Wang, J., Jiang, H. (2021). Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. *Food chemistry*, 346, 128860. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128860>
114. Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2019). *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35(1), 10 <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>
115. Zieniuk, B., Wołoszynowska, M., Białecka-Florjańczyk, E., Fabiszewska, A. (2020). Synthesis of industrially useful phenolic compounds esters by means of

biocatalysts obtained along with waste fish oil utilization. Sustainability 12(14), 5804
<https://doi.org/10.3390/su12145804>

116. Zinjarde, S.S. (2014). Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. Food Chem. 152, 1–10 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>

7. DOROBIEK NAUKOWY

Prace badawcze stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Wierzchowska, K.***, Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. Waste and Biomass Valorization, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01516-9>
2. **Wierzchowska, K.***, Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Applied Sciences, 11(24), 11819. doi.org/10.3390/app112411819
3. **Wierzchowska, K.***, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells? In: Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56) doi.org/10.3390/Foods2022-12959
4. **Wierzchowska, K.***, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877. doi.org/10.3390/app122412877
5. **Wierzchowska, K.***, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688, doi.org/10.1007/s00217-023-04322-w
6. **Wierzchowska, K.***, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, 105321. doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105321

Pozostałe prace (chronologicznie):

7. Fabiszewska, A., **Wierzchowska, K.**, Górka, A., Zieniuk, B. (2020). Rapeseed post-frying oil from fish fillets as a carbon source in microbial oil synthesis. Proceedings 2021, 70(1), 68; https://doi.org/10.3390/foods_2020-07715.
8. Fabiszewska, A., **Wierzchowska, K.**, Nowak, D., Wołoszynowska, M., Zieniuk, B. (2022). Brine and post-frying oil management in the fish processing industry—a concept based on oleaginous yeast culture. Processes, 10(2), 294. <https://doi.org/10.3390/pr10020294>
9. Jasińska, K., Zieniuk, B., Fabiszewska, A., **Wierzchowska, K.** (2022). Investigating Culture Media for Obtaining Lipolytic Biocatalysts Based on *Rhizopus oryzae* Fungi. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 27). MDPI.. [http://doi.org/10.3390/Foods2022-12965](https://doi.org/10.3390/Foods2022-12965)
10. Zieniuk, B., Jasińska, K., **Wierzchowska, K.**, Fabiszewska, A. (2022, October). Enzymatic synthesis of flavours and fragrances, antioxidants and antimicrobials on the example of benzyl alcohol and its selected derivatives. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/Foods2022-13066>

11. Zieniuk, B., Ononamadu, C. J., Jasińska, K., **Wierzchowska, K.**, Fabiszewska, A. (2022). Lipase-catalyzed synthesis, antioxidant activity, antimicrobial properties and molecular docking studies of butyl dihydrocaffeate. *Molecules*, 27(15), 5024. <https://doi.org/10.3390/molecules27155024>
12. Zieniuk, B., Białecka-Florjańczyk, E., **Wierzchowska, K.**, Fabiszewska, A. (2022). Recent advances in the enzymatic synthesis of lipophilic antioxidant and antimicrobial compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03200-5>
13. Fabiszewska, A., Pakulska, A., Zieniuk, B., **Wierzchowska, K.**, Jasińska, K., Małajowicz, J., Nowak, D. (2023). Unconventional Extraction Methods of Oleaginous Yeast Cell Pretreatment and Disruption. *Applied Sciences*, 13(24), 13135. <https://doi.org/10.3390/app132413135>
14. Zieniuk, B., Jasińska, K., **Wierzchowska, K.**, Uğur, Ş., Fabiszewska, A. (2024). *Yarrowia lipolytica* Yeast: A Treasure Trove of Enzymes for Biocatalytic Applications—A Review. *Fermentation*, 10(5), 263. <https://doi.org/10.3390/fermentation10050263>
15. Fabiszewska, A., **Wierzchowska, K.**, Dębkowska, I., Śliczniak, W., Ziółkowska, M., Jasińska, K., Kobus, J., Nowak, D., Zieniuk, B. (2024). Plant-Based Alternatives to Mold-Ripened Cheeses as an Innovation among Dairy Analogues. *Foods*, 13(14). <https://doi.org/10.3390/foods13142305>
16. Zieniuk, B., Małajowicz, J., Jasińska, K., **Wierzchowska, K.**, Uğur, Ş., & Fabiszewska, A. (2024). Agri-Food and Food Waste Lignocellulosic Materials for Lipase Immobilization as a Sustainable Source of Enzyme Support—A Comparative Study. *Foods*, 13(23), 3759. <https://doi.org/10.3390/foods13233759>

Rozdziały w monografii:

1. Maja Ukleja, Mariola Kozłowska, Małgorzata Wołoszynowska, **Katarzyna Wierzchowska**, Bartłomiej Zieniuk: Wybrane parametry jakościowe oleju mikrobiologicznego drożdży *Yarrowia lipolytica* otrzymanego w podłożach z odpadowymi olejami przemysłu rybnego, W: *Żywność a oczekiwania współczesnego konsumenta* / Kowalski Stanisław, Zięć Gabriela, Dróżdż Iwona (red.), 2020, Kraków, Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego im Hugona Kołłątaja w Krakowie, s.194-205, ISBN 978-83-66602-10-6

Patenty:

1. PK/8286/RW/AK, Decyzja UPRP o udzieleniu patentu na wynalazek pt.: „Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z hodowli mikroorganizmów olejogennych
2. Zgłoszenie patentowe 2024r.: „Sposób wytwarzania roślinnej alternatywy sera z porostem pleśni”. Zgłoszenie oznaczono nr: P.448784 [WIPO ST10/C PL448784]

Saże, warsztaty i szkolenia w zagranicznych lub krajowych ośrodkach :

1. BIP, Blended Intensive Programme on “Nutrition and Nutrition Education” 23.08.2024 - 10.10.2024 r., Study Week in Ljubljana 09.09.2024 - 13.09.2024, University of Ljubljana, Słowenia

2. BIP, Blended Intensive Programme on “Decentralized water and waste management systems: appropriate technologies and solutions for resilience and sustainability”, Università degli Studi di Brescia, Italy 24.06.2024-28.06.2024
3. Erasmus+ program - Fostering entrepreneurship for the bioeconomy (FOEBE) - Course from 31.01.2022 - 29.05.2022 - Study week in Bologna, Italy 20.06.2022 - 24.06.2022,
4. **08-2021 - 09.2021r.** oraz **02.2022 - 03.2022r.** - Staż naukowy w Instytucie Przemysłu Organicznego - Sieć Badawcza Łukasiewicz w Warszawie

Udział w projektach:

1. KIEROWNIK 3-letniego projektu PRELUDIUM 21 - 2022/45/N/NZ9/02583 pt. „Biochemiczne szlaki biosyntezy lipidów zapasowych w komórkach drożdży olejogennych na drodze hodowli w podłożach z hydrofobowym źródłem węgla - spojrzenie molekularne” – projekt finansowany przez NCN – Narodowe Centrum Nauki;
2. WYKONAWCA - „Roślinna alternatywa serów dojrzewających z udziałem pleśni jako innowacja wśród analogów nabiału” - Projekt został sfinansowany ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach programu "Studenckie Koła Naukowe tworzą innowacje" (nr projektu SKN/SP/495871/2021)

Doniesienia konferencyjne:

1. Referat pt. „Drożdże olejogenne – innowacja w naukach o żywności” –konferencja MeetUp Food Supplement Ingredients | Business & Science 2023 – 07.11.2023, Warszawa;
2. XXVII Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej – referat pt.: „Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość” Zdolności Adaptacyjne Dzikiego Szczepu Drożdży *Y. Lipolytica* – Mikrobiologicznego Producenta Lipidów I Platformy Do Waloryzacji Odpadów Przemysłu Rolno-Spożywczego – 14.05.2023 r. Warszawa-nagroda w sekcji referatów;
3. V Konferencja Doktorantów "Cztery Żywioty- współczesne problemy w naukach o życiu" – referat "Analiza jakościowa mikrobiologicznych lipidów pozyskanych z hodowli olejogennych drożdży *Yarrowia lipolytica* w podłożach zawierających odpady przemysłu rolno-spożywczego" - 14 grudnia 2022 r.;
4. 3th Electronic Conference on Foods: Is There Any Possibility to Use Ultrasounds, High-Pressure Homogenization or Pulsed Electric Field in Single Cell Oil Release from Oleaginous Yeast Cells? – 09.2022 r.
5. Electronic Conference on Foods: Investigating Culture Media for Obtaining Lipolytic Biocatalysts Based on *Rhizopus oryzae* Fungi – 09.2022 r.
6. 3th Electronic Conference on Foods: Enzymatic Synthesis of Flavours and Fragrances, Antioxidants and Antimicrobials on the Example of Benzyl Alcohol and Its Selected Derivatives - 10.2022 r.
7. XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej „Żywność dzisiaj – lokalna czy globalna? tradycyjna czy innowacyjna?” - wystąpienie pt. „Olej mikrobiologiczny – zrównoważona alternatywa dla konwencjonalnych tłuszczów roślinnych?" 19.05.2022 r. Poznań - II miejsce w sekcji referatów

8. IV. Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – współczesne problemy w naukach o życiu” - wystąpienie pt. "Rola niekonwencjonalnych drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* w zagospodarowaniu hydrofobowych odpadów przemysłu spożywczego" - 14.12.2021 r.
9. „Zdolność drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* do syntezy oleju mikrobiologicznego” VII Ogólnopolska Sesja Studenckich Kół Naukowych, Szczecin, 09-11 grudzień 2021 r.
10. ELLS Scientific Students Conference 2021 - wystąpienie pt. "*Yarrowia lipolytica* yeast - a multifunctional tool in microbial oil collection" - 20.11.2021 r. - I miejsce w Konkursie SD – SGGW
11. V. Symposium Naukowe "Drobnoustroje i ich metabolity-mikroświat wielkich możliwości" – wystąpienie ustne pt. „Wpływ limitacji źródła fosforu i azotu na wydajność biosyntezy mikrobiologicznych lipidów przez olejogenne drożdże *Yarrowia lipolytica*” - 15.06.2021 r.

Uzyskane odznaczenia i nagrody:

1. II miejsce w sekcji referatów - XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej „Żywność dzisiaj – lokalna czy globalna? tradycyjna czy innowacyjna?” - wystąpienie pt. „Olej mikrobiologiczny – zrównoważona alternatywa dla konwencjonalnych tłuszczów roślinnych?” 19.05.2022 r. Poznań
2. I miejsce w Konkursie Szkoły Doktorskiej SGGW na najlepszy poster naukowy – 05.06.2022 r.
3. Nagroda w konkursie „KoKoN” w kategorii badania naukowe za projekt „Roślinna alternatywa serów dojrzewających z udziałem pleśni jako innowacja wśród analogów nabiału” 22.10.2022 r.
4. Nagroda zespołowa JM Rektora SGGW za osiągnięcia badawcze w 2022 i 2023 r.
5. Nagroda w kategorii referatów - XXVII Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej „Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość”, International Session of Young Scientific Staff „Food Science Development. Sustainable Future” – 11.05.2023r.

**8. PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ
WRAZ Z OŚWIADCZENIAMI WSPÓŁAUTORÓW**



Use of Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* in Treatment or Upgradation of Hydrophobic Industry Wastes

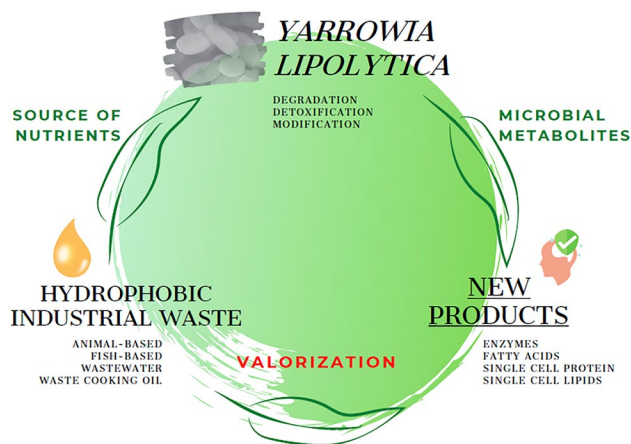
Katarzyna Wierzchowska¹ · Bartłomiej Zieniuk¹ · Agata Fabiszewska¹

Received: 1 March 2021 / Accepted: 5 July 2021 / Published online: 16 July 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

The review aims to summarize the current knowledge on the possibility of using non-conventional yeast species *Yarrowia lipolytica* in the treatment and upgradation of industry wastes. Importantly *Y. lipolytica* yeast is argued as generally recognized as safe species, what indicates the high application potential of the reviewed technologies. Special emphasis in the paper was given on microbial processing of the food industry wastes, including fish and animals' wastes utilization. *Yarrowia*-based processing of waste cooking oil or oil-bearing plants wastewaters, such as palm oil mill effluents or olive mill wastewater was reviewed. Recent advances in biosynthesis of valuable metabolites (e.g. lipases or microbial oil) with simultaneous wastes utilization by *Y. lipolytica* are additionally discussed. The broad implications of the present paper are a part of sustainable development policy.

Graphic Abstract



Keywords Food industry wastes · Lipid waste · Sustainable bioprocess · Waste management · Non-pathogenic yeast · *Yarrowia lipolytica*

✉ Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl
Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl
Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

¹ Department of Chemistry, Institute of Food Sciences,
Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c
Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

Statement of Novelty

The article summarizes future perspectives of *Yarrowia lipolytica* yeast utilization in the context of hydrophobic waste management, especially in the food industry. The paper is a summary of current knowledge and scientific achievements. Currently, there is no article that comprehensively illustrates the use of *Y. lipolytica* yeast as a tool to valorize this type

of waste with the simultaneous obtaining new products. The issue is particularly significant due to the constantly growing population, which contributes to the vastness of food production and the vastness of production processes, the industrial waste produced could place a serious burden on the planet and thus on the people living there.

Introduction

In general, the composition of wastes from the food industries is heterogeneous. Above all, the type of the raw materials used in particular food industries determines the composition of the waste generated. Their production is often inevitable and their amount increases with the industry development. According to The World Bank 2.01 billion tonnes of municipal solid waste are generated annually worldwide [1]. Approximately 33% of the produced wastes are not managed, and about 0.74 kg of wastes per day are generated per capita. There are vivid opinions that the type and amount of waste, mainly organic residues of processed raw materials will remain unchanged if the quality of the final product is not changed. By-product management and waste disposal in the food industry pose problems in terms of sustainability and environmental protection [2].

In order to i.a. facilitate statistical processing and harmonization of data, the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) has introduced two distinct concepts: Food Loss and Food Waste. Losses cover the goods as a whole (including inedible parts) and occur during processing, storage and transport. Wastes are formed at the stages from the retail sale to the consumption. Nevertheless, in the current article, the authors use the term "waste" in the context of waste products from the industry. Growing attention to waste and loss of food was reflected in SDGs—Sustainable Development Goals. The SDGs call for reducing food losses along production and supply chains by 2030. This blueprint also opts for halving global per capita food waste at the retail and consumer levels [3].

It can be assumed that the problem of managing human-made waste will be aggravated. Scientists from the area of food technology, among others, are constantly trying to apply alternative methods of waste management. One of the strategies is using inexpensive substrates in microorganism cultivations. This is one of the methods to reduce production costs of microbiological metabolites [4]. Hydrophobic industrial wastes are mainly a carbon source for cells. There is widespread confidence that yeasts utilize lipids from the substrate for energy purposes via the fatty acid β -oxidation process [5]. Waste disposal with the simultaneous synthesis of added value products is a double benefit of this approach. Moreover, thanks to the use of cheap substrates such as waste from the food industry and the use of factor design

approach, microbiological production of enzymes and other metabolites can be an economically viable process [4].

Yarrowia lipolytica—A Non-Conventional Yeast Species that Degrades Hydrophobic Substrates

Yarrowia lipolytica is an aerobic, non-pathogenic fungus, capable of effectively degrading hydrophobic substrates and thus many industrial and environmental applications of this organism were discussed in the literature [6]. *Yarrowia lipolytica* strains are part of the microflora of many food products and have been isolated from dairy products e.g. yoghurt, Rokpol and Camembert cheeses [7, 8], meat, dry fermented sausages, fish, soy sauce [9, 10], shrimp salad [11], poultry [12] and various environments with a high content of hydrocarbons or fats, for example oil-polluted soil, rancid margarine and sea water [13]. Food and Drug Administration has given the processes based on the yeast the GRAS status ("generally recognized as safe"). The majority of research regarding *Y. lipolytica* report that this species is non-pathogenic. In spite of that, the yeast can cause infections in critically ill and immunocompromised patients—like other fungal species. *Yarrowia lipolytica* demonstrate features that help them in invasion of the host cell, they produce hydrolytic enzymes, as well as biofilm allows them to protect their own cells [14].

Yarrowia lipolytica yeasts are classified as dimorphic species. Cells are capable of taking various forms, from those with a typical spherical shape to the form of pseudo-fungus, and even take the form characteristic of the septic mycelium [15, 16].

This yeast species have a high tolerance for low temperatures and the high salinity. They are also capable of growing in a wide range of pH. Due to their ability to produce extracellular proteolytic and lipolytic enzymes, proteins and lipids may be degraded [17]. *Yarrowia lipolytica* cells were present also in hypersaline and marine or oil-polluted environments [11]. Both the physiological and biochemical properties of *Y. lipolytica* yeasts, including high secretion capacity are the main reason for their wide use in biotechnological sciences [18] in processes such as biodegradation, biosynthesis or biotransformation of various organic compounds. At the turn of the last years *Y. lipolytica* yeasts could be found in a number of new applications. Some perspective processes have been developed to obtain a variety of products through biosynthesis with these microorganisms including erythritol, aromatic compounds e.g. γ -decalactone [19], carotenoids—e.g. β -carotene [20], organic acids— α -ketoglutaric, succinic, citric and pyruvic acids [21], lipases—enzymes used in food production, for water purification or as an ingredient in detergents [22], SCP (Single Cell Protein)—proteins of

microbiological origin that can be used as feed additives [23], SCO (Single Cell Oil)—microbiological oil which is a source of essential unsaturated fatty acids (EFA) with valuable properties for both humans and farm animals [5, 24].

The *Y. lipolytica* cells deal with the lipid components present in the medium by synthesis of lipolytic enzymes, which catalyze the hydrolysis of lipids to free fatty acids and glycerol molecules [25]. Moreover, lipid dissolving surfactants are excreted [6], as well as other additional cofactors for the removal of reactive oxygen species, which are formed by the process of β -oxidation of fatty acids [26, 27]. It was found that the microorganisms' cells form biofilms what increases the chance of cell survival in lipid rich environment [28, 29].

Among the various types of microorganisms next to microalgae, bacteria, moulds and yeasts, the latter has been subject of many studies due to their capability to grow on media with different types of waste generated from agricultural or industrial processes [10]. Yeast species *Y. lipolytica* produce a set of various metabolites when cultivated in the presence of various low-value carbon sources e.g. organic acids, enzymes (e.g. lipases and esterases [30], phosphatases [31], asparaginases [32], laccases [33], inulinase [34], mannosidase [35], single-cell proteins [36] and single-cell oils [37]. Furthermore, *Y. lipolytica* is oleaginous yeast species able to accumulate significant amounts of lipids in biomass and is considered to be an outstanding producer of lipids and has repeatedly been used as a model microorganism for fatty acid metabolism and lipid biosynthesis by ex novo route

[38, 39], which is characterized by incorporation of intermediates or final products of β -oxidation into triacylglycerol molecules accumulated in the lipid bodies of yeast cells [24].

Yarrowia lipolytica in Wastewaters Treatment

Yarrowia lipolytica effectively degrades hydrophobic substrates and can therefore be successfully used to purify palm oil mill effluents (POME) and olive mill wastewater (OMW) [4]. OMW is the wastewater remaining after the olive oil pressing process [40] containing sugars, polyalcohols, polyphenols, tannins, lipids and pectins. These compounds cause high chemical oxygen demand (COD) of waste [41]. Oleaginous yeast species *C. rugosa*, *C. cylindracea* and *Y. lipolytica* produced biomass and other products such as organic acids or enzymes by consuming organic components from substrates with OMW [40, 41]. Lanciotti et al. [42] analyzed the potential of different strains of *Y. lipolytica* for growth in OMW media and the ability of yeast to reduce COD values (Table 1). Depending on the composition of the culture medium, it was possible to synthesize lipases of different specificity. Additionally, other strains, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50,682 and W29, showed extracellular lipase production in culture media with OMW and there was presented that surfactant Tween 80 enhanced COD decreasing and cell growth. However, Tween 80 had a negative effect on lipase activity [43].

Table 1 COD reduction [%] as a result of application *Y. lipolytica* yeast in various wastes treatment

Strain	Type of waste	COD reduction [%]	Other influencing factors	Other applications	Reference
62 different strains	OMW	1.47–41	–	Lipases, citric acid	[42]
ATCC 20,255	OMW	80	–	SCP, lipases	[104]
ATCC 9773	the dairy wastewater	37.93; 43.07	–	Lipases	[131]
ATCC 9773	the dairy waste	44.3	–	–	[55]
CBS 2073	OMW	22–52	Type of OMW	Lipases	[40]
CECT 1240	WCO	90	–	Lipases	[98]
CLIB 40	TWPW	75	Dilution (75:25)	SCP, SCO	[84]
		66	Crude waste		
IMUFRJ 50,682	OMW	23–62	Type of OMW	Lipases	[40]
IMUFRJ 50,682	OMW	80	12 g/l ammonium sulphate	Lipases	[43]
		75	6 g/l ammonium sulphate		
TISTR 5151	POME	72.9	Twofold diluted effluent	Lipases, SCO	[46]
		64.2–93.4	Non diluted effluent, pH 4.3–6.0		
W29	oil wastewater	67	Non-immobilized cells	–	[44]
		82	Immobilized cells in calcium alginate		
W29	OMW	22–52	Type of OMW	Lipases	[40]
W29	OMW	61	6 g/l ammonium sulphate	Lipases	[43]
		79	12 g/l ammonium sulphate		
		74	6 g/l ammonium sulphate, Tween 80		

OMW olive mill water, POME palm oil mill effluent, TWPW tuna wash processing wastewater, WCO waste cooking oil

The ability of *Y. lipolytica* strain to degrade grease and salad oil from food wastewater has been investigated by Wu et al. [44]. *Yarrowia lipolytica* was able to use salad oil as the only source of energy, carbon and nitrogen when the concentration did not exceed 3 g/l. Comparison of COD reduce and oil removal efficiencies by either immobilized or free cells indicated that the efficiency of removal of COD and oil by free cells was 66.95% and 93.3% respectively and by immobilized cells was 82.22% and 88.2% respectively. Moreover, immobilized cells saved physiological stability at the 12th reaction and the carrier had enough space to support cell growth. Three strains of *Y. lipolytica* yeasts have been tested for their potential for OMW remediation and bioproduct production. The treatment resulted in significant decoloration (63%) of the lipid substrate. The largest amount of citric acid (18.9 g/l) among the other strains was produced by ACA-YC 5033 strain after 144 h incubation in glucose medium with OMW with limited availability to nitrogen. However, the most efficient production of lipids (34%) was observed in the case of W29 strain after 48 h cultivation in the same medium. On the basis of the analysis of the fatty acids profile it was found that all strains in the OMW environment produced higher contents of oleic acid [45].

The study of Louhasakul et al. [46] aimed to utilization and valorization of POME into lipid and lipase by *Y. lipolytica*. From five strains cultivated in twofold diluted effluent, TISTR 5151 was selected, which proved to be the most promising strain in lipase and lipid production. All of the tested strains showed good growth on POME and at least 33% lipid production. In the case of *Y. lipolytica* TISTR 5151 the highest lipases production 610 U/l was recorded after 48 h of cultivation. After the same cultivation period the lipolytic activity of the remaining strains was much lower (61–245 U/l). When TISTR 5151 strain was cultured in undiluted effluent, at pH 5.0, lipase production reached 4081 U/l. However, raising the pH value to 6.0 decreased lipolytic activity to 534 U/l. The authors emphasized the potential of *Y. lipolytica* yeast in waste management and transesterification processes, which can contribute to environmentally friendly and economic biodiesel production. Biological reactions using a lipase catalyst is a green technology easier to perform than the chemical reaction. An additional advantage is the shorter purification step of final products. Yeast *Y. lipolytica* has been described as a species that allows obtaining satisfactory results in the production of both lipases and lipids [47–49].

In the research of Gao et al. [50] the supernatant from the anaerobic digestion of food waste was used as a substrate for the production of microbiological oils by *Y. lipolytica*. The food waste came from the solid waste treatment plant (Dongcun, Beijing), which collects waste from local restaurants. As shown in the study, the biomass concentration was similar for synthetic VFAs (volatile fatty acids) and VFAs

from fermented food waste (DCW ranged 1.667–2.029 g/l). However, batch cultures in medium with fermented food, resulted in lower lipid content (from 16.3 to 18.5%) than these on synthetic VFAs. Gao et al. [51] used fermented food waste in their research. The wastes came from the restaurants in Beijing. What is more, the authors studied the effect of alkaline growing conditions on biomass yield and lipid production. The use of fermented food waste with an initial pH of 6, contributed to 48–72 lag phase and delayed growth of *Y. lipolytica* CICC 31,596. When the initial pH of the waste was increased to 7 and 8, growth was recorded with almost no lag phase. Production of lipids also improved significantly. As the results showed, at pH 6, the lipid content was 14.78%. However, in the case of cultivation under the alkaline condition in medium with fermented food waste reached a lipid content of 21.86%. In summary, an initial pH of 8 has been determined as the optimal for the conversion of high-content VFAs to microbial lipids by *Y. lipolytica* yeast.

A study was performed in which *C. curvatus* ATCC 20,509, *R. glutinis* ATCC 204,091, *Y. lipolytica* ATCC 20,460 were selected from well-known oleogenic yeast as showing good growth in YPG culture medium, in which food waste hydrolyzed broth was used instead of water. Food waste came from the cafeteria at Washington State University and was hydrolyzed with 3% (v/v) sulfuric acid and then the separated liquid phase was used in the medium. *Yarrowia lipolytica* produced more biomass when the substrate with food waste hydrolysate was used, but at this stage the lipid content in cells was not analysed. Nevertheless, the authors indicated these species as promising in the production of microbial oil and capable of growing in food waste. In the same paper, the authors describe the incubation of yeast in municipal wastewater used as water in the medium. When the substrate based on wastewater was supplemented with carbon and nitrogen sources, the biomass production by *Y. lipolytica* was 15.3 g/l. However, it was the lowest result compared to the other two strains. It was also checked whether municipal wastewater can be used as the only feedstock for the cultivation of oleogenic yeast. The selected strains were inoculated into wastewater without addition any nutrient supplementation. As it turned out, the wastewater environment was harmful to the yeast. The initial biomass (0.36 g/l) was higher than the final biomass (0.25 g/l), which contained low lipid content (11.5%). As a result of treatment of municipal wastewater, *Y. lipolytica* decreased phosphorus content by 92% and nitrogen content by 31%. In the experiment sterile and non-sterile cultures were conducted. In the sterile environment, COD has practically not been reduced. In case of non-sterile cultures, COD was reduced by 65%, which may be explained by the activity of bacteria present in the environment [52].

Johnravindar et al. [53] evaluated the efficiency of microbial oil production by selected oleogenic yeasts

Rhodotorula glutinis DSM 10,134, *Cryptococcus curvatus* DSM 70,022 and *Y. lipolytica* DSM 8218 using three types of food waste leachates as cultivation medium. One of the biological treatment methods taking into account dry anaerobic digesters were used to pretreat the leachates. Before inoculation of the yeast, the leachate was diluted to a desired carbon content of 25 g/l. For all tested yeast strains a satisfactory total VFAs removal was recorded. However, *Y. lipolytica* proved to be the most effective in removing VFAs and alcohols from the waste substrate in the range 72.28% to 94.71%. Just behind this strain was *C. curvatus* 67.14–73.93% and *R. glutinis* 30.14–90.25% with slightly worse results. *Yarrowia lipolytica* strain also showed the highest ability to accumulate lipids compared to other yeasts, reaching 48% of lipids in total biomass. The results prompted the authors of the study to define three strains as potential tools for the treatment of leachate from food waste under anaerobic conditions or other wastewater streams rich in VFAs [53].

Li et al. [54] used mixed food waste hydrolysate as a substrate. As described, *Y. lipolytica* PSA3.0 managed to produce succinic acid with a yield of 18.9 g/l with initial glucose concentrations 75.0 g/l and pH of 3.0. The experiment was conducted with the use of in situ fibrous bed bioreactor. When the authors used a glucose-based substrate, they obtained 19.3 g/l succinic acid. The results of the analyses prove the possibility of using cheap waste streams to produce the said acid [54].

Yarrowia lipolytica can not only use the waste to grow and produce valuable metabolites, but also contribute to reducing the BOD (biochemical oxygen demand) of such a waste. Dunoyer et al. [55] made some intriguing observations, when fatty effluent from dairy industry with high BOD, COD and high fat and dry matter content was treated by crude enzymatic extract (CEE) from *Y. lipolytica* ATCC 9773 cultivation. The strain decreased the lipid content in the waste by 82.88% and reduced the levels of BOD₅ until reaching the values of 43.32% respectively. In another study Mendoza et al. [56] also used crude enzyme extract of *Y. lipolytica* ATCC 9773 yeast. The authors concentrated on the evaluation of lipolytic activity of the selected strain, which could improve the process of utilization of wastewater from the dairy industry using two breeding strategies (pH 5 and 6.5). Both pH treatments were economically viable, practical and most importantly effective. When using an environment with a pH of 5, the removal of oils and fats was recorded at a level of 83%. Apart from pH, the lipolytic capacity of CEE was also influenced by the used inoculum concentration of 8%, 12%, 16%. Maximum lipolytic activity was reached in 32 h of cultivation at 27 °C with an inoculum concentration of 16%, for pH 5. According to the removal percentage COD and BOD as parameters that prove the effectiveness of treatment. The best results

correspond to: inoculum concentration 16%, pH: 5 (BOD removal—43.07%) and inoculum concentration 8%, pH: 6.5 (BOD removal—37.93%) [55].

Animal-Based Wastes Utilization by *Yarrowia lipolytica*

At the turn of the last decades, there has been a rapid increase in livestock production, particularly in the developing world. The increase in production comes mainly from industrial farms concentrated around major urban centers. Such a large territorial accumulation of both animals and animal waste close to dense clusters of the human population often causes significant pollution problems. Therefore, there is a need for an effective policy to regulate intensive livestock operations and to support economically and environmentally sustainable management of the waste generated [57]. The global agri-food market wastes many by-products and residues, contributing to the depletion of resources such as cereals. Approximately one third of global cereal production is used for livestock farming. The key to agro-ecological transformation is an integrated approach, which can be achieved, among other things, by recovering energy and nutrients from animal waste [58].

Over the past 35 years, the use of *Y. lipolytica* yeast for the management of animal fats and other animal waste has been discussed many times. Brabender et al. [59] showed that *Y. lipolytica* PO1f is capable of using urea as a source of nitrogen. It is noteworthy that with an ammonium sulphate concentration equivalent to urea nitrogen, cell growth was inhibited. This indicates the strain's potential for growth in nitrogen-rich animal waste.

A lot of research works concern the production of intracellular lipids by *Y. lipolytica*. Used animal fats are of particular interest, because the valorisation of the waste has considerable economic potential with low market value of the substrate [60]. Table 2 presents fatty acid composition of different animal fats or microbial oils produced by selected *Y. lipolytica* strains in the cultures with these waste lipids. Their nutritional values were calculated based on the methodology described by Ratusz et al. [61]: (a) Calculated Oxidizability Value (COX) connected with unsaturated fatty acids content in oils and is associated with oil's tendency to undergo oxidation; (b) Atherogenicity Index (AI) relating to the ratio of pro- and anti-atherogenic fatty acids; (c) Thrombogenicity Index (TI) related with the ratio of pro- and anti-thrombogenic fatty acids; and (d) Ratio of Hypocholesterolemic to Hypercholesterolemic Fatty acids (HH). The three latter indexes should be considered in determining the nutritional properties of oils, because consumption of oils with low AI and TI, and higher HH value is a reduction factor of incidence risk of cardiovascular diseases.

Table 2 Fatty acid compositions of different initial animal fats and mixtures or single-cell oils produced by selected *Y. lipolytica* strains with a comparison of their nutritional values

Animal fat or microbial oil samples	Additional information	Fatty acid composition [%]								Nutritional values					Reference	
		C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA ¹	MUFA ²	PUFA ³	COX ⁴	AI ⁵	TI ⁶		HH ⁷
Stearin ⁹	–	ND	ND	25.0	52.0	2.0	T ¹¹	ND	77.0	2.0	0.0	0.02	12.50	77.00	0.08	[36]
<i>Y. lipolytica</i> LGAM	Changes in the fatty acid profile during culture [h]	ND	ND	22.0	52.0	7.0	ND	ND	74.0	7.0	0.0	0.07	3.14	21.14	0.32	
<i>S(7)1</i> microbial oil	21.5	ND	ND	17.0	68.0	3.0	ND	ND	85.0	3.0	0.0	0.03	5.67	56.67	0.18	
	38.5	ND	ND	16.0	79.0	1.0	ND	ND	95.0	1.0	0.0	0.01	16.00	190.00	0.06	
	62.5	ND	ND	18.0	77.0	1.0	ND	ND	95.0	1.0	0.0	0.01	18.00	190.00	0.06	
	72	ND	ND	13.0	78.0	1.0	ND	ND	91.0	1.0	0.0	0.01	13.00	182.00	0.08	
	84.5	ND	ND	13.0	83.0	3.0	ND	ND	96.0	3.0	0.0	0.03	4.33	64.00	0.23	
	108	ND	ND	14.0	80.0	3.0	ND	ND	94.0	3.0	0.0	0.03	4.67	62.67	0.21	
	116	ND	ND	13.0	78.0	2.0	ND	ND	91.0	2.0	0.0	0.02	6.50	91.00	0.15	
HORO ¹⁰ /Stearin 25/75 –		ND	ND	19.0	41.0	19.0	4.0	ND	60.0	19.0	4.0	0.60	0.83	5.22	1.21	
<i>Y. lipolytica</i> LGAM		ND	ND	17.0	63.0	12.0	4.0	ND	80.0	12.0	4.0	0.53	1.06	10.00	0.94	
<i>S(7)1</i> microbial oil		ND	ND	15.0	26.0	38.0	10.0	ND	41.0	38.0	10.0	1.41	0.31	1.71	3.20	
HORO/Stearin 50/50 –		ND	ND	12.0	64.0	18.0	3.0	ND	76.0	18.0	3.0	0.49	0.57	7.24	1.75	
<i>Y. lipolytica</i> LGAM		ND	ND	12.0	15.0	55.0	11.0	ND	27.0	55.0	11.0	1.68	0.18	0.82	5.50	
HORO/Stearin 75/25 –		ND	ND	11.0	32.0	40.0	9.0	ND	43.0	40.0	9.0	1.33	0.22	1.76	4.45	
<i>Y. lipolytica</i> LGAM		ND	ND	25.0	52.0	2.0	T	ND	77.0	2.0	0.0	0.02	12.5	77.00	0.08	[68]
Stearin	–	ND	ND	14.5	71.5	7.0	2.0	ND	86.0	7.0	2.0	0.28	1.61	19.11	0.62	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC	Changes in the fatty acid profile during culture [h]	ND	ND	15.5	72.0	6.5	2.5	ND	87.5	6.5	2.5	0.32	1.72	19.44	0.58	
50,109 microbial oil	89	ND	ND	16.0	73.0	6.0	2.0	ND	89.0	6.0	2.0	0.27	2.00	22.25	0.50	
	112.5	ND	ND	16.0	72.0	5.0	1.5	ND	88.0	5.0	1.5	0.20	2.46	27.08	0.41	
	113	ND	ND	17.0	76.0	4.5	1.0	ND	93.0	4.5	1.0	0.15	3.09	33.82	0.32	
	140	7.0	7.0	20.1	37.7	22.2	4.5	1.5	71.8	22.2	6.0	1.01	1.95	3.56	1.04	[71]
HORO/Stearin 30/70 –		ND	ND	18.1	77.8	4.1	ND	ND	95.9	4.1	0.0	0.04	4.41	46.78	0.23	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC	Changes in the fatty acid profile during culture [h]	ND	ND	21.1	67.5	7.7	1.1	ND	91.2	7.7	1.1	0.19	3.20	20.48	0.39	
50,109 microbial oil	40 h maximum accumulated lipids	1.5	1.5	6.2	32.5	29.4	7.1	2.5	61.0	29.4	9.6	1.57	1.21	2.10	1.74	
		6.1	6.1	12.5	77.5	5.5	0.5	ND	90.5	5.5	0.5	0.11	2.17	30.00	0.48	
HORO/Stearin 40/60 –		ND	ND	16.2	69.2	11.6	2.0	ND	86.4	11.6	2.0	0.32	1.26	12.56	0.84	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC	Changes in the fatty acid profile during culture [h]	ND	ND	13.1	22.1	44.2	9.0	4.5	42.3	44.2	13.5	2.34	0.51	0.94	3.58	
50,109 microbial oil	40 maximum accumulated lipids	4.1	3.0	13.4	75.8	9.3	1.5	ND	89.2	9.3	1.5	0.25	1.24	16.52	0.81	
		ND	ND	15.6	57.8	22.6	3.5	0.5	73.9	22.6	4.0	0.69	0.61	5.00	1.71	
HORO/Stearin 60/40	Changes in the fatty acid profile during culture [h]	ND	ND	15.6	57.8	22.6	3.5	0.5	73.9	22.6	4.0	0.69	0.61	5.00	1.71	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC	Changes in the fatty acid profile during culture [h]	ND	ND	15.6	57.8	22.6	3.5	0.5	73.9	22.6	4.0	0.69	0.61	5.00	1.71	
50,109 microbial oil	40 maximum accumulated lipids	ND	ND	15.6	57.8	22.6	3.5	0.5	73.9	22.6	4.0	0.69	0.61	5.00	1.71	

Table 2 (continued)

Animal fat or microbial oil samples		Additional information	Fatty acid composition [%]										Nutritional values					Reference
			C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA ¹	MUFA ²	PUFA ³	COX ⁴	AI ⁵	TI ⁶	HH ⁷		
Stearin	–		ND	ND	25.0	52.0	2.0	T	ND	77.0	2.0	0.0	0.02	12.50	77.00	0.08	[132]	
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50,109 microbial oil	Stearin: glycerol initial 10:10		ND	ND	15.0	76.0	5.0	2.0	ND	91.0	5.0	2.0	0.26	2.14	26.00	0.47		
	concentrations [g/L: 13:10		ND	ND	15.0	70.0	6.0	2.0	ND	85.0	6.0	2.0	0.27	1.88	21.25	0.53		
	g/l] 10:11		ND	ND	15.5	72.5	5.0	1.5	ND	88.0	5.0	1.5	0.20	2.38	27.08	0.42		
	10:23		ND	ND	16.0	67.5	6.5	2.0	ND	83.5	6.5	2.0	0.27	1.88	19.65	0.53		
	10:34		ND	ND	14.0	67.0	9.5	2.5	ND	81.0	9.5	2.5	0.35	1.17	13.50	0.86		
	7:28		ND	ND	20.0	50.0	16.5	6.5	ND	70.0	16.5	6.5	0.83	0.87	6.09	1.15		
	Stearin: glucose initial 10:10		ND	ND	20.0	47.5	18.5	6.5	ND	67.5	18.5	6.5	0.85	0.80	5.40	1.25		
	concentrations [g/L: 10:21		ND	ND	16.5	66.0	8.5	3.0	ND	82.5	8.5	3.0	0.39	1.43	14.35	0.70		
	g/l] 10:34		ND	ND	14.0	67.0	8.5	2.5	ND	81.0	8.5	2.5	0.34	1.27	14.73	0.79		
	7:24		ND	ND	22.0	45.0	17.0	6.5	ND	67.0	17.0	6.5	0.84	0.94	5.70	1.07		
<i>Y. lipolytica</i> LGAM S(7)1 microbial oil	7:8:7		ND	ND	22.0	42.5	17.0	6.0	ND	64.5	17.0	6.0	0.79	0.96	5.61	1.05		
	Stearin: glycerol: glucose initial concentrations [g/L: 7:11:7		ND	ND	19.0	48.5	15.5	5.5	ND	67.5	15.5	5.5	0.72	0.90	6.43	1.11		
	–		ND	ND	25.0	52.0	2.0	T	ND	77.0	2.0	0.0	0.02	12.50	77.00	0.08	[69]	
	Stearin: glucose initial concentrations [g/L: 10.5: 20.5 (72)		ND	ND	14.7	68.1	6.9	2.5	ND	82.8	6.9	2.5	0.33	1.56	17.62	0.64		
	g/L] (Culture time [h]) 10.5: 20.5 (140)		ND	ND	16.5	67.9	10.8	3.9	ND	84.4	10.8	3.9	0.51	1.12	11.48	0.89		
	8.5: 28.5 (71)		ND	ND	17.1	55.6	17.6	7.6	ND	72.7	17.6	7.6	0.96	0.68	5.77	1.47		
	8.5: 28.5 (160)		ND	ND	18.9	62.2	14.9	2.2	ND	81.1	14.9	2.2	0.38	1.11	9.49	0.90		
	10.5: 34.5 (46)		ND	ND	15.4	68.3	7.6	2.9	ND	83.7	7.6	2.9	0.37	1.47	15.94	0.68		
	10.5: 34.5 (140)		ND	ND	17.5	66.0	10.9	3.4	ND	83.5	10.9	3.4	0.46	1.22	11.68	0.82		
	7.1: 23.5 (66)		ND	ND	22.5	47.1	18.2	8.9	ND	69.6	18.2	8.9	1.10	0.83	5.14	1.20		
7.1: 23.5 (138)		ND	ND	23.1	50.1	11.5	3.6	ND	73.2	11.5	3.6	0.49	1.53	9.70	0.65			

Table 2 (continued)

Pork lard	–	ND	ND	28.2	13.1	40.3	19.1	ND	41.3	40.3	19.1	2.37	0.47	1.39	2.11	[72]
<i>Y. lipolytica</i> W29	Taguchi method used in flask cultures of <i>Y. lipolytica</i> W29 to compare 4 factors (pH, lard concentration, arabic gum concentration and oxygen transfer rate) in lard utilization	ND	ND	34.9	11.9	43.3	9.9	ND	46.8	43.3	9.9	1.45	0.66	1.76	1.52	
microbial oil		ND	ND	48.4	6.4	42.3	2.8	ND	54.8	42.3	2.8	0.71	1.07	2.43	0.93	
		ND	ND	31.8	2.7	46.4	19.0	ND	34.5	46.4	19.0	2.42	0.49	1.06	2.06	
		ND	ND	35.2	14.7	38.4	11.7	ND	49.9	38.4	11.7	1.59	0.70	1.99	1.42	
		ND	ND	25.2	2.9	53.2	18.7	ND	28.1	53.2	18.7	2.46	0.35	0.78	2.85	
		ND	ND	48.0	5.3	42.8	3.9	ND	53.3	42.8	3.9	0.83	1.03	2.28	0.97	
		ND	ND	35.3	21.0	34.7	9.1	ND	56.3	34.7	9.1	1.28	0.81	2.57	1.24	
		ND	ND	25.2	2.3	50.8	21.6	ND	27.5	50.8	21.6	2.73	0.35	0.76	2.87	
		ND	ND	30.5	1.9	50.8	16.7	ND	32.4	50.8	16.7	2.23	0.45	0.96	2.21	
		ND	ND	22.0	8.0	43.0	27.0	ND	30.0	43.0	27.0	3.21	0.31	0.86	3.18	
Bioreactor batch cultures		ND	ND	21.0	6.0	48.0	25.0	ND	27.0	48.0	25.0	3.06	0.29	0.74	3.48	

1—Saturated Fatty Acids; 2—Monounsaturated Fatty Acids; 3—Polyunsaturated Fatty Acids; 4—Calculated Oxidizability Value, calculated based on Ratusz et al. [61]; 5—Atherogenicity Index, calculated based on Ratusz et al. [61]; 6—Thrombogenicity Index, calculated based on Ratusz et al. [61]; 7—Ratio of Hypocholesterolemic to Hypercholesterolemic Fatty acids, calculated based on Ratusz et al. [61]; 8—Not Detected; 9—An industrial lipid composed of free fatty acids of animal origin produced by alkaline hydrolysis of animal fat; 10—Hydrolyzed oleic rapeseed oil; 11—Traces

The possibility of using animal waste was reported, i.e., by Kamzolova et al. [62]. They determined the growth and production of lipases by *Y. lipolytica* yeast on rendered beef fat. A growth of biomass from 2.5 to 5.3 g/l DCW was shown for culture in medium with 10 g/l of peptone and 10 g/l of animal fat. Citric acid (18 g/l) and isocitric acid (5.2 g/l) were also produced.

Tan and Gill [63] concluded that hydrophobic solid carbon sources are not conducive to the growth of moulds and yeasts. The use of substrates with the addition of solid fats did not show good enough growth, which was explained by insufficient dispersion of the substrate in the liquid medium. The higher the degree of fat saturation, the more fat was left unused by fungi. Nevertheless, in the culture with 2.2 g/l of animal fat addition, 1200 rpm of stirring and temperature of 30 °C yeasts were able to consume almost all of the unsaturated fatty acids of lard, mutton tallow or beef tallow found in the culture media. Similarly, as a result of breeding *Y. lipolytica* in poultry fat, its content in the medium was reduced by an average of 34%, and in the case of beef tallow yeast cells consumed 18% of the lipid carbon source [64]. Chicken feather wastes were also used as a carbon source in intracellular lipids production by five strain of *Y. lipolytica* (NCIM 3229, NCIM 3450, NCIM 3472, NCIM 3589, NCIM 3590). Lipid yield coefficients ranged 0.03–0.06 g/g and these values were definitely lower than those obtained in the cultures with waste cooking oil or waste motor oil [65]. Besides, *Y. lipolytica* MTCC 9520 was also used by Radha et al. [66, 67] in the synthesis of single-cell oil utilizing slaughterhouse lipid waste, goat tallow, as well as chicken tallow.

Papanikolaou et al. [41, 68–70] and Papanikolaou and Aggelis [71] described the potential of *Y. lipolytica* yeast to grow on stearin (derivative of tallow consisting mainly of saturated fatty acids). Unused tallow and animal fats can become competitive substrates in microbiological industrial processes. Stearin supported the process of efficient biomass production. Yeast cells quickly drew this source of carbon from the culture medium. The use of stearin more abundant in stearic acid (thus more saturated) as a substrate for *Y. lipolytica* strains resulted in the production of significant amounts of biomass and SCO. By comparing the fatty acid compositions of stearin and microbial oils (Table 2), the ease of uptake of stearic acid from the medium compared to other fatty acids could be observed. During the culture, some of the fatty acids were metabolized and the microbial oil composition changed. It can be seen, that nutritional values of microbial oils obtained from stearin were very unfavorable, due to the high content of stearic acid [68]. In the same paper, scientists mixed stearin with HORO (hydrolyzed oleic rapeseed oil) in different ratios and used these mixtures in the culture of *Y. lipolytica* LGAM S(7)1. Similarly, nutritional values were still worse than initial oil, but

one of synthesized oil was characterized by an interesting composition. *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 microbial oil obtained from HORO/Stearin 75/25 mixture was composed of 11% palmitic acid, 32% stearic acid, 40% oleic acid and 9% linoleic acid. The aforementioned oil could find industrial application as a cocoa butter-substitute due to their similar compositions [49, 68].

Changing the culture conditions, the use of an emulsifier and the addition of a second carbon source—industrial glycerol allowed for the formation of microbial oil with increased content of unsaturated acids [69]. It is most likely related to the occurrence of two pathways of intracellular fat biosynthesis simultaneously, i.e. the *ex novo* (from stearin) and *de novo* (from glycerol) pathways. Despite the high content of stearic acid in the microbiological oil extracted during the entire culture (about 70%), the presence of unsaturated acids increases its nutritional value. Extending the culture favors the degradation of storage lipids, mainly unsaturated acids, therefore the calculated indexes also change their values, but are still better than in the initial fat [69].

Papanikolaou et al. [41, 70] focused on the possibility of using mixtures of glycerol and stearin, as well as glucose and stearin and their ternary mixture in various proportions in the synthesis of microbial oil by *Y. lipolytica* ACA-DC 50,109 (LGAM S(7)1). Concentration-dependent and mixture ratio-dependent effects were observed. Similarly to the above-cited papers addition of second non-lipid carbon source increased the unsaturated fatty acids content in microbial oils. In the case of glycerol addition, it looked like it should be necessary to present in the culture medium for increasing the unsaturation of microbial oil. For glucose, its concentration is crucial, because increasing its amount also increases the quantity of stearic acid.

Lopes et al. [72] used statistical methods for simultaneous optimization of 4 factors, i.e. pH of the culture, lard concentration, arabic gum concentration and oxygen transfer rate in the utilization of lard in flask cultures of *Y. lipolytica* W29. Taguchi method with orthogonal arrays was applied and 4 factors in three level were compared in nine designed experiments. Oxygen transfer rate was the most influential parameter in the culture. Experiment no. 8, where a pH of 7.2, 50 g/l of lard, 5 g/l of arabic gum and 192 mg/l/h were used, turned out to be the best attempt, where the highest microbial lipid content (57.9%) and cell density (8.6 g/l) were achieved. Modification of initial lard composition was observed in all experiments, and again in the experiment no. 8 the most valuable fatty acid composition was obtained, and microbial oil consisted of 25.2% palmitic acid, 2.3% stearic acid, 50.8% oleic acid and 21.6% linoleic acid. Nutritional value of obtained oil significantly increased compared to initial animal fat and atherogenicity index, thrombogenicity index and the ratio of hypocholesterolemic to hypercholesterolemic fatty acids were 0.35, 0.76, 2.87, respectively,

which can indicate their usefulness in the food technology and industry. Furthermore, the simultaneous production of lipase and citric acid was also observed.

As can be seen, animal waste can be used in many ways in oleaginous yeast cultures. There is a clear trend in the use of animal fats for the production of microbial oils, as well as yeast biomass and other valuable metabolites (organic acids or lipases). Despite the fact that yeasts do a great job of recycling troublesome fatty waste, not all oils obtained are suitable for human consumption but intracellular lipids can be used in other ways, such as the production of substitutes for different vegetable oils, where the sourcing of them can be time-consuming and costly. On the other hand, it is possible to control the culture process in such a way as to obtain the most valuable oil, e.g. for food purposes.

Fish Processing Wastes and Methods of its Utilization

Over the last decades, with globalization expanding, the maritime sector becomes more and more important. The maritime industry already accounts for 90% of international trade [73]. The fish market is regulated because the supply of most fish species depends primarily on catch limits and the potential of the fishing fleet [74]. In 2018, global capture fisheries production reached 96.4 million tonnes, while for the aquaculture production it was 82.1 million tonnes. Over the last few years it was the record result. Maritime economy is not only fishing but also fish processing. On a global scale, live, fresh and chilled fish were the preferred form and also the cheapest available. Frozen fish were the second in order. The interest in preserves, prepared and cured products was lower [3].

Global fish production in 2018 was estimated at 179 million tons, of which nearly 22 were used for non-food purposes, such as fish oil and fishmeal [3]. Fish oil is a source of dietary omega-3 fatty acids, this is why the food industry needs this product for food enrichment. Fishmeal is used on farms as a component of livestock feed and in aquafeed sector, in which is widely used as a supplemental source of protein for culturing fish [75, 76]. Fish meal used as a feed supplement should have a high protein content. Another important parameter is the lipid content, whose low content determines the acceptable quality of fishmeal. Of the 12 strains tested in the Yano et al. [77] study, the researchers selected *Y. lipolytica* NRBC-10073, which was found to be the most effective in reducing lipid content from anchovy mince in solid-state fermentation. Neutral lipids were analyzed using the TLC method. The yeast strain was able to decompose and reduce lipids in the minced anchovy samples as evidenced by the fatty acid bands, which were very small before incubation and after

incubation it was one of the dominant bands. The efficiency of lipid reduction by the yeast strain was affected by the water content of minces, inoculum cell density and ratio of surface area to weight [77]. During β -oxidation, fatty acids are formed as a result of lipid degradation and this process demands a much of oxygen [78]. Importantly, *Y. lipolytica* NRBC-10073 was found to consume protein at an efficiency lower than 1%, although this species is known for its proteolytic activity. Incubating and material conditions were indicated as factors affecting the production of proteases [77].

The progressive development of fish processing contributes to the generation of significant amounts of waste, which poses a challenge to industry and the scientific community in terms of their disposal. Generated by-products could represent up to 70% of initial raw [3]. The ratio of the weight of fish for consumption to the weight of by-products varies according to the season, fishing zone, species or size of fish [79]. The by-products of fishing include backbones, fish fins, belly flaps, gills, liver, head, skin, viscera among others [80]. Due to their rich microflora and endogenous enzymes, they are susceptible to rapid degradation [81].

It has been proven that waste from fish processing can be effectively used for biogas production as the only carbon source due to its lipid content. The experiment used waste from common carp (*Cyprinus carpio*), including fish oil extracted from its viscera. The waste was delivered by a fish processing company from Roca Sales, RS, Brazil [82].

Fat in fish accumulates mainly in muscles, under the skin and in gonads and liver. Fish fat is a source of polyunsaturated fatty acids (PUFA), necessary for the proper functioning of the body. The most common PUFA in fish are omega-3 fatty acids—eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). For example, in herring oil, EPA is 14% and DHA is up to 11% in relation to the sum of all fatty acids in this oil [83].

In another study, Hamimed et al. [84] used *Y. lipolytica* CLIB 40 strain for biological treatment wastewater remaining after the tuna washing process (TWPW). After 7 days yeasts incubation, reduction of 100% phosphorus, 69.8% organic source of carbon, 66% COD and 66% salinity has been noticed. The assessment of the phytotoxicity of analysed wastewater has given promising results. The fenugreek seeds could sprout on the treated and diluted TWPW. The results have shown *Y. lipolytica* is helpful in reducing tuna wash process wastewater toxicity. The discoloration and purification of the waste took place with simultaneous intensive production of biomass *Y. lipolytica* with high protein and lipid content. The treated TWPW was safe for endotrophic bacteria. Endotrophic bacteria are very useful as they participate in activities promoting plant growth [85]. This confirms the possibility of using this kind of processing in agriculture [86].

Moreover, it is stated that post-production wastewater can be an alternative source of water for yeast cultures, which will additionally save precious water consumption. This creates opportunities to use of such type of wastes for microbial culture, in new role. Water use has increased significantly over the last century. Therefore, the search for new water resources is justified [52].

Yeasts capable of accumulating exogenous DHA and EPA fatty acids from crude fish oil were analyzed for use as feed for fish, hens and other animals. Based on the studies of Guo et al. [87], *Y. lipolytica* FO726A was found to be the most efficient strain in the production of EPA and DHA rich biomass. What can be added, FO726A was incapable of synthesizing these unsaturated fatty acids. This shows that all EPA and DHA that were accumulated in the cells came from added fish oil.

Akpınar and Uçar [88] chose three different lipids (olive oil, tributyrin and fish oil) and tested them for the growth of *Y. lipolytica* strains and production of lipolytic enzymes. It was determined that, in this work, all analyzed *Y. lipolytica* strains isolated from different environments produced lipases, but TEM TAN 46 strain proved to be the best producer in fish oil medium. Moreover, all lipid-related substrates supported lipase production, but fish oil (1%) showed maximum specific activity in the supernatant.

Fish oil is undeniably rich in polyunsaturated fatty acids [67]. Fabiszewska et al. [89] made an attempt to manage some selected waste from the fish industry: fish leach, sludge and oily waste from fish smoking process. Oils after smoking were rich in omega 6 (DPA—docosapentaenoic) and omega 3 (EPA, DHA) fatty acids, but also in palmitic, myristic and oleic acids. Although the above mentioned experience was preliminary research, the results definitely indicate the potential of *Y. lipolytica* KKP 379 yeast in fish waste management. The highest biomass yield (13.02 g/dm³) was obtained for cultivation in medium with solid waste (sludge), and the highest extracellular lipase activity was in medium with oil after the fish smoking process.

Various strains of *Y. lipolytica* were analyzed for lipid accumulation as a result of culturing in different local renewable carbon sources. One of them was fish oil, whose 1% addition to the medium resulted in lipid production at the level of 5% for the NCIM 3229 strain to 14% for NCIM 3589 after 72 h of incubation. Microbiological oils from yeast cultivation in a medium with fish oil were characterized by a high content of polyunsaturated fatty acids up to 60% of total fatty acids for strain 3589. In this way, strain 3589 was found to be the most efficient producer of SCO from lipid carbon sources [65].

Zieniuk et al. [19] compared four strains of *Y. lipolytica* in growth and intracellular lipases production in medium containing waste fish oil. Two of them, KKP 379 and W29 were able to grow and produce lipases at a satisfactory level,

and the latter was used in bioreactor culture to obtain whole-cell biocatalyst with lipolytic properties. Approximately 90% of the waste fish oil in the medium was used, and the obtained biomass served as a biocatalyst in the esterification of phenolic compounds with antimicrobial and/or antioxidant activities. Moreover, Fabiszewska et al. [5] provided evidence for high nutritional value of the microbial oil obtained in *Y. lipolytica* KKP 379 yeast culture in waste fish oil medium resulting from the high content of unsaturated fatty acids including DHA and EPA and high polyphenols concentration, what makes the lipid-rich yeast biomass a promising source of beneficial nutrients.

Other post-process fish waste of a lipid nature also requires attention. There has been a search for microorganisms capable of growing and disposing of oil waste, including those from the fishing industry. Bialy et al. [90] isolated a strain *Y. lipolytica* NC-1 yeast showing such skills. The composition of crude and fermented waste oil from frying fish has been analysed. As a result of yeast culture in medium with waste oil, the fatty acid composition of the waste oil has changed. According to Papanikolaou and Aggelis [71] cells preferentially accumulated selected fatty acids. For example, the linoleic acid content has decreased from 48.38 to 18.90% in the waste substrate. The authors have proven that *Y. lipolytica* yeast cells take more oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2) from the medium. However, these preferences depend on the composition of the substrate used.

Waste Cooking Oil as a Substrate in the Biosynthesis of Valuable Metabolites of *Y. lipolytica*

Waste Cooking Oil (WCO) is the waste produced after frying food in vegetable oil (sunflower, palm tree, coconut, rapeseed, olive, etc.). Approximately 1 million tonnes of WCO are produced annually worldwide [91]. The WCO comes from the household, as well as from the catering and hotel industry. Valorization of WCO, also with the use of *Yarrowia lipolytica* yeast, is a sustainable approach to transform processed waste into new valuable products using biotechnological processes [39].

Oil wastes are primarily disposed of in two ways. They are often poured directly into the sink or, better still, collected in containers designed for this type of waste. Both are problematic. The first one causes clogging of the pipelines, the second one is problematic when it comes to storage [90]. In order to reduce costs and thus increase profits, a large part of the oil waste is used again in catering services. These activities are illegal and should be stigmatized [92].

Table 3 presents metabolites which may be produced by different strains of *Y. lipolytica* yeast in media with WCO.

Liu et al. [11] used WCO from containers designed for this type of waste to produce citric acid by the *Y. lipolytica* SWJ-1b yeast. As indicated in the literature, *Y. lipolytica* yeasts are capable of producing organic acids, including citric acid. This acid is a by-product of the synthesis of lipids by de novo in culture media with a source of carbon in the form of glucose as well as ex novo, in the presence of hydrophobic carbon sources [93]. Maximum citric acid production was achieved when nitrogen was added to the medium, which means that the waste oil used was poor in nitrogen and rich in carbon. Moreover, WCO concentration higher than 80 g/dm³ reduced citric acid production efficiency [11]. Moreover, the process of citric acid synthesis by *Y. lipolytica* became an alternative to the process of using *Aspergillus niger* [20].

WCO can find potential use as a substrate ingredient for *Y. lipolytica* in the production of erythritol. Xiaoyan et al. [94] used WCO for microbiological synthesis of this sugar alcohol with *Y. lipolytica* yeast. Commercially, erythritol is produced using glucose obtained by enzymatic hydrolysis of polysaccharides such as starch. It is assumed that by using non-sugar waste streams such as WCO, it is possible to reduce the costs of such a complex procedure as biological glucose production [29]. Liu et al. [95] investigated that erythritol could be also produced from WCO by *Y. lipolytica* under different cultivation conditions. The critical parameters in the process were the substrate pH and osmotic pressure. Under conditions of high osmotic pressure of 2.76 osmol/l and low pH of 3 the high erythritol yield (21.8 g/l) with simultaneous low citric acid production of 2.5 g/l was observed. By contrast, under conditions of low osmotic pressure of 0.75 osmol/l and higher pH of 6, a high level of biosynthesis of citric acid of 12.6 g/l was recorded, while erythritol yield (4.0 g/l) was low [95].

The Pang et al. [96] study is the first report on the development of new and efficient processing of WCO into l-limonene and d-limonene through the use of metabolically developed *Y. lipolytica* strains. The experiment showed that both l-limonene and d-limonene were successfully produced at levels of 2.723 mg/l and 2.514 mg/l under optimal growing conditions, where beside glucose 70% of the added carbon source was WCO.

It has also been proven that the use of WCO as a carbon source favors the synthesis of lipases by *Y. lipolytica*, more than olive oil or pure sunflower oil [91, 94]. Based on these results, it can be assumed that WCOs are alternative to expensive edible oils, namely olive oil, a well-known lipase synthesis activator [22]. However, according to Nunes et al. [97], the use of olive oil provides higher extracellular lipase production than fried soybean oil. In some cases WCO is only treated as an additional source of carbon for *Y. lipolytica* [98, 99]. Interestingly, Nunes et al. [100] used waste soybean frying oil to synthesize cell-wall-associated

Table 3 Metabolites production by different *Y. lipolytica* strains in media with waste cooking oils

<i>Y. lipolytica</i> Strain	WCO origin	WCO concentration in medium [g/l]	Metabolite	Maximum yield	Maximum activity [U/ml]	Additional information	Reference
<i>Y. lipolytica</i> SWJ-1b	The WCO obtained from a waste oil recycle bin in Huaian, Jiangsu Province, China	80	Citric acid Isocitric acid Lipases SCO	31.7 g/l 6.5 g/l – 42.1 g of SCO/100 g of cell dry weight	– – 8.30 –	94.6% WCO utilization by <i>Y. lipolytica</i> SWJ-1b after 336 h in 10 l bioreactor	[11]
<i>Y. lipolytica</i> W29	The WCO collected from a public school canteen	10	Lipases SCO	– 48 g of SCO/100 g of cell dry weight	12.00 –	–	[91]
<i>Y. lipolytica</i> Po1 g KdHR	The WCO collected from a local kitchen	700 (ml/l)	D-Limonene L-Limonene	2.514 mg/l 2.723 mg/l	–	Engineered <i>Y. lipolytica</i> strains (D-limonene synthase from <i>Citrus limon</i> and L-limonene synthase from <i>Mentha spicata</i> with ten homologous genes involved in the mevalonate pathway were overexpressed)	[96]
<i>Y. lipolytica</i> CECT 1240	The WCO collected from a local restaurant	30	Lipases	–	9.27	–	[98]
<i>Y. lipolytica</i> 50.682	Waste soybean frying oil	10	Extracellular Lipases Intracellular Lipases Cell-bound Lipases Extracellular Lipases Released Lipases Cell-bound Lipases	– – – – – –	0.033 1.33 (U/g) 1.30 (U/g) 257.30 204.13 (U/g DCW) 178.78 (U/g DCW)	–	[97]
<i>Y. lipolytica</i> M53	–	30	Lipases Erythritol SCO	– 22.1 g/L 33 g of SCO/100 g of cell dry weight	12.70 – –	–	[94]
<i>Y. lipolytica</i> NCIM 3229	–	10	SCO	45 g of SCO/100 g of cell dry weight	–	–	[65]
<i>Y. lipolytica</i> NCIM 3450	–	–	–	–	–	–	–
<i>Y. lipolytica</i> NCIM 3472	–	–	–	–	–	–	–

Table 3 (continued)

<i>Y. lipolytica</i> Strain	WCO origin	WCO concentration in medium [g/l]	Metabolite	Maximum yield	Maximum activity [U/ml]	Additional information	Reference
<i>Y. lipolytica</i> NCIM 3589				24 g of SCO/100 g of cell dry weight			
<i>Y. lipolytica</i> NCIM 3590				28 g of SCO/100 g of cell dry weight			
<i>Y. lipolytica</i> YIB6	The WCO obtained from a local eatery in Pune, India	100	SCO	55 g of SCO/100 g of cell dry weight	–	Mutants of <i>Y. lipolytica</i> NCIM 3589	[101]
<i>Y. lipolytica</i> YIC7				60 g of SCO/100 g of cell dry weight			
<i>Y. lipolytica</i> YIE1				67 g of SCO/100 g of cell dry weight			
<i>Y. lipolytica</i> NC-I	Waste oil from frying fish	5	SCO	45.49 g of SCO/100 g of cell dry weight	–		[90]
	Waste oil from frying vegetables	5		57.89 g of SCO/100 g of cell dry weight			
<i>Y. lipolytica</i> LFMB 20	Waste butter	8.5	SCO	20 g of SCO/100 g of cell dry weight	–	29.0% WCO utilization after 25 h, 88.0% after 191 h	[102]
	Waste olive oil			24 g of SCO/100 g of cell dry weight		42.6% WCO utilization after 20 h, 90.6% after 220 h	

WCO waste cooking oil, SCO single cell oil

lipases by *Y. lipolytica* and the treatment with acoustic waves was applied for lipases activation and release from the cell wall. According to some scientists, the production of lipases by *Y. lipolytica* yeast is dependent on the WCO concentration used. An increase in concentration from 10 to 50 g/dm³ caused a 3.5-fold improvement in the synthesis [94]. However, the increase to 140 g/dm³ significantly impeded the production of lipases [11]. In the case of *Y. lipolytica* SWJ-1b and *Y. lipolytica* W29 the WCO concentration was not affected and the dose significantly affected enzyme production and the dose of 10 g/dm³ was sufficient to achieve maximum lipase activity [94].

Yarrowia lipolytica is the most frequently studied species for the accumulation of intracellular lipids using WCO as a carbon source [39]. Triacylglycerols as the main component of waste cooking oil are transferred to the cells of microorganisms as a result of extracellular lipases [62]. Selected strains of *Y. lipolytica* yeast were investigated in order to evaluate their potential in biodiesel production, cultivating them on inexpensive waste like WCO. Katre et al. [65] selected two strains NCIM 3479 and NCIM 3589 as effective in using WCO for microbial lipid production. The results of the study showed that NCIM 3479 strain achieved the highest lipid production efficiency (47%) in the medium with 30 g/l WCO. On the other hand, strain 3589 was able to use larger amounts of WCO up to 100 g/l and then achieve a yield of 43%. For this strain there was no inhibitory effect of higher waste doses on growth or lipid production. This indicates that SCO from *Y. lipolytica* 3589 can be considered a potential feedstock for biodiesel production. The fatty acid product of extracted SCO corresponds to international biodiesel standard specifications. Katre et al. [101] generated 800 mutants of NCIM 3589 strain and then also conducted an experiment on ten mutants assessing the biomass yield, lipid content and lipid yield to finally select the three with the highest capacity to produce microbiological lipids (YIB6, YIC7 and YIE1). These strains were able to grow in WCO and accumulated oils with yields of 55, 60 and 67% respectively.

Although the experience of Lopes et al. [91] was conducted under optimal conditions for the production of lipases by *Y. lipolytica* W29 (10 g/l WCO, kLa = 16, 24 h⁻¹ of fermentation), it achieved a satisfactory yield of microbiological oils (48%) rich in unsaturated fatty acids (linoleic and oleic acid). Under these culture conditions the amount of microbial lipids was 3 g/l and it was comparable to the results of other authors research. For example, in the experiment Liu et al. [11], the *Y. lipolytica* SWJ-1b yeast strain achieved a lipid yield of 42% as a result of 336 h of culture in a medium with 80 g/l WCO. The biomass yield reached 5.9 g/l. Interestingly, as a result of the described culture, only 4.3 g/l of waste lipid carbon source remained in the medium. As a consequence, it

suggests that *Y. lipolytica* SWJ-1b yeast cells used as much as 94.6% of WCO present in the culture medium.

Bialy et al. [90] assumed the use of WCO as a substrate for *Y. lipolytica*, but it was not the oil obtained from waste oil recycling bin, in which different types of the waste are stored mixed together. The authors obtained WCO from local entrepreneurs differentiating: WCO from frying fish and WCO from frying vegetables. For WCO from frying fish the biomass yield was 7.40 g/l of substrate and the lipid content was 45.49%, while for WCO from frying vegetables it was 7.56 g/l and 57.59%. As a result of the treatment of lipid waste by *Y. lipolytica*, their fatty acid profiles were changed. The raw WCO remaining after frying consisted of C16:0—17.13% (fermented WCO—22.87%), C18:0—1.12% (5.15%), C18:1—28.76% (35.46%), C18:2—48.38% (18.90%). Raw and fermented WCO after frying vegetables also differed in composition, analogically: C12:0—0.16%, C14:0—0.92%, C16:0—41.88% (19.87%), C18:0—4.42% (5.52%), C18:1—42.38% (50.48%), C18:2—48.38% (16.63%). Fatty acids C12:0 and C14:0 were undetected in WCO from frying vegetables after *Y. lipolytica* treatment. The use of different types of WCO allowed to extend the conclusion about the effect of nitrogen on the effectiveness of microbial oils production. The accumulation of intracellular lipids is supported by excess sugars in the culture medium and low pool of nitrogen compounds. Therefore, when the used oil waste is rich in a source of nitrogen (e.g. nitrogen seeping from fish into frying oil), as a consequence, the overall content of accumulated lipids may decrease [90].

Microbial degradation of waste cooking butter and waste cooking olive oil was carried out by strain *Y. lipolytica* LFMB 20. The distribution of these fats by yeasts indicates their ability to effectively utilize FOGs (fats, oils, greases) present in various types of waste. When *Y. lipolytica* grew in the medium with the addition of waste cooking olive oil, 42.6% (20 h of cultivation) to 90.6% (220 h of cultivation) of the substrate fat was removed. The initial fatty substrate concentration was 8.5 ± 1.5 g/l. In 20 h of cultivation the highest efficiency (24%) of lipid production was achieved. However, after 220 h, apart from the best effect of removing fat from the medium, the highest biomass yield of 8 g/l was obtained. In case of cultivation in medium with waste cooking butter, 29–88% of fat was removed within 25–191 h. The highest biomass yield was achieved after 100 h of yeast cultivation and it was 7.5 g/l. Similarly to olive oil, the highest production of lipids (20%) was achieved in the initial phase of growth, it was 20% in 25 h. Microbiological lipids with changed profile of fatty acids arouse interest in biotechnology, industry and ecology, taking into account simultaneous solution of problems of fatty food waste disposal [102].

Bioremediation and Toxic Contaminants Removal

Yarrowia lipolytica is an exceptional example of yeast species with various biotechnological applications [6]. The yeast has been used i.a. in the bioremediation process, which is a technique using microorganisms to accelerate the degradation of contaminants found in the environment into less toxic form or to reduce the level of these contaminants to acceptable levels [103]. This technique has been used to reclamation of environments contaminated with oils. Oil-pollutions occur in both marine and freshwater environments as well as on land [4]. Moreover, they are the main cause of environmental and ecological damage. Over a decade ago, bioremediation became the main method of wastewater treatment in the oil industry [104]. Many studies have been carried out on the skills of the *Y. lipolytica* yeast species, which could also be used in biotechnological waste disposal processes. Planning the management of waste such as production wastewater must take into account the presence of various toxic compounds (Table 4) such as catechol. This compound has a strong inhibitory effect on the respiratory processes of *Y. lipolytica* yeasts [40]. In spite of this, *Y. lipolytica* NCIM 3589 yeast was able to grow in media with catechol and phenol—bromobenzene degradation products and used them as a source of carbon. The growth of yeast biomass was much higher in catechol, compared to that of phenol. These yeasts tolerated phenol at concentrations of up to 5 mM, and good growth in a catechol environment indicates effective and fast compound utilization. In conditions where phenol and catechol were the only sources of carbon, the authors were unable to detect any activity of dehalogenase—an enzyme catalyzing the reaction of elimination of atoms from the halogen group, e.g. bromine. The dehalogenation reaction precedes the aromatic ring cleavage [105]. *Yarrowia lipolytica* W29 reduced total phenol content in cultivation media with OMW by 70% [40]. There have been also studied that *Y. lipolytica* Y103 strain degraded 4-chlorophenol, component of herbicides and pesticides to catechol [106].

Dil et al. [107] investigated the possibility of using live *Y. lipolytica* 70,562 yeast cells as a biosorbent for waste decoloration. The study focused on the simultaneous biosorption of dyes: Brilliant Green (BG) and Crystal Violet (CV) from wastewater. To assess the impact of parameters such as: contact time (4–20 h), dye concentration (6–14 mg/l) and solution pH (4.0–8.0), as well as to develop a model and optimization of the biosorption process, the response surface method (RSM) was used. Contact time of 16 h, initial BG concentration of 10 mg/l and CV of 8 mg/l under pH 7.0 were indicated as the most

optimal operating parameters. The above mentioned conditions led to a maximum biosorption of 99.927% and 98.823% for BG and CV dyes respectively.

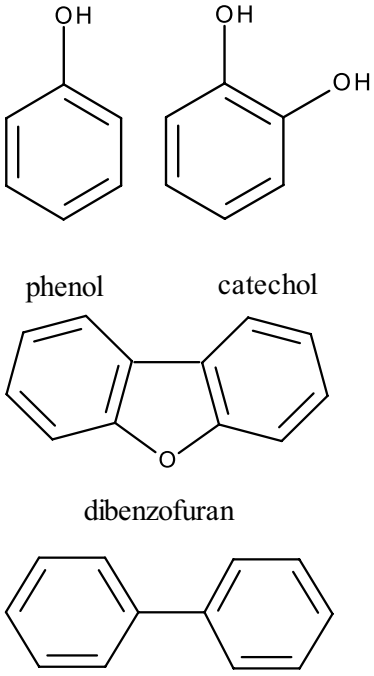
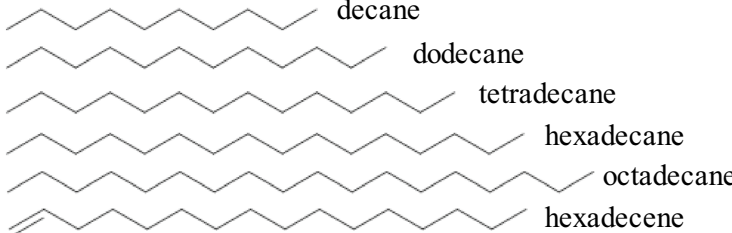
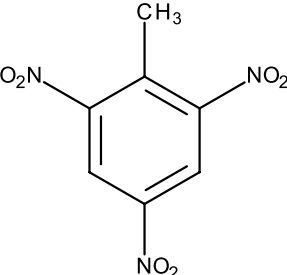
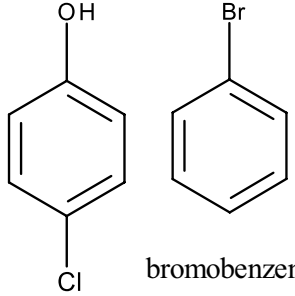
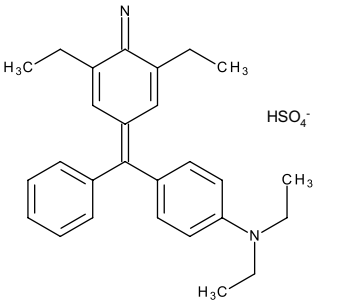
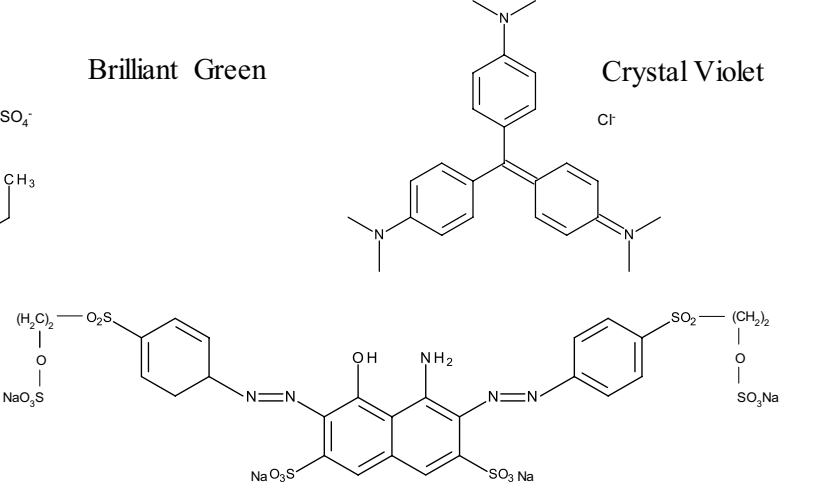
The ability of *Y. lipolytica* NBRC 1658 strain to decolorize Reactive Black 5 by biodegradation was confirmed. This strain discolored 97% of the pigment within 24 h at a concentration of 50 mg/l. The yeast was able to tolerate dye up to 300 mg/l. The whole process of discoloration took place in the exponential growth phase. Aerobic batch culture in medium with glucose (5 g/l), ammonium sulphate (1 g/l) and pH = 7 proved to be the most optimal conditions [108].

Interestingly, Romero et al. [60] proved that strain *Y. lipolytica* LPS605 is able to degrade dibenzofuran. However, they did not use it as a carbon source. Yeast cells oxidized the compound, converting it to less toxic derivatives. Other strains of *Y. lipolytica* were able to hydroxylate phenol and aromatic hydrocarbons, which is a process of reducing the toxicity of these compounds. The same authors have proven that *Y. lipolytica* LPS 605 strain can degrade biphenyl to 4-hydroxybiphenyl, as well as 3,4-dihydroxybiphenyl, which is a hydroxylated product within 24 h [109]. It has been shown that *Y. lipolytica* yeast species can detoxify 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by reducing nitrate groups and aromatic ring [110]. The study of Żogała et al. [111] showed the capacity of *Y. lipolytica* to detoxify petrol contaminated soils. What is more, strains of *Y. lipolytica* have high crude oil degrading activity due to cell hydrophobicity and high emulsifying activity. The strains PG-32 and PG-20 degraded 58 and 68% of crude oil, respectively. They could be used for the bioremediation process and decreasing oil pollution in the marine ecosystem like Persian Gulf [13].

Yarrowia and *Candida* strains when grown on hydrocarbons were able to produce mannosylerythritol lipids, sophorolipids, carbohydrate-protein complexes, carbohydrate-protein-lipid complexes or fatty acids [112–114].

The yeast *Y. lipolytica* has been intensively studied in view of its highly efficient degradation of hydrophobic substrates such as alkanes [13]. Matatkova et al. [115] conducted research to evaluate the ability of *Y. lipolytica* CCY 30-26-36 strain to grow in media containing glucose with odd n-alkanes (pentadecane/heptadecane) or odd alkanes as the only source of carbon. Microbial oil from yeast biomass contained about 80% of unsaturated fatty acids. The authors also analyzed the influence of rhamnolipids on the use of alkanes by yeast cells and their possible influence on the fatty acid profile and lipid yield. For the substrate with glucose and alkanes a higher lipid content was recorded than for the substrate with alkanes as a single carbon source. The use of rhamnolipids resulted in a 15% increase in lipid content for cultures with glucose and alkane and 30% for the medium with alkane only. Other researchers report that the addition of rhamnolipids to the hydrophobic culture medium in *Y. lipolytica* CCY 30-26-36 culture caused dissolution and

Table 4 Summary of chemical compounds which may be degraded by *Yarrowia lipolytica* yeasts

Aromatic compounds	Alkanes and Alkenes	
 phenol catechol dibenzofuran biphenyl	 decane dodecane tetradecane hexadecane octadecane hexadecene	
	Nitroaromatic compounds	Halogenated compounds
	 2,4,6-trinitrotoluene	 4-chlorophenol bromobenzene
Industrial dyes		
 Brilliant Green	 Crystal Violet Reactive Black 5	

formation of a stable emulsion. Rhamnolipids by reducing the hydrophobicity of yeast cells contributed to a reduction in substrate absorption [116].

Yarrowia lipolytica is a dimorphic yeast species. It is considered that the ability of specific yeast transformation may be a key factor for effective degradation of alkanes. After transition from the mycelium to yeast form, strain NCIM 3589 degraded pure alkanes (*n*-decane 40%, *n*-dodecane 40%, tetradecane 50%, hexadecane 60%, octadecane 45%) as well as aliphatic crude oil fractions under aerobic conditions within 24 h. In another study, immobilized in porous agar beads cells of NCIM 3589 strain degraded to 92% of aliphatic fractions of Bombay High crude oil. The cells in free form degraded 78% of aliphatic fractions [117–119].

Fabiszewska et al. [22] reported that dodecane might be used in microbiological production of lipases by *Y. lipolytica* KKP 379. However, the condition that must be fulfilled for the process is the presence of olive oil as an enzyme stimulator. Wei et al. [120] used dodecane in the role of cosolvent. Addition of dodecane to the *C. rugosa* culture resulted in higher lipolytic activity with glycerol trioleate. However, after 3 days of incubation neither growth nor lipolytic activity was noticed. It is claimed that dodecane can be used in two ways, as a carbon source and to solubilize the hydrophobic substrate [22].

***Yarrowia lipolytica* Metabolic Engineering in Treatment Industry Wastes**

Since a long time, wild-type *Yarrowia* strains have been distinguished for the high secretion yield of numerous proteins [121]. The use of *Y. lipolytica* as a host for heterologous expression was initiated, 30 years ago, by the almost simultaneous development of transformation methods by Pfizer Inc. (USA) and a French INRA team [122]. Recently, approaches including metabolic engineering, have been applied to increase potential applicability of *Yarrowia* yeast in waste management. The common target of genetic modifications are the key steps required for *Y. lipolytica* to grow well on low-cost substrates what could have a tremendous impact on the production of industrially relevant compounds (proteins and lipids for food, feed and energy purposes or other biotechnological products such as organic acids, aromas, polyalcohols, emulsifiers and surfactants) potentially reducing the cost of synthesis and making these biotechnological processes more competitive in the market [123]. Usually, the best microbial producers are often unable to bioconvert the cheapest or most convenient substrates and at the same time the substrate costs must be reduced by employing industrial wastes. Synthetic biology and metabolic engineering could be used to modify the best-suited microorganisms to use target substrates [124]. Synthetic review was prepared by

Ledesma-Amaro and Nicaud [124] on metabolic engineering which expanded the substrate range of *Y. lipolytica*. Some newest communications or examples directly related to lipid waste utilization has been reviewed in the chapter emphasizing the possibilities to produce valuable metabolites in waste substrates media via genetic modification approach.

Yarrowia lipolytica is unable to fully use the most abundant and inexpensive carbon source in nature—sucrose and as a consequence hexoses such as glucose and fructose as a product of its hydrolysis. Interesting study was performed by Rakicka et al. [125] who modified the yeast strain *Y. lipolytica* Wratislavia K1 by overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* invertase *SUC2* gene and overexpression of the native glycerol kinase *GUT1* gene. The engineered yeast strain efficiently utilized sucrose and rapidly assimilated glycerol from industrial raw molasses and crude glycerol in order to produce 100.65 ± 3.75 g/l polyols—sugar alcohols and sweeteners [125]. In the work by Yan et al. [126], homologous overexpression of extracellular lipase *LIP2* gene was performed along with the heterologous expression of *S. cerevisiae* invertase *SUC2* gene. Among different low cost agro-industrial substrates (sugarcane molasses, waste cooking oil and crude glycerol from biodiesel production) sugarcane molasses appeared as the most effective substrates for simultaneous production of lipases (16,420 U/ml) and single cell protein (151.2 g/l) as excellent feed additives [126].

Because *Y. lipolytica* is also unable to consume xylose, the major pentose in lignocellulosic hydrolysates, which are low cost carbon sources for bioprocesses and could be used as inexpensive carbon sources in place of glucose, the mutant strain has been engineered to produce lipids and citric acids in media with xylose. The overexpression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from ascomycetous yeast *Scheffersomyces stipitis* and the additional overexpression of the endogenous xylulokinase enabled this mutant to produce up to 80 g/l of citric acid from xylose [123].

Increased interest in sustainable production of renewable diesel and other valuable bioproducts is redoubling efforts to improve economic feasibility of microbial-based oil production. Katre et al. [101] used the chemical mutagenesis strategy to successfully isolate three stable high SCO yielding *Y. lipolytica* mutants. The mutants exhibited an increase in lipid contents when grown on 100 g/l waste cooking oil than the parental yeast strain. The fatty acid methyl ester (FAME) profiles of all three mutants determined the strains to be suitable for biodiesel synthesis along with the management of waste cooking oil [101]. Blazek et al. [127] optimized the oleaginous yeast to create a strain with significant lipid accumulation and lipids conversion into biodiesel. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases isozymes I and II overexpression was reported for their potential in catalysing the ultimate step in triglyceride synthesis [127].

Lindquist et al. [128] irradiated *Y. lipolytica* NRRL YB-567 with UV-C to enhance ammonia (for fertilizer) and lipid (for biodiesel) production in low-cost coffee waste medium. The mutant strain produced 0.12 g/l ammonia and 0.20 g/l 2-phenylethanol, a valuable fragrance, in addition to acylglycerols containing predominantly C16 and C18 residues. This approach revealed that it was possible to provide bioprocess aiming independently two goals.

The overexpression of the genes involved in lipid uptake and degradation may enhance the efficiency of bioconversion of oil-containing wastes into desired products [124]. The simplest way seems to be overexpression of extracellular lipase genes. Furthermore, due to heterogeneity of waste materials, an innovative approach might be constructing of mutant strain able to degrade a wide range of substrates. Another trend could focus on improving metabolite yield, increasing tolerance to metabolites or toxins present in waste substrates what can be expanded in the future.

Conclusion and Future Perspectives

Many publications refer to the use of industrial and agricultural waste to obtain new products with simultaneous valorization of wastes. However, the production of microbiological metabolites is efficient and cost-effective, it is crucial to define the influencing factors, e.g. used waste substrates. Generally, wastes from food processing can be characterized as follows: (1) depending on their origin, they contain high levels of organic compounds: carbohydrates, fats or proteins, (2) differing on chemical oxygen demand (COD) and biochemical oxygen demand (BOD), (3) containing suspended solids [129].

Given the constantly growing population, which contributes to the vastness of food production and the vastness of production processes, the industrial waste produced could place a serious burden on the planet and thus on the people living there. Therefore, the key role of scientists, technologists and entrepreneurs in the development of practical, realistic, pro-environmental techniques for the management of various types of waste, especially oily waste and those associated with animal production is pointed out.

Appropriate selection and characteristics of the waste used are essential. This will allow researchers to assess the real impact on the effectiveness of biotechnological processes. Many different types of waste are available. Bucker et al. [82] pointed out that such analysis is insufficient. The use of waste materials would result in products with higher added value. However, this does not mean that the use of such waste would be economically justified. It is necessary to determine i.a. local availability and transport possibilities. More research is needed on the selection of substrates and microorganisms. It is assessed that the carbon source

used in the production of microbiological oils accounts for up to 60–75% of the total cost. Therefore the use of waste substrates is an interesting option [130].

Yarrowia lipolytica yeast has found a place in environmental applications related to the management of oil waste due to a wide range of different beneficial features such as reduction of chemical oxygen demand and production of different types of added value metabolites. Therefore, as long as oily waste poses a serious hazard to the environment, the development of practical and valuable “green” processing methods is necessary. Apart from the optimization of cultivation parameters, strain selection is an important element of effective microbial detoxification of selected oil waste. Appropriate selection and characteristics of the waste used are essential. This will allow scientists to assess their real impact on the effectiveness of biotechnological processes. However, a deeper analysis is advisable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. https://datatopics.worldbank.org/what-a-aste/trends_in_solid_waste_management.html. Accessed: 23 Feb 2021
2. Jayatilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., Bawa, A.S.: Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**(3), 278–293 (2012). <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>
3. FAO The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action. Rome (2020). <https://doi.org/10.4060/ca9229en> Accessed: 23.02.2021
4. Bankar, A.V., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S.: Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**(5), 847–865 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2156-8>
5. Fabiszewska, A., Zieniuk, B., Kozłowska, M., Mazurczak-Zieniuk, P., Wołoszynowska, M., Misiukiewicz-Stępień, P., Nowak, D.: Studies on upgradation of waste fish oil to lipid-rich yeast biomass in *Yarrowia lipolytica* batch cultures. *Foods* **10**(2), 436–452 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10020436>
6. Gonçalves, F.A.G., Colen, G., Takahashi, J.A.: *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *Sci. World J.* (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
7. Roostita, R., Fleett, G.H.: The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **28**(3), 393–404 (1996). [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00018-6)

8. Szczepaniak, G., Wojtatowicz, M.: Dobór szczepów *Yarrowia lipolytica* i *Debaryomyces hansenii* do szczepionki wspomagającej proces dojrzewania sera. *Żywność Nauka Technologia Jakość* **6**(79), 192–203 (2011)
9. Flores, M., Corral, S., Cano-García, L., Salvador, A., Belloch, C.: Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **212**, 16–24 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>
10. Patsios, S.I., Dedousi, A., Sossidou, E.N., Zdragas, A.: Sustainable animal feed protein through the cultivation of *Yarrowia Lipolytica* on agro-industrial wastes and by-products. *Sustainability* **12**(4), 1398 (2020). <https://doi.org/10.3390/su12041398>
11. Liu, X., Lv, J., Xu, J., Zhang, T., Deng, Y., He, J.: Citric acid production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b yeast when grown on waste cooking oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**(5), 2347–2356 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1430-0>
12. Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R.: Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(10), 4340–4344 (2000). <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4340-4344.2000>
13. Hassanshahian, M., Tebyanian, H., Cappello, S.: Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* **64**(7), 1386–1391 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.04.020>
14. Zieniuk, B., Fabiszewska, A.: *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**(1), 10 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>
15. Barth, G., Gaillardin, C.: Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 219–237 (1997). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
16. Van der Walt J.P., von Arx J.A.: The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Anton. Leeuw.* **46**, 517–521 (1980)
17. Carsamba, E., Papanikolaou, S., Erten, H.: Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38**, 1230–1243 (2013). <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>
18. Liu, H.H., Ji, X.J., Huang, H.: Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1522–1546 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>
19. Zieniuk, B., Wołoszynowska, M., Białecka-Florjańczyk, E., Fabiszewska, A.: Synthesis of industrially useful phenolic compounds esters by means of biocatalysts obtained along with waste fish oil utilization. *Sustainability* **12**(14), 5804 (2020). <https://doi.org/10.3390/su12145804>
20. Krzyczkowska, J., Fabiszewska, A.U.: *Yarrowia lipolytica* – niekonwencjonalne drożdże w biotechnologii. *Postępy Mikrobiologii* **54**, 33–43 (2015)
21. Zinjarde, S.S.: Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem.* **152**, 1–10 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>
22. Fabiszewska, A.U., Stolarzewicz, I.A., Zamojska, W.M., Białecka-Florjańczyk, E.: Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. *Appl. Biochem. Microbiol.* **50**(4), 404–410 (2014). <https://doi.org/10.1134/S000368381404005X>
23. Juszczak, P., Tomaszewska, L., Kita, A., Rymowicz, W.: Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Biores. Technol.* **137**, 124–213 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.010>
24. Fabiszewska, A., Misiukiewicz-Stępień, P., Paplińska-Goryca, M., Zieniuk, B., Białecka-Florjańczyk, E.: An insight into storage lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules* **9**(11), 685 (2019). <https://doi.org/10.3390/biom9110685>
25. Dulermo, T., Nicaud, J.M.: Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* **13**(5), 482–491 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.05.002>
26. Liu, H., Marsafari, M., Deng, L., Xu, P.: Understanding lipogenesis by dynamically profiling transcriptional activity of lipogenic promoters in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**(7), 3167–3179 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09664-8>
27. Xu, P., Qiao, K., Stephanopoulos, G.: Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* **114**(7), 1521–1530 (2017). <https://doi.org/10.1002/bit.26285>
28. Dusane, D.H., Nancharaiyah, Y.V., Venugopalan, V.P., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S.: Biofilm formation by a biotechnologically important tropical marine yeast isolate, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Water Sci. Technol.* **58**, 2467–2475 (2008). <https://doi.org/10.2166/wst.2008.479>
29. Spagnuolo, M., Shabbir Hussain, M., Gambill, L., Blenner, M.: Alternative substrate metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Front. Microbiol.* **9**, 1077 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01077>
30. Fickers, P., Marty, A., Nicaud, J.M.: The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **29**(6), 632–644 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
31. Jolivet, P., Bergeron, E., Benyair, H., Meunier, J.C.: Characterization of major protein phosphatases from selected species of *Kluyveromyces*. Comparison with protein phosphatases from *Yarrowia lipolytica*. *Can. J. Microbiol.* **47**(9), 861–870 (2001). <https://doi.org/10.1139/w01-081>
32. Karanam, S.K., Medicherla, N.R.: Application of Doehlert experimental design for the optimization of medium constituents for the production of L-asparaginase from Palm Kernel cake (*Elaeis guineensis*). *J. Microb. Biochem. Technol.* **2**(1), 1–7 (2010). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000016>
33. Lee, K.M., Kalyani, D., Tiwari, M.K., Kim, T.S., Dhiman, S.S., Lee, J.K., Kim, I.W.: Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biores. Technol.* **123**, 636–645 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.066>
34. Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Wang, L., Li, J., Gong, F.: Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. *Microb. Ecol.* **54**(4), 722–729 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9231-4>
35. Vega, R., Domínguez, A.: Partial characterization of α -mannosidase from *Yarrowia lipolytica*. *J. Basic Microbiol.* **28**(6), 371–379 (1988). <https://doi.org/10.1002/jobm.3620280606>
36. Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I.: Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**(3), 215–224 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1013083211405>
37. Radha, P., Prabhu, K., Jayakumar, A., AbilashKarthik, S. and Ramani, K., 2020. Biochemical and kinetic evaluation of lipase and biosurfactant assisted ex novo synthesis of microbial oil for biodiesel production by *Yarrowia lipolytica* utilizing chicken tallow. *Process Biochem.* **95**, 17–29 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.009>
38. Kosa, M., Ragauskas, A.J.: Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism re-search. *Trends Biotechnol.* **29**, 53–61 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.002>

39. Lopes, M., Miranda, S.M., Belo, I.: Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production—a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 1–34 (2020). <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1704602>
40. Gonçalves, C., Lopes, M., Ferreira, J.P., Belo, I.: Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Biores. Technol.* **100**, 3759–3763 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.004>
41. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G.: Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Biores. Technol.* **99**(7), 2419–2428 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.005>
42. Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D., Guerzoni, M.E.: Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Biores. Technol.* **96**, 317–322 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.009>
43. Lopes, M., Araújo, C., Aguedo, M., Gomes, N., Gonçalves, C., Teixeira, J.A., Belo, I.: The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. *J. Soc. Chem. Indus.* **84**, 533–537 (2008). <https://doi.org/10.1002/jctb.2075>
44. Wu, L., Gang, G.E., Wan, J.: Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *J. Environ. Sci.* **21**, 237–242 (2009). [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62257-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62257-3)
45. Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M. and Papanikolaou, S., 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86**(11), 1439–1448 (2011). <https://doi.org/10.1002/jctb.2658>
46. Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., Prasertsan, P.: Valorization of palm oil mill effluent into lipid and cell-bound lipase by marine yeast *Yarrowia lipolytica* and their application in biodiesel production. *Waste Biomass Valoriz.* **7**(3), 417–426 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9451-7>
47. Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Vannini, L., Galgano, F., Favati, F., Gardini, F., Suzzi, G.: Variability of lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **69**, 79–89 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00575-x](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00575-x)
48. Papanikolaou, S., Aggelis, G.: Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Biores. Technol.* **82**, 43–49 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00149-3)
49. Papanikolaou, S., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G.: Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electron. J. Biotechnol.* **10**(3), 425–435 (2007). <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-8>
50. Gao, R., Li, Z., Zhou, X., Cheng, S., Zheng, L.: Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 1–15 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0942-6>
51. Gao, R., Li, Z., Zhou, X., Bao, W., Cheng, S., Zheng, L.: Enhanced lipid production by *Yarrowia lipolytica* cultured with synthetic and waste-derived high-content volatile fatty acids under alkaline conditions. *Biotechnol. Biofuels* **13**(1), 1–16 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1645-y>
52. Chi, Z., Zheng, Y., Jiang, A., Chen, S.: Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165**(2), 442–453 (2011). <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9263-6>
53. Johnravindar, D., Karthikeyan, O.P., Selvam, A., Murugesan, K., Wong, J.W.: Lipid accumulation potential of oleaginous yeasts: a comparative evaluation using food waste leachate as a substrate. *Biores. Technol.* **248**, 221–228 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.151>
54. Li, C., Gao, S., Li, X., Yang, X., Lin, C.S.K.: Efficient metabolic evolution of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production using a glucose-based medium in an in situ fibrous bioreactor under low-pH condition. *Biotechnol. Biofuels* **11**(1), 236 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1233-6>
55. Dunoyer, A.T., Cuello, R.E.G., Salinas, R.P.: Biodegradation of dairy wastes using crude enzymatic extract of *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773. *Revista Ambiente & Água.* **15**(1), (2020). <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2448>
56. Posso Mendoza, H., Pérez Salinas, R., Tarón Dunoyer, A., Carvajal, C., MORGADO GAMERO, W.B., Castillo Ramírez, M., Parody, A.: Evaluation of enzymatic extract with lipase activity of *Yarrowia lipolytica*. An application of data mining for the food industry wastewater treatment (2019). https://doi.org/10.1007/978-3-030-16946-6_24
57. FAO Pollution from industrialized livestock production. *Livestock Policy Brief* (FAO) (2007). <http://www.fao.org/publications/card/en/c/d8bf813c-b1db-5332-b77c-0979b461331a/>. Accessed: 23 Feb 2021.
58. FAO Livestock and agroecology (2018). <http://www.fao.org/3/I8926EN/i8926en.pdf>. Accessed: 23 Feb 2021.
59. Brabender, M., Hussain, M.S., Rodriguez, G., Blenner, M.A.: Urea and urine are a viable and cost-effective nitrogen source for *Yarrowia lipolytica* biomass and lipid accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**(5), 2313–2322 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8769-z>
60. Romero, C., Hammer, E., Cazau, C., Arambarri, A.: Isolation and characterization of biaryl structure-degrading yeasts: hydroxylation potential of dibenzofuran. *Environ. Pollut.* **118**, 379–382 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00290-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00290-1)
61. Ratusz, K., Symoniuk, E., Wróński, M., Rudzińska, M.: Bioactive Compounds, nutritional quality and oxidative stability of cold-pressed Camelina (Camelina sativa L.) oils. *Appl. Sci.* **8**(12), 2606 (2018). <https://doi.org/10.3390/app8122606>
62. Kamzolova, S.V., Lunina, J.N., Morgunov, I.G.: Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **88**(12), 1965–1976 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1954-1>
63. Tan, K.H., Gill, C.O.: Batch growth of *Saccharomycopsis lipolytica* on animal fats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(5), 292–298 (1985). <https://doi.org/10.1007/BF00252707>
64. Bednarski, W., Adamczak, M., Kowalewska-Piontas, J., Zaderowski, R.: Biotechnological methods for the up-grading and modification of animal waste fats. *Acta Biotechnol.* **14**(4), 387–393 (1994). <https://doi.org/10.1002/abio.370140412>
65. Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S., RaviKumar, A.: Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express* **2**(1), 36 (2012). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-36>
66. Radha, P., Suhazsini, P., Prabhu, K., Jayakumar, A. and Kandasamy, R., 2020. Chicken tallow, a renewable source for the production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* MTCC9520, and its application in silver nanoparticle synthesis. *J. Surfact. Detergents.* **23**(1), pp.119–135 (2020). <https://doi.org/10.1002/jsde.12357>
67. Ratledge, C.: *Single cell oils for the 21st century* w Single cell oils. AOCs Press (2010). <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-73-8.50005-0>
68. Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G.: Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing

- on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**(3), 308–312 (2002). <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0897-0>
69. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G.: Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **52**(2), 134–142 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0223-7>
 70. Patel, A., Sartaj, K., Pruthi, P.A., Pruthi, V., Matsakas, L.: Utilization of clarified butter sediment waste as a feedstock for cost-effective production of biodiesel. *Foods* **8**(7), 234 (2019). <https://doi.org/10.3390/foods8070234>
 71. Papanikolaou, S., Aggelis, G.: Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**(11), 651–655 (2003). <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300858>
 72. Lopes, M., Gomes, A.S., Silva, C.M., Belo, I.: Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. *J. Biotechnol.* **265**, 76–85 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.007>
 73. Bagoulla, C., Guillotreau, P.: Maritime transport in the French economy and its impact on air pollution: an input-output analysis. *Mar. Policy* **116**, 103818 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.103818>
 74. Marciniak, M.: Analiza i ocena zmian w polskiej gospodarce rybnej po akcesji do Unii Europejskiej. *Zeszyty Naukowe SGGW. Problemy Rolnictwa Światowego* **7**(22), 70–79 (2009)
 75. Baik, M.Y., Suhendro, E.L., Nawar, W.W., McClements, D.J., Decker, E.A., Chinachoti, P.: Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **81**(4), 355–360 (2004). <https://doi.org/10.1007/s11746-004-0906-7>
 76. Hardy, R.W.: Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquacul. Res.* **41**(5), 770–776 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>
 77. Yano, Y., Oikawa, H., Satomi, M.: Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int. J. Food Microbiol.* **121**(3), 302–307 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.012>
 78. 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**, 527–554 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
 79. Al Khawli, F., Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J.M., Gullón, P., Kousoulaki, K., Ferrer, E., Berrada, H., Barba, F.J.: Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products. *Mar. Drugs* **17**(12), 689 (2019). <https://doi.org/10.3390/md17120689>
 80. Vázquez, J.A., Meduñña, A., Durán, A.I., Nogueira, M., Fernández-Compás, A., Pérez-Martín, R.I., Rodríguez-Amado, I.: Production of valuable compounds and bioactive metabolites from by-products of fish discards using chemical processing, enzymatic hydrolysis, and bacterial fermentation. *Mar. Drugs* **17**(3), 139 (2019). <https://doi.org/10.3390/md17030139>
 81. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T.: Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chem.* **135**(4), 3020–3038 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
 82. Bücker, F., Marder, M., Peiter, M.R., Lehn, D.N., Esquerdo, V.M., de Almeida Pinto, L.A., Konrad, O.: Fish waste: an efficient alternative to biogas and methane production in an anaerobic mono-digestion system. *Renew. Energy* **147**, 798–805 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.140>
 83. Zieniuk, B., Fabiszewska, A.: Ryby oraz odpady rybne jako źródło składników bioaktywnych oraz surowce dla przemysłu energetycznego. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, **25**(1) (2018). <https://doi.org/10.15193/zntj/2018/114/217>
 84. Hamimed, S., Barkaoui, T., Trabelsi, I., Landoulsi, A., Chatti, A.: High-performance biological treatment of tuna wash processing wastewater using *Yarrowia lipolytica*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* pp. 1–10 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10586-6>
 85. Khalifa, A.Y., Alsyeed, A.M., Almalki, M.A., Saleh, F.A.: Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J. Biol. Sci.* **23**(1), 79–86 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.008>
 86. Ching, Y.C., Redzwan, G.: Biological treatment of fish processing saline wastewater for reuse as liquid fertilizer. *Sustainability* **9**(7), 1062 (2017). <https://doi.org/10.3390/su9071062>
 87. Guo, X., Tomonaga, T., Yanagihara, Y., Ota, Y.: Screening for yeasts incorporating the exogenous eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from crude fish oil. *J. Biosci. Bioeng.* **87**(2), 184–188 (1999). [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)89010-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)89010-6)
 88. Akpinar, O., Uçar, F.B.: Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* strains isolated from different environments and lipase profiling. *Turk. J. Biol.* **37**, 249–258 (2013). <https://doi.org/10.3906/biy-1201-23>
 89. Fabiszewska, A., Mazurczak, P., Pielnińska, A., Zieniuk, B., Nowak, D.: Białecka-Florjańczyk, E: Próba zastosowania drożdży *Yarrowia Lipolytica* KKP 379 w zagospodarowaniu odpadów przemysłu rybnego. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* **2**, 28–30 (2014)
 90. El Bialy, H., Gomaa, O.M., Azab, K.S.: Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**(12), 2791–2798 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0755-x>
 91. Lopes, M., Miranda, S.M., Alves, J.M., Pereira, A.S., Belo, I.: Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **121**(1), 1800188 (2019). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800188>
 92. Huang, L., Zhang, B., Gao, B., Sun, G.: Application of fishmeal wastewater as a potential low-cost medium for lipid production by *Lipomyces starkeyi* HL. *Environ. Technol.* **32**(16), 1975–1981 (2011). <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.562551>
 93. Sabra, W., Bommareddy, R.R., Maheshwari, G., Papanikolaou, S., Zeng, A.P.: Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analyses. *Microb. Cell factor.* **16**, Article: 78 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0690-0>
 94. Xiaoyan, L., Yu, X., Lv, J., Xu, J., Xia, J., Wu, Z., Zhang, T., Deng, Y.: A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food Bioprod. Process.* **103**, 86–94 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.002>
 95. Liu, X., Lv, J., Xu, J., Xia, J., He, A., Zhang, T., Li, X., Xu, J.: Effects of osmotic pressure and pH on citric acid and erythritol production from waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci.* **18**(6), 344–352 (2018). <https://doi.org/10.1002/elsc.201700114>
 96. Pang, Y., Zhao, Y., Li, S., Zhao, Y., Li, J., Hu, Z., Zhang, C., Xiao, D., Yu, A.: Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil. *Biotechnol. Biofuels* **12**(1), 241–258 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1580-y>
 97. Nunes, P., Martins, A.B., Santa Brigida, A.I., Leao, M.M.D.R., Amaral, P.: Intracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using different carbon sources. *Chem. Eng. Trans.* **38**, 421–426 (2014). <https://doi.org/10.3303/CET1438071>

98. Dominguez, A., Deive, F. J., Sanroman, M. A., Longo, M. A.: Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**(11), 1200–1208 (2010). <https://doi.org/10.22409/engevista.v19i1.791>
99. Kempka, A. P., Mocelin, A., Cazagrande, C., Goulart, F. C., Heinzen, V. D., Prestes, R. C.: Influence of different inductors and operating conditions in the production of lipase from *Aspergillus niger* using cassava peel: a short study. *Engevista.* **19**(1), 9–18 (2017). <https://doi.org/10.22409/engevista.v19i1.791>
100. Nunes, P.M., Fraga, J.L., Ratier, R.B., Rocha-Leão, M.H.M., Brígida, A.I., Fickers, P., Amaral, P.F.: Waste soybean frying oil for the production, extraction, and characterization of cell-wall-associated lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **44**(4), 809–818 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02489-0>
101. Katre, G., Ajmera, N., Zinjarde, S., RaviKumar, A.: Mutants of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil as a biofactory for biodiesel production. *Microb. Cell Fact.* **16**(1), 176 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0790-x>
102. Tzirita, M., Papanikolaou, S., Chatzifragkou, A., Quilty, B.: Waste fat biodegradation and biomodification by *Yarrowia lipolytica* and a bacterial consortium composed of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida*. *Eng. Life Sci.* **18**(12), 932–942 (2018). <https://doi.org/10.1002/elsc.201800067>
103. Ron, E.Z., Rosenberg, E.: Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**(3), 249–252 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
104. Scioli, C., Vollaro, L.: The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Res.* **31**(10), 2520–2524 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00083-3)
105. Vatsal, A.A., Zinjarde, S.S., RaviKumar, A.: Phenol is the initial product formed during growth and degradation of bromobenzene by tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 via an early dehalogenation step. *Front. Microbiol.* **8**, 1165 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01165>
106. Lee, J.S., Kang, E.J., Kim, M.O., 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**(1), 112–117 (2001)
107. Dil, E.A., Ghaedi, M., Ghezlbash, G.R., Asfaram, A.: Multi-responses optimization of simultaneous biosorption of cationic dyes by live yeast *Yarrowia Lipolytica* 70562 from binary solution: application of first order derivative spectrophotometry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **139**, 158–164 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.030>
108. Aracagök, Y.D., Cihangir, N.: Decolorization of reactive black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658. *Am. J. Microbiol. Res.* **1**, 16–20 (2013). <https://doi.org/10.12691/ajmr-1-2-1>
109. Romero, M.C., Hammer, E., Cazau, M.C., Arambarri, A.M.: Selection of autochthonous yeasts trains able to degrade biphenyl. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**(6), 591–594 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1012462906663>
110. 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. Pollut. Bull.* **49**, 783–788 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.06.007>
111. Żogała, B., Robak, M., Rymowicz, W., Wzientek, K., Rusin, M., Maruszczak, J.: Geoelectrical Observation of *Yarrowia lipolytica* Bioremediation of Petrol-Contaminated Soil. *Polish J. Environ. Stud.* **14**(5) (2005).
112. Amaral, P.F., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M. and Coutinho, J.A.: Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In Sen. R. (eds.) *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 672, pp. 236–249. Springer, New York, NY. (2010). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_18
113. Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A., Albuquerque, C.D.C.: Environmentally friendly biosurfactants produced by yeasts. In Sen R. (eds.) *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 672, Springer, New York, NY. (2010). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
114. Van Beilen, J.B., Funhoff, E.G.: Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**(1), 13–21 (2007). <https://doi.org/10.1002/anie.200603282>
115. Matatkova, O., Gharwalova, L., Zimola, M., Rezanka, T., Masak, J., Kolouchova, I.: Using odd-alkanes as a carbon source to increase the content of nutritionally important fatty acids in *Candida krusei*, *Trichosporon cutaneum*, and *Yarrowia lipolytica*. *Int. J. Anal. Chem.* **10**, (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8195329>
116. Białas, W., Marecik, R., Szulc, A., Ławniczak, Ł., Chrzanowski, Ł., Ciesielczyk, F., Jesionowski, T., Aurich, A.: Effect of exogenously added rhamnolipids on citric acid production yield. *Afr. J. Biotechnol.* (2013). <https://doi.org/10.5897/AJB12.2782>
117. Zinjarde, S.S., Pant, A.A.: Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar. Pollut. Bull.* **44**(2), 118–121 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00185-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00185-0)
118. Zinjarde, S.S., Pant, A., Deshpande, M.V.: Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycol. Res.* **102**(5), 553–558 (1998). <https://doi.org/10.1017/S0953756297005418>
119. Zinjarde, S.S., Pant, A.: Crude oil degradation by free and immobilized cells of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J. Environ. Sci. Health Part A* **35**(5), 755–763 (2000). <https://doi.org/10.1080/10934520009377000>
120. Wei, D., Zhang, L.Y., Song, Q.: Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by *Candida rugosa*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**(3), 133–136 (2004). <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0126-9>
121. Barth, G: *Yarrowia lipolytica*—genetics, genomics, and physiology. microbiology monographs, vol. 24, Springer, Heidelberg, Germany (2013). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38320-5>
122. Madzak, C.: *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**(11), 4559–4577 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6624-z>
123. Ledesma-Amaro, R., Lazar, Z., Rakick, M., Guo, Z., Fouchard, F., Crutz Le Coq, A.-M., Nicaud, J.-M.: Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose. *Metab. Eng.* **38**, 115–124 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jymben.2016.07.001>
124. Ledesma-Amaro, R., Nicaud, J.-M.: Metabolic engineering for expanding the substrate range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol.* **34**, 798–809 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>
125. Rakicka, M., Biegalska, A., Rymowicz, W., Dobrowolski, A., Mirończuk, A.: Polyol production from waste materials by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Biores. Technol.* **243**, 393–399 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.137>
126. Yan, J., Han, B., Gui, X., Wang, G., Xu, L., Yan, Y., Madzak, C., Pan, D., Wang, Y., Zha, G. and Jiao, L.: Engineering *Yarrowia lipolytica* to Simultaneously Produce Lipase and Single Cell Protein from Agro-industrial Wastes for Feed. *Sci. Rep.* **8**, Article ID 758 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19238-9>
127. Blazeck, J., Hill, A., Liu, L., Knight, R., Miller, J., Pan, A., Otoupal, P and Alper, H.S.: Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nat. Commun.* **5**, Article ID 3131 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms4131>
128. Lindquist, M.R., Lopez-Nunez, J.C., Jones, M.A., Cox, E.J., Pinkelmann, R.J., Bang, S.S., Moser, B.R., Jackson, M.A., Iten, L.B.,

- Kurtzman, C.P., Bischoff, K.M., Liu, S., Qureshi, N., Tasaki, K., Rich, J.O., Cotta, M.A., Saha, B.C., Hughes, S.R.: Irradiation of *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-567 creating novel strains with enhanced ammonia and oil production on protein and carbohydrate substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 9723–9743 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6852-2>
129. Ezejiofor, T.I.N., Enebaek, U.E., Ogueke, C.: Waste to wealth-value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: a review. *Biotechnol. J. Int.* pp. 418–481 (2014). <https://doi.org/10.9734/BBJ/2014/7017>
130. Spalvins, K., Blumberg, D.: Production of fish feed and fish oil from waste biomass using microorganisms: overview of methods analyzing resource availability. *Environ. Clim. Technol.* **22**(1), 149–164 (2018). <https://doi.org/10.2478/rtuct-2018-0010>
131. Qin, L., Liu, L., Zeng, A.P., Wei, D.: From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Biores. Technol.* **245**, 1507–1519 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>
132. Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I.: Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Curr. Microbiol.* **46**(2), 0124–0130 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3833-3>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article

Phosphorus and Nitrogen Limitation as a Part of the Strategy to Stimulate Microbial Lipid Biosynthesis

Katarzyna Wierzchowska ^{1,*} , Bartłomiej Zieniuk ¹ , Dorota Nowak ²  and Agata Fabiszewska ¹ 

¹ Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland; bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl (B.Z.); agata_fabiszewska@sggw.edu.pl (A.F.)

² Department of Food Engineering and Process Management, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland; dorota_nowak@sggw.edu.pl

* Correspondence: katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

Abstract: Microbial lipids called a sustainable alternative to traditional vegetable oils invariably capture the attention of researchers. In this study, the effect of limiting inorganic phosphorus (KH_2PO_4) and nitrogen ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) sources in lipid-rich culture medium on the efficiency of cellular lipid biosynthesis by *Y. lipolytica* yeast has been investigated. In batch cultures, the carbon source was rapeseed waste post-frying oil (50 g/dm^3). A significant relationship between the concentration of KH_2PO_4 and the amount of lipids accumulated has been revealed. In the shake-flask cultures, storage lipid yield was correlated with lower doses of phosphorus source in the medium. In bioreactor culture in mineral medium with (g/dm^3) $3.0 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ and $3.0 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the cellular lipid yield was 47.5% (w/w). Simultaneous limitation of both phosphorus and nitrogen sources promoted lipid accumulation in cells, but at the same time created unfavorable conditions for biomass growth ($0.78 \text{ g}_{\text{d.m.}}/\text{dm}^3$). Increased phosphorus availability with limited cellular access to nitrogen resulted in higher biomass yields ($7.45 \text{ g}_{\text{d.m.}}/\text{dm}^3$) than phosphorus limitation in a nitrogen-rich medium ($4.56 \text{ g}_{\text{d.m.}}/\text{dm}^3$), with comparable lipid yields (30% and 32%). Regardless of the medium composition, the yeast preferentially accumulated oleic and linoleic acids as well as linolenic acid up to 8.89% . Further, it is crucial to determine the correlation between N/P molar ratios, biomass growth and efficient lipid accumulation. In particular, considering the contribution of phosphorus as a component of coenzymes in many metabolic pathways, including lipid biosynthesis and respiration processes, its importance as a factor in the cultivation of the oleaginous microorganisms was highlighted.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; microbial lipids; phosphorus limitation; nitrogen limitation



Citation: Wierzchowska, K.; Zieniuk, B.; Nowak, D.; Fabiszewska, A. Phosphorus and Nitrogen Limitation as a Part of the Strategy to Stimulate Microbial Lipid Biosynthesis. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 11819. <https://doi.org/10.3390/app112411819>

Academic Editor: Agata Górka

Received: 26 November 2021

Accepted: 10 December 2021

Published: 13 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Among oleaginous microorganisms capable of accumulating lipids exceeding 20% of cell dry weight, the species *Yarrowia lipolytica* stands out as a model organism [1]. Moreover, the non-conventional yeast *Y. lipolytica* is a permissive species with wide-ranging biotechnological applications. Considering well-studied metabolism, fully sequenced genome and secretion capabilities that provide opportunities to obtain new microbial products previously obtained through other routes, they have become a model for oleaginous species in many basics and applications studies [2–6]. Single cell oil (SCO) extracted from cells of oleaginous microorganisms is promising for food technology and nutrition notably due to its content of polyunsaturated fatty acids. It is reported that SCOs in addition to polysaccharides or single cell proteins (SCPs) could be a valuable food additive. Microbial lipids may increase the nutritional value of the final product enriched with these components, being at the same time a potential substitute for vegetable lipids, e.g., palm oil, cocoa butter and other fatty acids of industrial importance [7,8].

Nowadays, PUFA-rich SCO are mainly extracted from microalgae due to the innate ability to synthesize valuable fatty acids and lipid production efficiency, such as *Schizochytrium* sp. 50–77% of dry weight, *Nitzschia* sp. 45–47%, *Nannochloropsis* sp. 31–68% or *Neochloris oleoabundans* 35–54% oil content [9]. Oleaginous yeasts, compared to microalgae, have a rather lower ability to synthesize SCO. Remarkably, wild yeast strains of *Y. lipolytica* metabolizing glucose are able to store lipids up to 36% of cell dry weight, and even up to 50–60% in the case of feeding biomass with hydrophobic substrates [6,10]. In SCO production, lipid yield per unit dry weight is a critical factor; thus, solutions are still being sought to improve it [11]. Fields such as synthetic and system biology, along with metabolic engineering techniques, are used to improve lipid storage yield and obtain lipids rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs). By using various molecular biology methods, it has been possible to obtain *Y. lipolytica* yeast mutants capable of accumulating up to 25% eicosapentenoic acid in the total content of the fatty acids [12].

Oleaginous yeasts, depending on the type of carbon substrate in the culture medium, accumulate lipids through two different biochemical pathways: *de novo* for hydrophilic and *ex novo* for hydrophobic substrates. In recent years, research has been conducted to define and analyze genes associated with the activity of enzymes specific to both biosynthetic pathways [2,13]. There are reports that sometimes cellular lipid accumulation may occur through two pathways simultaneously [2].

The yeast *Y. lipolytica* is well known for its ability to metabolize complex lipid substrates, including industrial waste products [14]. Studies on SCO synthesis using including pork lard, stearin—an industrial derivative of animal fat, waste glycerol, molasses and other lignocellulosic wastes have been reported in the literature [11,15–17]. Nowadays, processed vegetable oils (waste cooking oils—WCO) have been considered a waste product with high potential for biotechnological application [18]. *Y. lipolytica* strains are able to produce many metabolites in media with waste cooking oils: citric acid [19], erythritol [20], lipases [21,22], and microbial lipids [23–25]. In this manner, environmentally burdensome wastes have found application in the cell culture of *Y. lipolytica* species. The enormous potential of *Y. lipolytica* in the utilization and management of hydrophobic industrial wastes was presented in a review by Wierzychowska et al. [26].

The oleaginous yeast accumulates significant amounts of SCO under stress conditions caused by limited access to nutrients. Biosynthesis of microbial oil is enhanced in media depleted of nutrients other than carbon. The key issue for efficient lipid accumulation is limiting access to nitrogen [27]. Unlike nitrogen, access of microorganism cells to carbon should be unrestricted, at a constantly high level [28]. There is a notion that a high carbon/nitrogen ratio and a high carbon/phosphorus ratio in the medium composition promotes lipid accumulation in oleaginous yeast cells [29]. Many studies have been carried out on the potential of oleaginous microorganisms to accumulate high lipid contents in medium with a limiting element (nitrogen, magnesium, phosphorus, iron, zinc, etc.) [29–35]. However, most of works was concerned the analysis of the effects of nutrient limitation on the synthesis of storage lipids via the *de novo* pathway. Therefore, there is still some need to explore how its limitation involves the *ex novo* biosynthesis route.

The dynamics of microbial processes is inextricably linked to the response of microorganisms to changes in the environmental conditions in which they grow. To ensure optimal production efficiency on an industrial scale, tolerance of microorganisms to environmental stress is highly desirable. In particular, this is due to the growing interest in microbial biotechnological processes. Understanding how physiological systems respond to changing environmental conditions resulting in a specific level of growth or production of desired metabolites is critical to finding new and optimizing already developed applications [36].

This paper attempts to evaluate the effect of limiting inorganic phosphorus and nitrogen sources as well as duration of culture on the efficiency of microbial oil production, fatty acid composition and growth of *Y. lipolytica* yeast with simultaneous waste valorization. The work assumed the use of oleaginous yeasts to manage waste from the food industry, specifically rapeseed post-frying oil, as an essential carbon source for cell growth.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast strain and Culture Conditions

In the current work, the yeast strain *Y. lipolytica* KKP 379 from the Collection of Industrial Microorganisms Cultures belonging to Professor Waław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute in Warsaw (Poland) was used. The yeast culture was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ using cryovials containing ceramic beads and cryoprotective agent (Protect Select, Technical Service Consultants Ltd., Heywood, UK).

Inoculation culture was conducted in YPG medium with the following composition: 10 g/dm^3 yeast extract (Y), 20 g/dm^3 peptone (P) and 20 g/dm^3 glucose (G). The flasks were incubated at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h with a rotation amplitude of 140 rpm.

The yeast cells were incubated in 500 cm^3 flasks at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 140 rpm rotary shaker speed. Each flask contained 200 cm^3 of sterile medium. Batch cultures were also conducted in a BIOFLO 3000 laboratory bioreactor from New Brunswick Scientific (USA) with a working volume of 4 dm^3 , fermentation temperature $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 0.025% (*v/v*) inoculum. Oxygenation control was applied using compressed air to maintain the relative degree of oxygenation in the culture medium at a level not lower than 30% of the initial oxygen concentration (variable agitation speed 300–600 rpm). The dissolved oxygen level was measured using an oxygen electrode. Changes in pH values were also monitored using a selective electrode. Parameters of cellular lipid biosynthesis in a batch culture of *Y. lipolytica* strain were calculated according to Fabiszewska et al. [2].

The yeast grew in a mineral medium containing 1.5 g/dm^3 MgSO_4 , 0.16 g/dm^3 $\text{FeSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g/dm^3 CaCl_2 , 0.08 g/dm^3 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/dm^3 ZnSO_4 and KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at different levels. All inorganic chemicals were purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A (Gliwice, Poland). In all batch cultures, the carbon source was waste rapeseed post-frying oil at 50 g/dm^3 . Waste oil, in which cod (*Gadus morhua*) fillets were fried at $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ in full immersion, came from a fish processing company in Podlaskie Voivodeship (Poland). The preliminary batch shaking flask cultures in duplicate have been conducted with statistical planning of experiments using a Latin square plan (4×4) (Table 1).

Table 1. Latin Square plan 4×4 -flask experiment design.

$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{g/dm}^3)$	Duration of the Cultivations (Days)				$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4(\text{g/dm}^3)$
	3	4	5	6	
3	4.0	6.0	8.0	10.0	
7	6.0	8.0	10	4.0	
9	8.0	10.0	4.0	6.0	
11	10.0	4.0	6.0	8.0	

Bioreactor batch cultures have been conducted in media containing variable concentrations of KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Table 2)

Table 2. Composition of culture media used in yeast cultivation in a laboratory bioreactor.

(g/dm^3)	M1	M2	M3	M4
KH_2PO_4	3.0	3.0	3.5	7.0
Na_2HPO_4	1.1	1.1	2.5	2.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0	8.0	10.0	4.0

2.2. General Analytical Techniques

Yeast biomass yield was determined by cell dry weight measured by thermogravimetric method. Cells were harvested by centrifugation at 8000 rpm, 4 °C for 10 min, washed using distilled water and dried at 105 °C to constant weight.

Determination of nitrogen content in the culture medium after biomass removal was carried out by the modified Kjeldahl method [37] with the sample mineralization step omitted. From 90 cm³ of the culture medium sample, ammonia was distilled (50 cm³ 40% NaOH, distillation time—4 min) into 25 cm³ 4% boric acid. The solution was titrated with 0.1 M HCl in the presence of Tashiro indicator. The nitrogen content of the sample was converted to the level of ammonium sulfate remaining in the medium.

Extraction of cellular lipids from dry material was performed in Soxhlet extractor using *n*-hexane as a solvent. The authors used modified Folch et al. [38] method extraction for batch shaking cultures by treating the dried and washed biomass four times with portions of a chloroform and methanol (2:1) mixture (1 cm³/1 g_{d.m}). The solvents were separated by distillation under reduced pressure of 360 mbar. Distillation was carried out in a Buchi Rotavapor R-200 evaporator (Flawil, Switzerland). The lipid substrate consumption in the culture was evaluated using a simple extraction method with 10 cm³ portions of hexane. Magnesium sulfate was then added to the oil phase to remove water. After 10 min, the whole was filtered to remove the drying agent. The solvent was evaporated from the organic phase and the remaining oil was weighed.

2.3. Gas Chromatography

Microbial lipid samples extracted from yeast cells were derivatized with 14% solution of BF₃ (boron trifluoride) in methanol added in equal volumes and heated for 2 h at 60 °C. Fatty acid composition of microbial lipids was determined by gas chromatography using a flame ionization detector (GC-FID) in an Agilent Technology 7820 (Santa Clara, CA, USA) with Zebron ZB-FFAP Capillary GC Column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). Nitrogen has been used as a carrier gas at a flow rate of 35 mL/min. The temperature program was as follows: 80 °C (2 min) to 200 °C (10 min) (5 °C/min). Injector temperature: 250 °C; detector temperature: 290 °C; injection volume: 1 µL.

2.4. Statistical Analyses

Statistical elaboration of the results was performed using Statistica 13.0 set plus software (Statsoft, Cracow, Poland). A design of experiment was applied as a tool in investigating the effect of selected culture conditions on *Y. lipolytica* growth and lipid biosynthesis yield. A 4 × 4 latin square design method was used in the experiment provided in shaken flasks and *p*-value was then estimated at 0.01 (Table 1).

3. Results

3.1. Flask Scale Experiments

The preliminary experiment has been designed to evaluate the effect of culture time as well as limiting components such as phosphorus and nitrogen source on the growth of *Y. lipolytica* yeast biomass, cellular lipid yield, and the utilization of hydrophobic substrate as a carbon source. The cultures have been conducted in 16 medium variants, in which the concentrations of KH₂PO₄ (3.0, 7.0, 9.0, 11.0 g/dm³) and (NH₄)₂SO₄ (4.0, 6.0, 8.0, 10.0 g/dm³) have been modified according to the experimental scheme (Table 1). The incubations were terminated after 3, 4, 5 and 6 days. As can be seen in Figure 1A, the value of biomass yield was closely related only to the time of culture (*p*-value 0.01). The effect of the duration of yeast cultivations was also significant for intracellular lipid content. The yeast cells accumulated higher amounts of lipids on the 5th and 6th days of culture. The level of KH₂PO₄ supplementation appeared to be a significant factor influencing lipid accumulation efficiency (*p*-value 0.01) (Figure 1B). Higher lipid biosynthesis yield was correlated with lower doses of inorganic phosphorus source in the medium. In the case of the level of the nitrogen source additive in the form of (NH₄)₂SO₄, no significant

relationship was found in the studied concentration range. It is noteworthy that none of the three analyzed factors was significantly associated with changes in the content of waste post-frying oil (carbon source) in the medium. Nevertheless, it decreased with time of culture (Figure 1C).

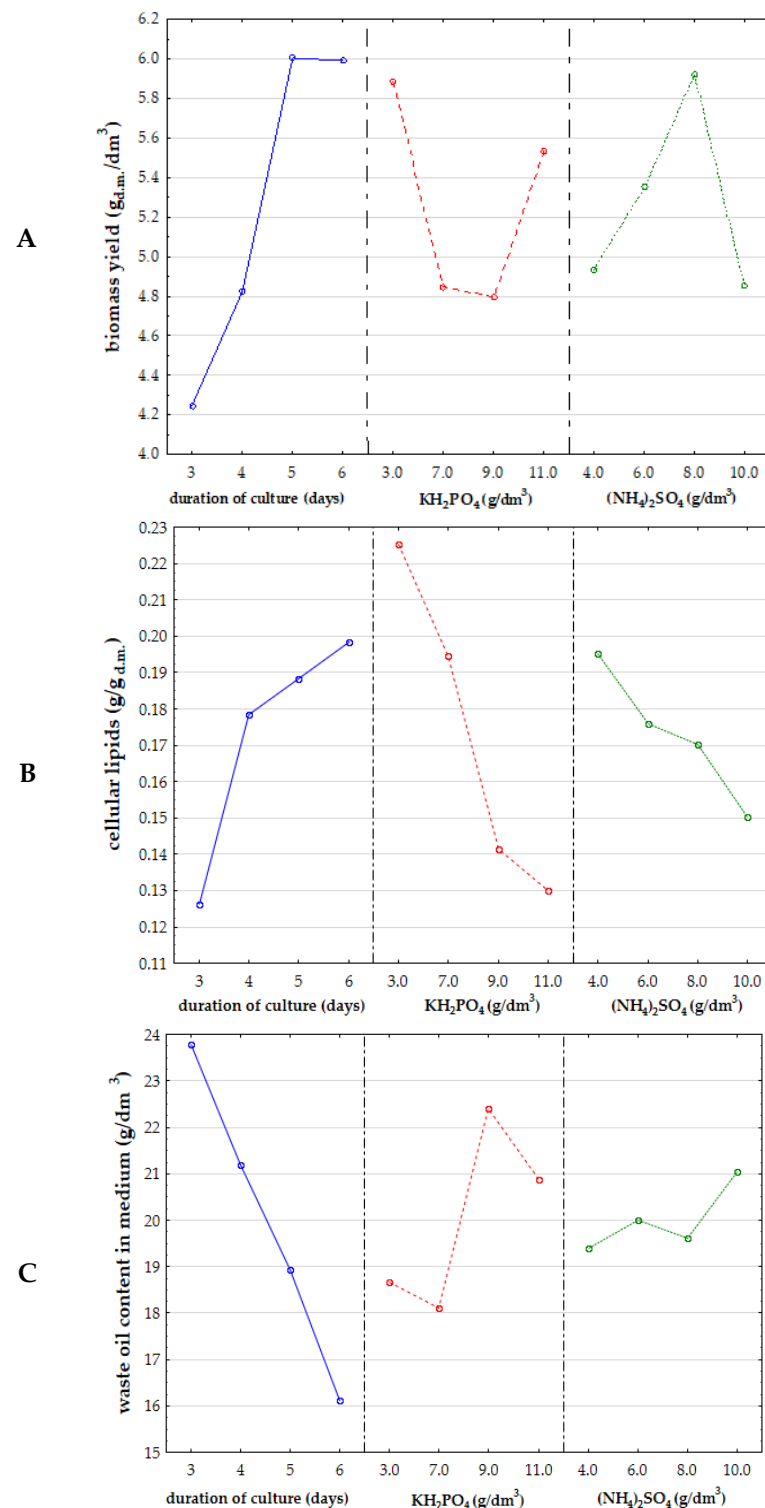


Figure 1. Statistical analysis of correlation between (A) biomass yield ($\text{g}_{\text{d.m.}}/\text{dm}^3$), (B) cellular lipid content ($\text{g}/\text{g}_{\text{d.m.}}$), (C) waste post-frying oil content in medium (g/dm^3) and concentration of KH_2PO_4 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and culture time of *Y. lipolytica* KKP 379 yeast in medium with 5% addition of post-frying rapeseed oil.

3.2. Bioreactor Scale Experiments

Four batch cultures of *Y. lipolytica* KKP 379 strain in a laboratory bioreactor have been conducted to evaluate the effect of the previously selected factors. In each culture, changes in the pH of the culture medium and the rate of oxygen consumption have been monitored (Figure 2). Generally, in all variants of the culture medium, the yeast completed the logarithmic growth phase after nearly 16 h, thus entering the stationary phase associated with the production of metabolites such as acids, which was reflected in a significant decrease in pH, but most importantly the cells began to accumulate storage lipids.

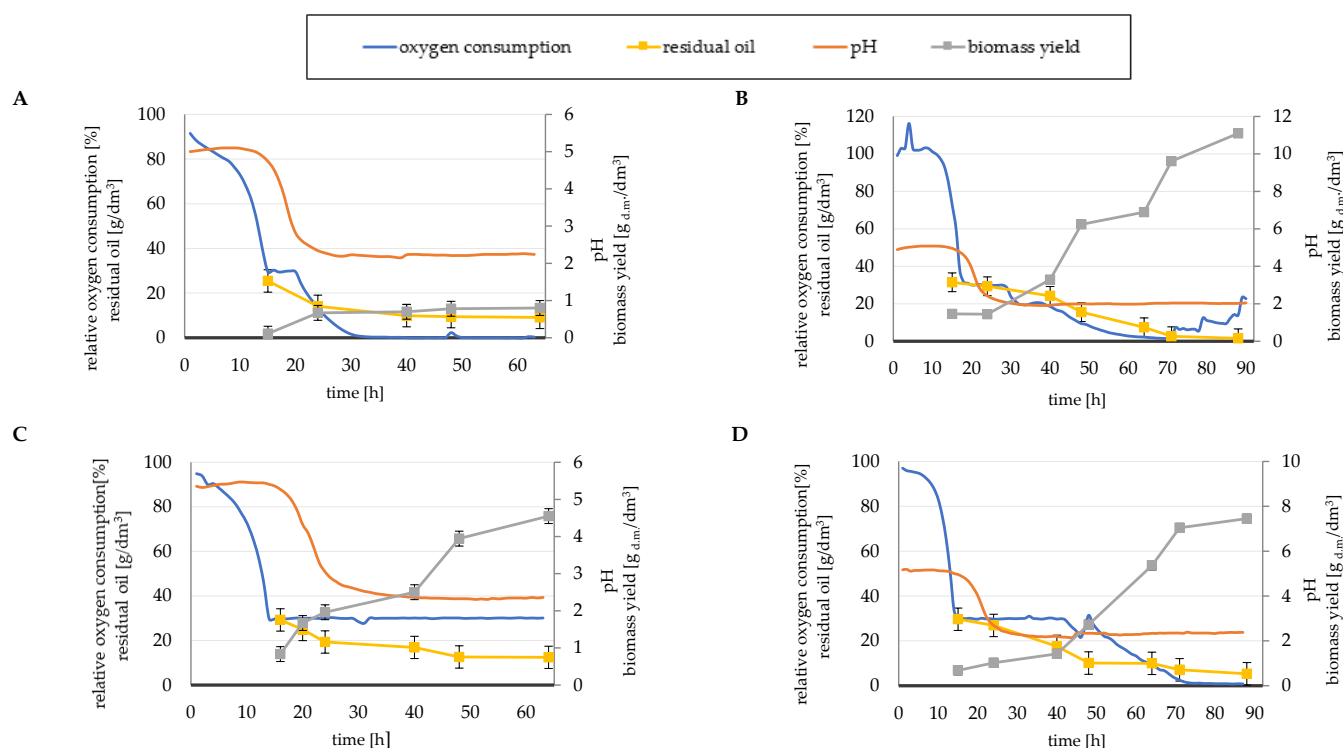


Figure 2. Changes in relative oxygen consumption and pH of the strain *Y. lipolytica* KKP 379 grown in (A) M1, (B) M2, (C) M3 and (D) M4 medium with 5% rapeseed waste post-frying oil as a carbon source.

For M1 medium, in addition to the modification related to KH_2PO_4 (3.0 g/dm^3) and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.0 g/dm^3) doses, the level of Na_2HPO_4 supplementation (1.1 g/dm^3) was also adjusted due to the buffering properties of the medium. The molar ratios C/N and C/P were 71.8:1 and 114.9:1, respectively. A significant increase in the oxygen demand of the cells has been observed from the 20th hour of culture onwards, resulting in a decrease in the dissolved oxygen content of the medium (Figure 2A). During the entire cultivation process, the biomass yield value was marginal. Therefore, the high oxygen demand could be related to the increased lipid synthesis process due to the beginning of the stationary growth phase rather than to the oxygen demand caused by the intensive biomass growth, which did not occur. After 63 h of cultivation in mineral medium M1 with phosphorus and nitrogen source limitation, the efficiency of intracellular lipid accumulation by wild-type *Y. lipolytica* cells was 47.44%, which is considered an astonishing result. The yeast cells also efficiently utilized the waste carbon source, leaving only 9.11 g/dm^3 unused. Despite the lipid yield result, considering the increase in biomass, the amount of SCO obtained per unit of substrate was very low (Table 3).

Table 3. Parameters of *Y. lipolytica* KKP 379 yeasts strain culture in media with 5% rapeseed waste post-frying oil as a carbon source.

Parameter	Unit	M1	M2	M3	M4
Molar ratio in the medium [C/N/P]	mol	114.9/1.6/1	114.9/4.3/1	81.6/3.8/1	53.1/1/1.07
Initial concentration of carbon source [S]	g/dm ³	50	50	50	50
Time [t]	h	63	88	63	88
Biomass yield [X]	g _{d.m.} /dm ³	0.78	11.10	4.56	7.45
Maximum concentration of lipids produced [L _{max}]	g/dm ³	0.37	2.32	1.49	2.24
Conversion yield of biomass per carbon substrate [Y _{X/S}]	g _{d.m.} /g	0.0156	0.2220	0.0912	0.1490
Conversion yield of storage lipids per biomass formed [Y _{L/X}]	g/g _{d.m.}	0.4744	0.2090	0.3267	0.3007
Conversion yield of storage lipids per carbon substrate [Y _{L/S}]	g/g	0.0074	0.0464	0.0298	0.0448
Volumetric rate of storage lipids production [q _{Lv}]	g/dm ³ /h	0.0059	0.0256	0.0236	0.0254

The residual oil content of the substrate was a reflection of the biomass yield in the M2 substrate (C/N = 26.7:1, C/P = 114.9:1). A significant increase in biomass yield after 2 days of culture combined with a decrease in the residual carbon source in the medium was noticeable (Figure 2B). After 88 h of culture, the cells had used almost all of the waste post-frying oil, reducing its initial content in the culture medium from 50 to 1.56 g/dm³, achieving at the same time the highest biomass yield (11.10 g_{d.m.}/dm³) among the other yeast culture variants (Table 3). In addition, there was a gradual decrease in oxygen demand at the end of the culture (71 h). Cells no longer multiplied intensively; moreover, lipids were not efficiently accumulated, gaining a final yield of 20.9%.

Oxygen turned out to be a factor worth observing also in the case of the next batch culture in M3 medium. The addition of (NH₄)₂SO₄ was further increased to 10 g/dm³ (C/N = 21.5:1). Similarly, the level of the addition of phosphorus sources was slightly increased, KH₂PO₄ 3.5 g/dm³ and Na₂HPO₄ 2.5 g/dm³ (C/P = 81.6:1). In culture medium, the dissolved oxygen content remained constant from the 15th hour until the end of the cultivation process. The amplitude range of the agitation speed appeared to be sufficient to maintain the oxygenation level of the culture medium at a level close to 30%. The constantly low level of oxygen consumption by the cells indicated low oxygen demand, which could be associated with moderate growth of yeast biomass (Figure 2C). Although, the biomass yield was only 4.56 g_{d.m.}/dm³. The final waste post-frying oil content in the medium was relatively low at 12.44 g/dm³. Despite the low biomass yield, yeast consumption of the oily substrate was at a relatively high level, similar to the M1 medium. This is another example of the diversion of the available carbon source to the needs of storage lipid accumulation, not to the energy needs associated with growth. After 63 h, the efficiency of lipid storage was lower in this medium, but still at a satisfactory level of 32.67%.

When *Y. lipolytica* yeast was cultured in M4 medium, significant changes were observed after 2 days of yeast growth. After about 40 h, dissolved oxygen consumption increased due to the increase in biomass yield, which reached 7.45 g_{d.m.}/dm³ (Figure 2D). Thus, this resulted in a decrease in the lipid carbon source content of the culture medium; the final result after 88 h of culturing was a reduction to 5.33 g/dm³. Molar ratios of C/P = 49.6:1 and C/N = 53.1:1 yielded 2.24 g of microbial oil per dm³ of culture medium after 88 h (30.07% cell dry weight). As could be expected, the C/N ratio changed with the duration of the culture. After 24 h, when the most intensive period of cell growth was already over, the ratio decreased to C/N = 30.6:1, after the following hours it was already half (15.5:1), and at the end of the culture the molar C/N ratio was equal to 8.4:1.

The marked observation to emerge from the data comparison (Figure 3) was the dominance of oleic acid (C18:1) in the total fatty acids content of the cellular oils from each medium variant. When analyzing the composition of extracted oils in the context of their potential use as nutritionally valuable products, the content of linoleic (C18:2) and linolenic acids (C18:3) should be considered. The oleic acid content of the oils ranged from 53.89% (M2) to 60.44% (M3), while the linoleic acid content ranged from 17.39% (M4) to

22.58% (M2). For cellular lipids derived from culture in M2 medium, at the same time with the lowest proportion of oleic acid, the highest contents of linoleic acid and linolenic acid (8.89%) were noted. Importantly, considering all variants of the medium, the linolenic acid was at least, 5.82%. Saturated fatty acids were also determined in each of the cellular lipid samples. The highest percentage of stearic acid was found in samples from medium M1–8.40% and M4–10.93%. Palmitic acid (C16:0) from 1.40% for medium M4 to 4.76% for M2, palmitoleic acid (C16:1): 1.06% (M1)—2.62% (M2), arachidic acid (C20:0): 0.98% (M2)—1.55% (M4) and behenic acid (C22:0): 0.90% (M4)—2.42% (M3) were also identified. The content of myristic acid (C14:0) in the total pool of all fatty acids did not exceed 0.91%.

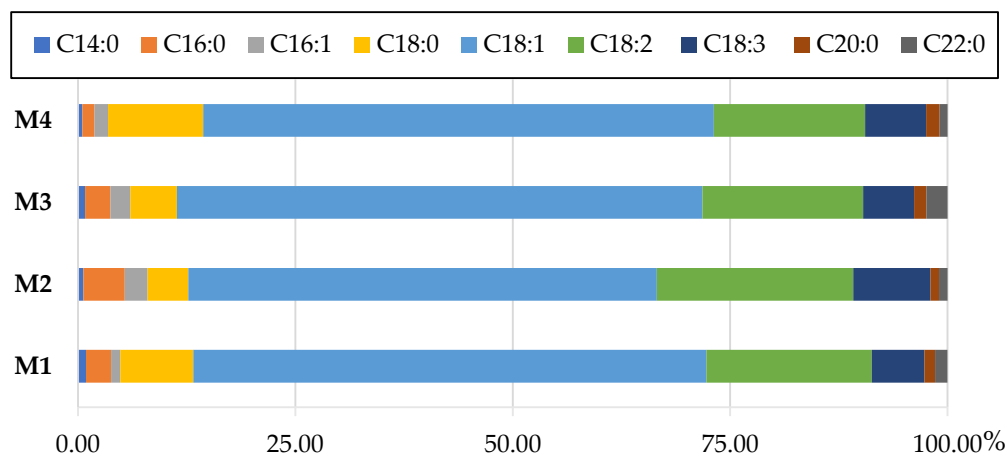


Figure 3. Fatty acid composition [% w/w] of cellular lipids in *Y. lipolytica* KKP 379 grown in M1, M2, M3 and M4 medium with 5% rapeseed waste post-frying oil as a carbon source.

4. Discussion

4.1. Lipid Production in Phosphorus-Limited Media

Phosphorus is one of the basic elements for the cultivation of microorganisms, including oleaginous ones. Due to its incorporation into phospholipids, nucleic acids or coenzymes, the analyzed component has been considered crucial for the structure of yeast cells as well as their functioning. Phosphorus may also be stored as polymetaphosphate in biomass. Interestingly, the non-conventional yeast *Y. lipolytica* contains nearly half as much phosphorus compared to the common yeast species *Sacharomyces cerevisiae* [39].

According to Wu et al. [31], phosphorus limitation has the potential to be used as a regulator of lipid production by microorganisms, also in the presence of nitrogen-rich media. In other words, this approach provides new opportunities for microbial lipid biosynthesis in a more economical manner, due to the use of complex waste materials as a carbon source. Before the rapeseed oil after fish frying was used as substrate, in the present experiment, it was mechanically purified from the residue of the fried product suspended in it. In view of the above, the waste was not a source of nitrogen, but only a lipid carbon source. Taskin et al. [29] were the first to attempt to investigate the potential of cheese whey as a substrate for microbial oil production by *Y. lipolytica* B9. The analyzed by-product consisting of nearly 93% water and about 7% dry matter is particularly rich in phosphorus. One of the factors examined was the effect of supplementation of KH_2PO_4 as an additional phosphorus source on biomass growth and lipid accumulation levels. Similar to the current study, the authors found that phosphorus limitation increased the lipid content in yeast cells. The additional phosphorus source significantly decreased the efficiency of lipid substance accumulation in yeast cells compared to the medium without supplementation, when the efficiency was 44% on a dry weight basis. The addition of 1 and 2 g/dm³ KH_2PO_4 contributed to a cellular lipid content of 37 and 26%, respectively.

The effect of limiting access to mineral salts including potassium phosphate on SCO production by *Y. lipolytica* yeast was also studied by Hoarau et al. [35]. In the study, waste produced by ethanol distilleries named Distillery Spent Wash (DSW) was used. After all, the lipid accumulation efficiency was only 9.15% using a medium with 7.0 g/dm³ KH₂PO₄ and DSW. Moreover, phospholipids accounted for 34% of all lipids. However, this accumulation efficiency result was higher compared to the culture when raw DSW was used without additional phosphate supplementation (7.18%). The addition of 7 g/dm³ KH₂PO₄ and 1.5 g/dm³ MgSO₄ to the culture medium resulted in the highest biomass yield of 7.34 g_{d.m.}/dm³. It is worth noting that the best growth of *Y. lipolytica* yeast was in DSW with the addition of KH₂PO₄ in the range of 7.5–8.0 g/dm³. The results of the current study appear to be consistent. Using M4 medium with 7.0 g/dm³ KH₂PO₄, 1.5 g/dm³ MgSO₄ and 4 g/dm³ (NH₄)₂SO₄, the biomass yield was 7.45 g_{d.m.}/dm³, but it was not the highest score. The yeast showed the best growth in medium with limiting additions of phosphorus source, 3.0 g/dm³ KH₂PO₄ and 1.1 g/dm³ Na₂HPO₄, with a relatively higher nitrogen source addition.

A valuable experiment was conducted by Wu et al. [31], whose results, similar to the current work, showed that better microbial lipid production efficiency correlated with low phosphorus source doses and higher C/P molar ratio. When yeast *R. toruloides* Y4 was cultivated in the medium with 3.6 g/L of KH₂PO₄ and 70 g/dm³ initial glucose content, which corresponded to a C/P molar ratio of 72:1, after 96 h of batch shaking the flask biomass yield was 18.6 g_{d.m.}/dm³ with a lipid content of 21.2%. Moreover, enhancing the limitation of phosphorus source to C/P = 9552:1 resulted in improved SCO production to 62.1% and better biomass growth of 19.4 g_{d.m.}/dm³. Surprisingly, when the nitrogen source was additionally restricted (C/N = 22.3:1), the accumulation efficiency was 63.3% with a biomass yield of 19.9 g_{d.m.}/dm³. Under phosphorus-limiting conditions, lipid efficiency was consistently close to 60%, even when C/N = 6.1:1 [31].

In the present experiments, the results of the flask-shaken cultures show that the level of KH₂PO₄ supplementation appeared to be a significant factor affecting the lipid accumulation efficiency, in contrast to the addition of nitrogen source in the form of (NH₄)₂SO₄, for which no significant relationship was found over the concentration range studied. In a batch culture in a bioreactor, the highest efficiency of cellular lipid production by *Y. lipolytica* yeast has been observed for M1 medium, in which C/P was 114.9:1 and C/N = 71.8:1. However, in bioreactor culture mode, a comparable relationship was not found for the impact of the molar ratio C/P. At a C/P of 114.9, both the highest and lowest microbial lipid production among all substrates was obtained. Under the established conditions, this nitrogen addition was significant. In the experiment of Fabiszewska et al. [2], *Y. lipolytica* yeast cultured in YPG medium with high nitrogen content and therefore low C/N ratio did not produce SCO. This is in contrast to mineral media with glucose (MG7) and olive oil (MO7), where the conversion yield of storage lipids per biomass was 0.116 and 0.207 g/g_{d.m.}. These could be further examples that confirm the role of nitrogen limitation in culture medium.

4.2. Lipid Production in Nitrogen-Limited Media

Nitrogen is considered to be a special component, the limited amount of which in the medium has the greatest effect on the induction of lipogenesis in the cells of oil-producing species. In other words, when the culture medium is deficient in nitrogenous compounds or when its pool is depleted, the synthesis of nucleic acids and proteins is inhibited and the rate of biomass growth decreases [40]. According to Bellou et al. [32], in addition to magnesium limitation, the restriction of cellular access to nitrogen is the factor for efficient cellular lipid biosynthesis. Continuous culture of the wild yeast strain *Y. lipolytica* ACA-DC50109 resulted in an accumulation efficiency of 47.5% with a biomass yield of 12.2 g/L. Furthermore, lipid accumulation at high levels was provided by low nitrogen doses, but at levels that allowed *Y. lipolytica* yeast cells to grow. This correlation was related to the maintenance of the pentose-phosphate pathway properly function, which provides the coenzyme NADPH for the mechanism of lipogenesis. For this reason, understanding

the physiology of oleaginous microorganisms is of great importance in efficient cellular lipids production.

Inorganic $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was the only source of nitrogen in the present study. The current experiment assumed the use of a medium containing only mineral components, excluding the carbon source. There are reports that the presence of organic nitrogen sources in the medium may stimulate microbial synthesis of lipid components [41,42]. Neither the preliminary study stage nor the bioreactor experiments proved a clear relationship between efficient cellular lipid accumulation via ex novo pathway and the level of nitrogen supplementation. In M3 medium ($10 \text{ g/dm}^3 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), the lipid accumulation efficiency was 32.67%, while in M2 ($8 \text{ g/dm}^3 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) it was only 20.90%. It is worth noting that in the medium with a lower dose of ammonium sulfate the biomass yield reached more than twice the value (Table 3). When the low addition of a nitrogen source in the M4 culture medium was compensated by a higher level of a phosphorus source, the accumulation efficiency was close to that for the phosphorus-limited M3 medium. This result further strengthened the hypothesis that the ratio of the two analyzed elements nitrogen and phosphorus can be considered an important factor for both yeast cell growth and lipid accumulation capacity.

The oil-producing species of the yeast *Trichosporon oleaginosus*, in the presence of xylose and limited access to nitrogen compounds, accumulated over 50% of lipids in the dry mass of cells. The type of limitation used (-N, -C and -CN) had a significant effect on the fatty acid profile of the oil extracted from yeast cells. The content of linoleic acid (C18:2 in the -cis configuration) showed the greatest variation depending on the conditions applied. When the researchers limited the access of the cells to nitrogen and carbon, the C18:2 content was 7.31% and 7.45% (*w/w*), respectively. When carbon source limitation was applied alone, the content of linoleic acid (as the main component of the cell membrane) increased threefold, accounting for 21.58% of all fatty acids [43]. In the current study, the linoleic acid content of the extracted oils was a maximum of 22.58% of total fatty acids. Notably, nutritionally valuable linolenic acid was present in each of the oil samples, with the highest percentage from M2 cultivation.

In the experiment, the highest percentage of SCO production by *Y. lipolytica* yeast was obtained for culture medium with $3.0 \text{ g/dm}^3 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $3.0 \text{ g/dm}^3 \text{KH}_2\text{PO}_4$ and molar ratios of C/P = 114.9:1 and C/N = 71.8:1. A molar C/N ratio of 20:1 is considered to be the minimum for promoting lipid accumulation in oleaginous yeast cells [44], in the experiment, was not lower than 21.5. As found, simultaneous limited access to phosphorus and nitrogen promoted lipid accumulation, but inhibited biomass growth. When the nitrogen dose was increased, with the phosphorus dose unchanged (M2), yeast growth was improved, but the efficiency of the biosynthesis of lipids was significantly reduced. The decreased nitrogen-to-phosphorus ratio (N/P = 3,8:1) in M3 medium, compared to M2 medium (N/P = 4.3:1), resulted in half the biomass yield with 32% cellular lipid accumulation efficiency. Under different conditions, when the reduced nitrogen rate was accompanied by increased cell access to phosphorus sources in the culture medium (M4—N/P = 1:1), growth needs were met, resulting in one of the best biomass yields of $7.45 \text{ g}_{\text{d.m.}}/\text{dm}^3$ with satisfactory SCO production efficiency. It can be summarized that phosphorus is needed by cells for growth, but in this context nitrogen is crucial.

Nevertheless, a greater addition of phosphorus source to a nitrogen-deficient medium may lead to the accumulation of higher storage lipid yields without negative effects on growth caused by reduced access to nitrogen. Both bioreactor experiments and preliminary studies emphasized the role of phosphorus as a substrate component in metabolic processes related to the basic metabolism of the yeast cell and SCO biosynthesis. Still, the role of phosphorus in combination with the issue of media supplementation with a nitrogen source needs further studies.

Using a C/N ratio of 30:1 led to an increase in saturated fatty acid production and a decrease in polyunsaturated fatty acids in *Y. lipolytica* yeast cells. The application of additional phosphorus limitation (C/P = 1043:1) in the medium did not alter the fatty acid group content of total lipid acids observed previously. Similar to the current experiment, total lipid content increased under limiting conditions, but did not exceed 30%. The highest biomass yield (over 7 g_{d.m.}/dm³) was achieved for culture in medium with C/N = 30:1, without limiting phosphorus source (C/P = 6:1) [33].

Microbial oil accumulated in lipid bodies consists mainly of TAG and steryl-esters in smaller amounts (neutral fractions), which are enclosed by polar fractions, e.g., phospholipids, glycolipids, and sphingolipids. Generally, the growth of oleaginous microorganisms may be divided into two phases. When cells grow in media rich in all the nutrients necessary for growth, biomass, also free of lipids, is produced. During this phase, lipids with a higher proportion of polar fractions, corresponding to cell membrane lipids, are accumulated. In a situation of limited access to sources such as nitrogen, phosphorus or sulfate, the lipid accumulation phase is stimulated, mainly of neutral fractions [40].

4.3. Cellular Oxygen Demand in Microbial Lipid Production

Based on the authors' knowledge, there is no clear statement on the effect of the oxygenation degree on the efficiency of lipid accumulation. The link between dissolved oxygen in the medium and accumulation capacity by *Y. lipolytica* yeast is inconclusive. However, as a result of thought-provoking observations, the issue of oxygen demand by *Y. lipolytica* yeast appeared to be worth exploring. The concentration of oxygen available in the culture medium is a crucial variable in both the context of growth and efficient microbial lipid production by strictly aerobic yeast *Y. lipolytica*. It is predicted that an increase in substrate oxygenation may result in the stimulation of cells for growth [45].

The observations highlight the importance of the cellular oxygen demand in relation to growth, but also to the process of cellular lipid accumulation. Despite the negligible increase in biomass yield, the yeast still efficiently used oxygen from the substrate, which could be related to the intensively occurring process of lipid biosynthesis. Interestingly, it may be reasonably assumed that the cells should be exposed to a sufficiently high concentration of oxygen in the medium. Nevertheless, too high a concentration of dissolved oxygen may cause inhibition of cellular metabolism resulting from oxidative stress. Given the need to maintain an appropriate degree of oxygenation of the culture medium, agitation rate is an important parameter. Under conditions of increased cellular oxygen demand, high agitation rate is used. As is widely known, this kind of approach may have negative consequences. High shear forces and mechanical stress may make culture development impossible [46]. Therefore, despite the increase in cellular oxygen demand in bioreactor cultures, the set amplitude of the agitator rotation was not able to meet the demand of the yeast.

According to Bellou et al. [47], high dissolved oxygen (1.5 mg/dm³) in the culture media stimulates cellular lipid synthesis. Upregulation of ATP-citrate lyase (ATP-CL) and malic enzyme (ME), which are involved in microbial lipid synthesis, was observed under such conditions. The importance of malic enzyme for cellular metabolism of oleaginous microorganisms including *Y. lipolytica* yeast has been recognized as crucial. The product of reaction catalyzed by ME gives the product necessary for fatty acid synthesis, namely, coenzyme NADPH. Under conditions of limited access of cells to nitrogenous compounds, NADPH is produced only by enzymatic reactions involving ME. Conversely, increasing the dissolved oxygen concentration resulted in a decrease in NAD-dependent isocitrate dehydrogenase enzyme activity. When the Krebs cycle is inhibited due to the depletion of nitrogen sources by the cells and allosteric AMP (adenosinemonophosphate) activator concentrations being reduced, ICDH is deactivated. This phenomenon is considered to be characteristic of the de novo biosynthesis pathway [48]. When yeast cultures were conducted in glucose medium, it was observed that limited cellular access to phosphorus, as with nitrogen, results in a reduction in AMP levels to activate cellular phosphorus reserves.

There are two strategies to maximize cellular lipid accumulation. The first one, by deleting genes encoding for acyl-oxidase activity, assumes the prevention of the degradation of storage lipids [49]. The second one aims to support the production via the over-expression of genes encoding for ATP-CL and ME activity [50,51]. Wasylenko et al. [52] using ^{13}C -Metabolic Flux Analysis singled the oxidative pentose-phosphate pathway out as the main source of lipogenic coenzyme NADPH rather than malic enzyme activity. In view of the above, the purpose for research on the role of phosphorus as a coenzyme component in processes related to cellular respiration and provision of energy necessary for SCO biosynthesis has been justified.

Many mechanisms and interactions accompanying the accumulation of lipid compounds via the de novo pathway have been recognized. Nevertheless, there is still a need to search for physiological and biochemical relationships that can explain, and thus support, efficient ex novo biosynthesis. The authors of this paper hypothesized a way in which the de novo and ex novo pathways could be related. The dissimilated fatty acids are degraded in the first step, which is mitochondrial β -oxidation. This process provides the energy necessary for cell growth and development by generating 1 mole of FADH and 1 mole of NADH per every 1 mole of acetyl-CoA produced before it is diverted to the Krebs cycle. Energy is also required for the production of intermediate metabolites [40]. Dissolved fatty acids after entering the cell are degraded in the first step, which is β -oxidation in peroxisomes (Figure 4). β -oxidation is a cyclic process that will be repeated until the lipid substrate is completely broken down. However, there is an anomaly to the cycle, leakage of certain fatty acids from the pathway could be observed, which may be stored in lipid bodies in the next step [48].

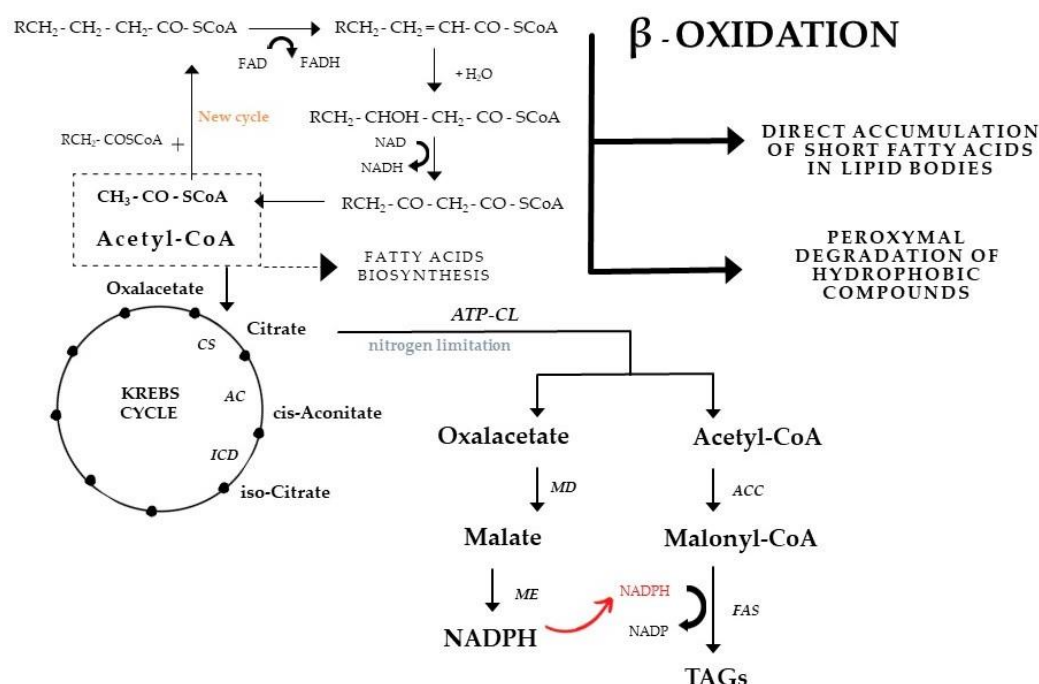


Figure 4. A hypothetical combination of de novo and ex novo pathways of cellular lipid biosynthesis in media with hydrophobic carbon sources. CS—citrate synthase, AC—aconitase, ICD—iso-citrate dehydrogenase, ATP-CL—ATP-citrate lyase, MD—malate dehydrogenase, ME—malic enzyme, ACC—acetyl-CoA carboxylase, FAS—fatty acid synthetase. From [40], adapted.

5. Conclusions

To conclude, the results of the current research suggest that nitrogen limitation in culture media is crucial, but additional phosphorus limitation may further improve the efficiency of microbial lipid biosynthesis. To the authors' current knowledge, phosphorus is a component of the culture medium, which still needs to be investigated in relation to the

optimal level of its limitation in media stimulating SCO biosynthesis. In particular, evaluating the effect of the level of simultaneous substrate supplementation with phosphorus, nitrogen and the ratio of these two components seems to be one of the key issues in the context of efficient microbial lipid production combined with satisfactory biomass yield. Knowledge of the role of phosphorus as a component of coenzymes essential for a number of biochemical transformations occurring in yeast cells may prove crucial to improving microbial lipid biosynthesis and simultaneously supporting biomass growth, as well as considering respiratory processors. Further studies aimed at looking for strategies to stimulate microbial lipid biosynthesis via the *ex novo* pathway are worthy of consideration, as most of the available research work involves the *de novo* pathway. The approach is important for the basic research and from the practical points of view, especially if the possibility of oily waste applicability as a substrate in microbial culture is considered.

Author Contributions: Conceptualization, K.W.; Methodology, K.W., A.F., D.N. and B.Z.; Formal analysis, K.W. and A.F.; Investigation, K.W., A.F., D.N. and B.Z.; Resources, A.F. and D.N.; Data Curation, K.W.; Writing—Original Draft Preparation, K.W.; Writing—Review & Editing, A.F. and B.Z.; Visualization, K.W.; Supervision, D.N. and A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was financially supported by sources of the Ministry of Education and Science within funds of the Institute of Food Sciences of Warsaw University of Life Sciences (WULS), for scientific research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Beopoulos, A.; Cescut, J.; Haddouche, R.; Uribealrea, J.L.; Molina-Jouve, C.; Nicaud, J.M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48*, 375–387. [\[CrossRef\]](#)
2. Fabiszewska, A.; Misiukiewicz-Stępień, P.; Paplińska-Goryca, M.; Zieniuk, B.; Białecka-Florjańczyk, E. An insight into storage lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules* **2019**, *9*, 685–697. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Groenewald, M.; Boekhout, T.; Neuvéglise, C.; Gaillardin, C.; van Dijck, P.W.; Wyss, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 187–206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Martínez, E.J.; Raghavan, V.; González-Andrés, F.; Gómez, X. New biofuel alternatives: Integrating waste management and single cell oil production. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 9385–9405. [\[CrossRef\]](#)
5. Pawar, P.P.; Odaneth, A.A.; Vadgama, R.N.; Lali, A.M. Simultaneous lipid biosynthesis and recovery for oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Papanikolaou, S.; Chevalot, I.; Galiotou-Panayotou, M.; Komaitis, M.; Marc, I.; Aggelis, G. Industrial derivative of tallow: A promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 425–435. [\[CrossRef\]](#)
7. Cheirsilp, B.; Louhasakul, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 329–337. [\[CrossRef\]](#)
8. Bharathiraja, B.; Sridharan, S.; Sowmya, V.; Yuvaraj, D.; Praveenkumar, R. Microbial oil—A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresour. Technol.* **2017**, *233*, 423–432. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Subramaniam, R.; Dufreche, S.; Zappi, M.; Bajpai, R. Microbial lipids from renewable resources: Production and characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 1271–1287. [\[CrossRef\]](#)
10. Ratledge, C.; Wynn, J.P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **2002**, *51*, 1–52. [\[PubMed\]](#)
11. Lopes, M.; Gomes, A.S.; Silva, C.M.; Belo, I. Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. *J. Biotechnol.* **2018**, *265*, 76–85. [\[CrossRef\]](#)
12. Ji, X.J.; Ledesma-Amaro, R. Microbial lipid biotechnology to produce polyunsaturated fatty acids. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 832–834. [\[CrossRef\]](#)
13. Patel, A.; Pruthi, V.; Pruthi, P.A. Synchronized nutrient stress conditions trigger the diversion of CDP-DG pathway of phospholipids synthesis towards *de novo* TAG synthesis in oleaginous yeast escalating biodiesel production. *Energy* **2017**, *139*, 962–974. [\[CrossRef\]](#)
14. Fabiszewska, A.U.; Kotyrba, D.; Nowak, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Ann. Microbiol.* **2015**, *65*, 1495–1503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Papanikolaou, S.; Muniglia, L.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Marc, I. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Curr. Microbiol.* **2003**, *46*, 124–130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

16. Gajdos, P.; Nicaud, J.M.; Rossignol, T.; Čertík, M. Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 8065–8074. [CrossRef] [PubMed]
17. Qin, L.; Liu, L.; Zeng, A.P.; Wei, D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 1507–1519. [CrossRef]
18. Lopes, M.; Miranda, S.M.; Belo, I. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production—A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2020**, *50*, 2583–2616. [CrossRef]
19. Liu, X.; Lv, J.; Xu, J.; Zhang, T.; Deng, Y.; He, J. Citric acid production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b yeast when grown on waste cooking oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 2347–2356. [CrossRef]
20. Xiaoyan, L.; Yu, X.; Lv, J.; Xu, J.; Xia, J.; Wu, Z.; Zhang, T.; Deng, Y. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food Bioprod. Process.* **2017**, *103*, 86–94. [CrossRef]
21. Nunes, P.M.B.; Martins, A.B.; Brigida, A.I.S.; Rocha Leao, M.H.M.; Amaral, P. Intracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using different carbon sources. *Chem. Eng. Trans.* **2014**, *38*, 421–426.
22. Lopes, M.; Miranda, S.M.; Alves, J.M.; Pereira, A.S.; Belo, I. Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2019**, *121*, 1800188–1800196. [CrossRef]
23. El Bialy, H.; Gomaa, O.M.; Azab, K.S. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 2791–2798. [CrossRef]
24. Katre, G.; Joshi, C.; Khot, M.; Zinjarde, S.; RaviKumar, A. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express* **2012**, *2*, 36–49. [CrossRef] [PubMed]
25. Tzirita, M.; Papanikolaou, S.; Chatzifragkou, A.; Quilty, B. Waste fat biodegradation and biomodification by *Yarrowia lipolytica* and a bacterial consortium composed of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida*. *Eng. Life Sci.* **2018**, *18*, 932–942. [CrossRef]
26. Wierzchowska, K.; Zieniuk, B.; Fabiszewska, A. Use of Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* in Treatment or Upgradation of Hydrophobic Industry Wastes. *Waste Biomass Valorization* **2021**, 1–23. Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-021-01516-9> (accessed on 9 December 2021).
27. Ratledge, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 1047–1050. [CrossRef]
28. Ratledge, C.; Cohen, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* **2008**, *20*, 155–160. [CrossRef]
29. Taskin, M.; Sagharian, A.; Aydogan, M.N.; Arslan, N.P. Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **2015**, *9*, 595–605. [CrossRef]
30. Gill, C.O.; Hall, M.J.; Ratledge, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *33*, 231–239. [CrossRef]
31. Wu, S.; Hu, C.; Jin, G.; Zhao, X.; Zhao, Z.K. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 6124–6129. [CrossRef]
32. Bellou, S.; Triantaphyllidou, I.E.; Mizerakis, P.; Aggelis, G. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *J. Biotechnol.* **2016**, *234*, 116–126. [CrossRef]
33. Kolouchová, I.; Maťátková, O.; Sigler, K.; Masák, J.; Řezanka, T. Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiol.* **2016**, *61*, 431–438. [CrossRef]
34. Huang, X.; Luo, H.; Mu, T.; Shen, Y.; Yuan, M.; Liu, J. Enhancement of lipid accumulation by oleaginous yeast through phosphorus limitation under high content of ammonia. *Bioresour. Technol.* **2018**, *262*, 9–14. [CrossRef]
35. Hoarau, J.; Petit, T.; Grondin, I.; Marty, A.; Caro, Y. Phosphate as a limiting factor for the improvement of single cell oil production from *Yarrowia lipolytica* MUCL 30108 grown on pre-treated distillery spent wash. *J. Water Process Eng.* **2020**, *37*, 101392. [CrossRef]
36. Timoumi, A.; Guillouet, S.E.; Molina-Jouve, C.; Fillaudeau, L.; Gorret, N. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3831–3848. [CrossRef] [PubMed]
37. AOAC. *International Official Methods of Analysis*, 17th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2000; Volume 2.
38. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [CrossRef]
39. Michalik, B.; Biel, W.; Lubowicki, R.; Jacyno, E. Chemical composition and biological value of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol. *Can. J. Anim. Sci.* **2014**, *94*, 99–104. [CrossRef]
40. Papanikolaou, S.; Aggelis, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 1031–1051. [CrossRef]
41. Beopoulos, A.; Mrozova, Z.; Thevenieau, F.; Le Dall, M.T.; Hapala, I.; Papanikolaou, S.; Chardot, T.; Nicaud, J.M. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7779–7789. [CrossRef]
42. Tsigie, Y.A.; Wang, C.Y.; Truong, C.T.; Ju, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 9216–9222. [CrossRef] [PubMed]
43. Santek, M.I.; Miskulin, E.; Petrovic, M.; Beluhan, S.; Santek, B. Effect of carbon and nitrogen source concentrations on the growth and lipid accumulation of yeast *Trichosporon oleaginosus* in continuous and batch culture. *J. Soc. Chem. Ind.* **2017**, *92*, 1620–1629.
44. Dobrowolski, A.; Mituła, P.; Rymowicz, W.; Mironczuk, A.M. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* **2016**, *207*, 237–243. [CrossRef] [PubMed]
45. Magdoui, S.; Brar, S.K.; Blais, J.F. Morphology and rheological behaviour of *Yarrowia lipolytica*: Impact of dissolved oxygen level on cell growth and lipid composition. *Process Biochem.* **2018**, *65*, 1–10. [CrossRef]

-
46. Alonso, F.O.M.; Oliveira, E.B.L.; Dellamora-Ortiz, G.M.; Pereira-Meirelles, F.V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Braz. J. Chem. Eng.* **2005**, *22*, 9–18. [[CrossRef](#)]
 47. Bellou, S.; Makri, A.; Triantaphyllidou, I.E.; Papanikolaou, S.; Aggelis, G. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology* **2014**, *160*, 807–817. [[CrossRef](#)]
 48. Beopoulos, A.; Nicaud, J.M. Yeast: A new oil producer? *Oléagineux Corps Gras Lipides* **2012**, *19*, 22–28. [[CrossRef](#)]
 49. Dulermo, T.; Nicaud, J.M. Involvement of the G3P shuttle and oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 482–491. [[CrossRef](#)]
 50. Blazeck, J.; Hill, A.; Liu, L.; Knight, R.; Miller, J.; Pan, A.; Otoupal, P.; Alper, H.S. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3131. [[CrossRef](#)]
 51. Zhang, H.; Zhang, L.; Chen, H.; Chen, Y.Q.; Chen, W.; Song, Y.; Ratledge, C. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: Citrate lyase from *Mus musculus*. *J. Biotechnol.* **2014**, *192*, 78–84. [[CrossRef](#)]
 52. Wasylenko, T.M.; Ahn, W.S.; Stephanopoulos, G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* **2015**, *30*, 27–39. [[CrossRef](#)]



Is There Any Possibility to Use Ultrasounds, High-Pressure Homogenization or Pulsed Electric Field in Single Cell Oil Release from Oleaginous Yeast Cells? [†]

Katarzyna Wierzchowska ^{1,2} , Aleksandra Musiałek ³, Bartłomiej Zieniuk ¹ , Karina Jasińska ^{1,2} ,
Dorota Nowak ² and Agata Fabiszewska ^{1,*}

¹ Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159c Nowoursynowska St., 02-776 Warsaw, Poland

² Department of Food Engineering and Process Management, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159c Nowoursynowska St., 02-776 Warsaw, Poland

³ Faculty of Biology and Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warsaw, Poland

* Correspondence: agata_fabiszewska@sggw.edu.pl; Tel.: +48-22-59-37-621

[†] Presented at the 3rd International Electronic Conference on Foods: Food, Microbiome, and Health—A Celebration of the 10th Anniversary of Foods' Impact on Our Wellbeing, 1–15 October 2022; Available online: <https://sciforum.net/event/Foods2022>.

Abstract: Microbial oil (SCO) is lipids accumulated in the cells of oleaginous microorganisms, including yeast, in amounts exceeding 20% of dry mass. These are a valuable source of fatty acids in the human diet. In order to facilitate the extraction of storage lipids from cells, methods of physical and chemical pre-treatment of biomass are used to break the barrier of the cell wall and membrane of these microorganisms to the action of organic solvents, which are used during traditional extraction. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of unconventional methods of extracting microbial oil from *Yarrowia lipolytica* yeast cells. Pulsed electric field (PEF), cell disintegration by ultrasonic waves and high-pressure homogenization (HPH) were used. The use of unconventional methods turned out to be ineffective in the extraction of intracellular lipids of the yeast compared to methods involving organic solvents such as chloroform, methanol and hexane. Nevertheless, the use of a pulsed electric field with a field strength of 200 J/g or high-pressure homogenization (1100 bar) proved to be effective as pre-treatment techniques of *Y. lipolytica* yeast cells (cell permeabilization) for the high yield extraction of intracellular lipids using the extraction method with organic solvents.

Keywords: HPH; PEF; ultrasounds; *Yarrowia lipolytica*; microbial oil



Citation: Wierzchowska, K.; Musiałek, A.; Zieniuk, B.; Jasińska, K.; Nowak, D.; Fabiszewska, A. Is There Any Possibility to Use Ultrasounds, High-Pressure Homogenization or Pulsed Electric Field in Single Cell Oil Release from Oleaginous Yeast Cells?. *Biol. Life Sci. Forum* **2022**, *18*, 56. <https://doi.org/10.3390/Foods2022-12959>

Academic Editor: Antonello Santini

Published: 30 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Y. lipolytica yeast belongs to the oleaginous yeasts, which means that they have the ability to produce and store intracellular lipids (microbial oil) in an amount exceeding 20% dry cell mass [1]. Microbial oil is considered a valuable alternative to vegetable and fish oils. Its extraction is an important issue, because this process is usually not very efficient due to the presence of the cell wall of the microorganisms [2].

There are many methods for the pre-treatment of biological material, including methods of mechanical pre-treatment e.g., shear forces (high-speed and high-pressure homogenization, microfluidization) and direct energy transfer to cells (laser, ultrasound and microwave) [3]. Physical methods of disintegrating cell walls include decompression, osmotic shock, microwave, pulsed electric field and freeze-drying [4]. Cell permeabilization or disruption of cells can also be achieved with the use of various types of chemical compounds [4,5]. Most extraction methods for total microbial lipids involve extraction with an organic solvent such as used in the Soxhlet, Bligh and Dyer and Folch methods [6]. In this study, an attempt has been made to evaluate the impact of unconventional methods

for extracting lipids from *Y. lipolytica* yeast cells. The methods included: pulsed electric field (PEF), ultrasounds (US) and high-pressure homogenization (HPH).

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strain and Culture Conditions

The *Y. lipolytica* strain KKP 379 from the Collection of Industrial Microorganisms at the Prof. Waław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology in Warsaw (Poland) was used in the study. An inoculum culture was provided for 24 h in a YPG medium (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) on a rotary shaker at 28 °C. The appropriate cultures were produced in a BioFlo 3000 laboratory bioreactor at 28 °C for 66 h, without pH adjustment, under minimum 30% oxygenation conditions for the medium with respect to its initial concentration; agitator speed was in the range of 200–600 RPM in a mineral medium with waste post-frying oil according to the method of Fabiszewska et al. [7]. The biomass obtained after culture in the bioreactor was centrifuged (10 min, 8000 RPM), washed with 0.9% NaCl solution and frozen for further experiments.

2.2. Lipids Extraction

The dry biomass was ground, weighed and transferred to a falcon-type tube. For every 1 g of dry biomass, 10 cm³ of a chloroform:methanol mixture in 2:1 (*v/v*) ratio was added, carrying out a two-fold extraction of lipids according to the Folch method. The samples were centrifuged (10 min, 8000 RPM). After centrifugation, the obtained liquid was filtered on a filter paper strainer into a weighed round-bottom flask. This procedure was repeated four times. The solvent was evaporated. For the determination of lipid content in solutions after treating cells with ultrasound, PEF or HPH, the procedure was identical, with the addition of 10 cm³ of the solvent mixture for every 20 cm³ of solution. To evaluate the effect of permeabilization on Folch-extracted lipids, yeast biomass was shaken with hexane for 60 min at room temperature, the solvent evaporated, and the biomass subjected to a Folch extraction.

2.3. Non-Conventional Methods for Yeast Cell Treatment

The unfrozen yeast cells were suspended in saline. The resulting solutions were sonicated using a Hielscher UP400S ultrasonic homogenizer (Hielscher, Teltow, Germany) for 10 min under the conditions shown in Table 1.

Table 1. Parameters of sonication.

No.	Yeast Content in Solution [% <i>m/v</i>]	Cycle ¹ [%]	Amplitude [µm]
1	10	100	105
2	30	100	105
3	10	100	210
4	30	100	210
5	10	50	105
6	30	50	105
7	10	50	210
8	30	50	210

¹ the percentage of the experiment duration that has been used for the sonication.

Yeast cells were also treated with PEF according to the conditions shown in Table 2. For this purpose, the conductivity of the solutions were measured, and then the cells were transferred to the chamber of the Elea GmbH (Quakenbrück, Germany) pulsed electric field application system.

Table 2. Conditions for the application of a pulsed electric field.

Form of Yeast Cell Biomass	Yeast Content in Saline Solution [% <i>m/v</i>]	Electrical Conductivity of the Solution [ms/cm]	Average Energy at Individual PEF Application [J/g]	Electric Voltage [kV]	No. of Pulses
Lyophilized	4	2.300	420.00	10	600
Raw	4	0.821	200.00	10	52,000

A 25% (*m/v*) suspension of yeast cells was passed through a Niro Soavi NS 1001 L2 PANDA high-pressure homogenizer (GEA, Parma, Italy) under the variable pre-treatment conditions shown in Table 3.

Table 3. Conditions for yeast treatment with high pressure homogenization.

No.	Pressure [bar]	Times Yeast Treated by HPH
1	300	1
2	300	2
3	150	1
4	700	1
5	1100	10

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses of repeated measurements was performed with the one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test using STATISTICA 13.3 (Statsoft, Kraków, Poland). Any *p*-values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

Figure 1a shows the average content of microbial oil extracted from the solution after ultrasonic disintegration of *Y. lipolytica* yeast KKP 379. For the control sample, which was not treated with ultrasound, microbial oil was not detected in the yeast solution. It should be noted that sample 1. had the highest percentage of extracted oil, followed by samples 3, 5 and 7. As in the case of extraction from dried biomass, these results indicate that the sonication process proceeded more efficiently when the concentration of suspended cells was lower (10%). It is worth noting that all sonicated samples were characterized by the presence of microbial oil in the solutions. This demonstrates that the permeabilization of yeast cell structures took place, and intracellular lipids were released into the external environment.

Preliminary experiments using a pulsed electric field (data not shown) concluded that the higher the applied average field energy the higher the extraction efficiency of microbial oil from yeast biomass and probably the better the permeabilization effect of cell structures. It would have been beneficial to use the highest electric field voltage of 17 kV, but at this value, during the initial experiment, the electric pulse application system was discharged because the conductivity of the solution was too high. In the next experiment, an electrical voltage of 10 kV and an average energy of about 100 J/g of solution was applied (Figure 1b). Non-significant differences were observed in the content of microbial oil extracted from PEF-treated and untreated freeze-dried biomass.

Figure 2 shows the average content of oil extracted from *Y. lipolytica* yeast biomass after high-pressure homogenization. It should be noted that the average contents of extracted oil from samples 1, 2 and 4 did not show a significant difference from the control sample, while the average content of lipids obtained from sample 3 was even lower compared to the control sample. The effect of extracting microbial oil into solutions from *Y. lipolytica* yeast cells subjected to high pressure homogenization was also evaluated. A small amount of microbial oil (2%) was extracted, but only from the variant with the highest applied pressure (700 bar, data not shown). Thus, it was confirmed that extraction of lipids from

HPH-treated biomass at the assumed high pressure homogenization conditions was most likely insufficient to induce perforation of *Y. lipolytica* yeast cell structures and lipid leakage.

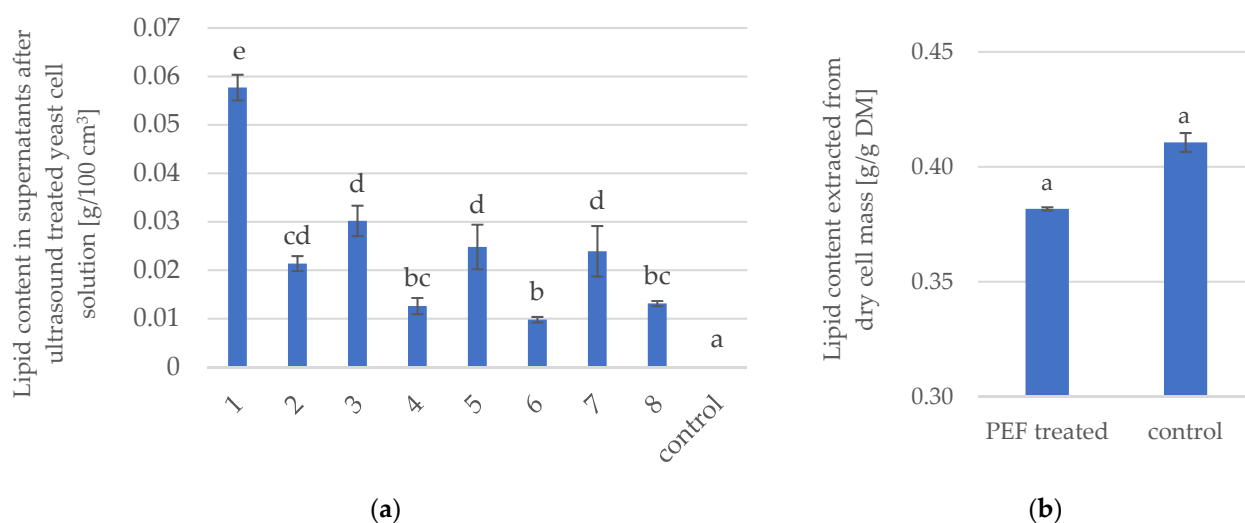


Figure 1. (a) Lipid content in supernatants after ultrasound treated yeast cells [g oil/100 cm³]. (b) Microbial oil content extracted from dry biomass of PEF-treated *Y. lipolytica* yeast. Homogeneous groups designated on the basis of Tukey's test were identified by letters and different posts. Number of treatment refers to individual process parameters according to Table 1 (a) or Table 2 (b). Control is untreated yeast cells.

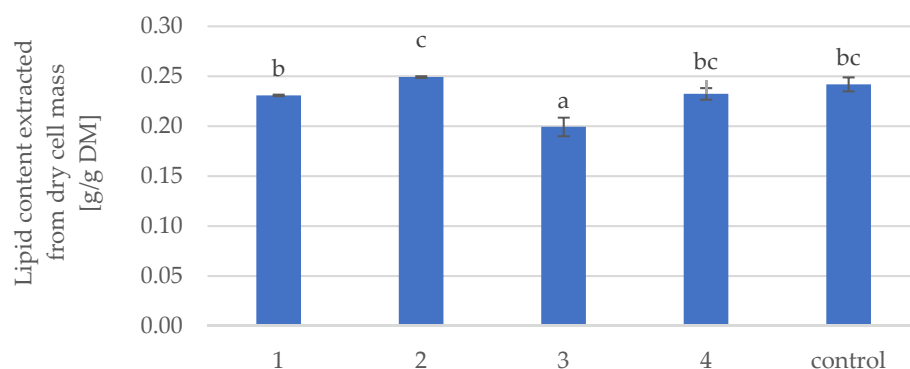


Figure 2. Average microbial oil content extracted using the Folch method from dried *Y. lipolytica* yeast biomass after high-pressure homogenization treatment according to parameters in Table 3. Homogeneous groups designated on the basis of Tukey's test were identified by letters and different posts. Control is untreated yeast cells.

Given the unsatisfactory results of intracellular lipid extraction with the methods described above, their suitability as a form of pre-treatment of yeast cells was evaluated. The degree of permeabilization of the membrane and cell wall structure was assessed by measuring the amount of lipids eluted from cells after treating them with hexane (Table 4). The application of a pulsed electric field with a field strength of 10 kV (200 J/g) (Table 2, parameters for raw biomass) and high-pressure homogenization (Table 3, 10—times application of 1100 bar pressure) proved to be effective methods for the preparation of *Y. lipolytica* yeast cells (cell permeabilization) which were subsequently used for the proper extraction of intracellular lipids with the Folch method (with a mixture of chloroform and methanol solvents).

Table 4. Impact of HPH and PEF on yeast permeabilization.

Pretreatment	Content of Extracted Intracellular Lipids [g/100 g DM]		Lipid Washout Efficiency [%]
	Total Lipids (Folch Method)	Lipids Washout (Hexane Extraction)	
-	30.1 ± 0.3 (a)	20.2 ± 0.1 (a)	67.1
PEF	36.5 ± 0.1 (b)	26.4 ± 0.1 (b)	72.3
HPH	45.7 ± 0.4 (c)	27.0 ± 0.1 (b)	59.1

Homogeneous groups designated on the basis of Tukey's test were identified by letters and different posts.

4. Discussion

Sonication is a good laboratory method for permeabilizing cell walls and releasing proteins from the cell [8]. This indicates that the use of ultrasound causes a high degree of loosening of the yeast cell wall and membrane. In the experiment, a higher degree of intracellular lipid extraction from yeast cells was achieved relative to the control, confirming that the use of ultrasound has a positive effect on destroying cell structures and improving the efficiency of microbial oil extraction, although the result was far from satisfactory.

Based on the literature, using high-pressure homogenization at 2000 bar, with 15 passes of the sample through the homogenizer, the efficiency of lipid extraction from *Saitozyma podzolica* DSM 27192 yeast cells after Folch extraction was 37.8% [9]. There are other studies that also used high-pressure homogenization against a 15% solution of *Y. lipolytica* JMY5578 yeast cells. The biomass solution was passed through a homogenizer 20 times at a pressure of 1500 bar. The conditions used resulted in an oil extraction of 83.9% from the dried biomass compared to a control of 19.8% [10]. This may indicate that the high-pressure homogenization conditions used in the present study were too mild to perforate yeast cell structures and consequently increase the efficiency of intracellular oil extraction with the Folch method. Only the use of high-pressure homogenization (10 × 1100 bar) could be considered as a method for preparing yeast biomass for proper intracellular lipid extraction.

A slightly lower, but also significant difference in microbial oil extraction relative to the control was observed in the sample after application of pulsed electric field action. As reported in the literature, other experiments using pulsed electric field also increased the extraction efficiency of microbial oil from dry biomass, but not as significantly as other techniques. In one study, the average content of intracellular fats extracted from dry biomass after PEF application increased from 19.8% to 29.4% [10]. The use of this method probably allowed permeabilization and/or disintegration of yeast cell walls and membranes, resulting in a slight increase in extraction efficiency relative to the control.

5. Conclusions

The use of unconventional methods under the described parameters (ultrasound treatment, pulsed electric field and high-pressure homogenization) was ineffective in the extraction of intracellular lipids of the yeast compared to methods involving organic solvents such as chloroform, methanol and hexane. Nevertheless, the use of a pulsed electric field with a field strength of 200 J/g or high-pressure homogenization (10 × 1100 bar) proved to be effective as pre-treatment techniques of *Y. lipolytica* yeast cells (cell permeabilization) for the high yield extraction of intracellular lipids using the extraction method with organic solvents.

Author Contributions: Conceptualization, K.W. and A.F.; methodology, K.W., A.F., D.N. and A.M.; formal analysis, K.W., A.F. and A.M.; investigation, K.W., A.M. and D.N.; resources, A.F.; writing—original draft preparation, K.W.; writing—review and editing, K.W., A.F., B.Z.; visualization, A.M.; supervision, A.F., B.Z. and K.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was financially supported by sources of the Ministry of Education and Science within funds of the Institute of Food Sciences of Warsaw University of Life Sciences (WULS), for scientific research.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge Ewa Domian and Artur Wiktor (Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences) for kindly lending the scientific equipment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Groenewald, M.; Boekhout, T.; Neuvéglise, C.; Gaillardin, C.; van Dijck, P.W.; Wyss, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 187–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kot, A.M.; Błażej, S.; Kurcz, A.; Gientka, I. Drożdże jak o potencjalne źródło tłuszczu mikrobiologicznego. *Postępy Mikrobiologii (Adv. Microbiol.)* **2015**, *54*, 364–373.
3. Patel, A.; Karageorgou, D.; Rova, E.; Katapodis, P.; Rova, U.; Christakopoulos, P.; Matsakas, L. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. *Microorganisms* **2020**, *8*, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ochsenreither, K.; Glück, C.; Stressler, T.; Fischer, L.; Syldatk, C. Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Geciova, J.; Bury, D.; Jelen, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—A review. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 541–553. [[CrossRef](#)]
6. Zainuddin, M.F.; Fai, C.K.; Ariff, A.B.; Rios-Solis, L.; Halim, M. Current Pretreatment/Cell Disruption and Extraction Methods Used to Improve Intracellular Lipid Recovery from Oleaginous Yeasts. *Microorganisms* **2021**, *9*, 251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fabiszewska, A.U.; Zieniuk, B.; Kozłowska, M.; Mazurczak-Zieniuk, P.M.; Wołoszynowska, M.; Misiukiewicz-Stępień, P.; Nowak, D. Studies on Upgradation of Waste Fish Oil to Lipid-Rich Yeast Biomass in *Yarrowia lipolytica* Batch Cultures. *Foods* **2021**, *10*, 436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kapturowska, A.; Stolarzewicz, I.; Chmielewska, I.; Białecka-Florjańczyk, E. Ultradźwięki—narzędzie do inaktywacji komórek drożdży oraz izolacji białek wewnątrzkomórkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* **2011**, *4*, 160–171. (In Polish)
9. Gorte, O.; Hollenbach, R.; Papachristou, I.; Steinweg, C.; Silve, A.; Frey, W.; Syldatk, C.; Ochsenreither, K. Evaluation of Downstream Processing, Extraction, and Quantification Strategies for Single Cell Oil Produced by the Oleaginous Yeasts *Saitozyma podzolica* DSM 27192 and *Apiotrichum porosum* DSM 27194. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Drévillon, L.; Koubaa, M.; Nicaud, J.-M.; Vorobiev, E. Cell disruption pre-treatments towards an effective recovery of oil from *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast. *Biomass Bioeng.* **2019**, *128*, 105320. [[CrossRef](#)]

Article

Concept of Batch and Fed-Batch Cultures of *Yarrowia lipolytica* as a Valuable Source of Sterols with Simultaneous Valorization of Molasses and Post-Frying Rapeseed Oil

Katarzyna Wierzchowska ^{1,2,*} , Anna Pakulska ³, Dorota Derewiaka ⁴ , Iga Piasecka ¹ , Bartłomiej Zieniuk ¹ , Dorota Nowak ²  and Agata Fabiszewska ^{1,*} 

¹ Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

² Department of Food Engineering and Process Management, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

³ Faculty of Food Technology, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

⁴ Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

* Correspondence: katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl (K.W.); agata_fabiszewska@sggw.edu.pl (A.F.)

Abstract: Food byproduct streams can potentially be transformed into value-added products such as microbial lipids in bioprocesses based on the non-conventional *Yarrowia* yeast. The effect of culture conditions of *Y. lipolytica* KKP 379 wild strain in waste media on the efficiency of lipid accumulation, fatty acid composition, presence of selected sterols, yield and elemental composition of biomass has been studied. Batch and fed-batch bioreactor cultures were carried out in media with molasses hydrolysate (MH) and post-frying rapeseed oil. It was determined that biomass grown in MH contained more minerals than in medium with rapeseed post-frying oil. Considering the PDSC study, the T_{max} of oxidation induction ranged from 10.04–26.36 min for the analyzed samples. The biomass from fed-batch cultures with MH had the highest total sterol content (68.40 mg/g_{oil}), dominated by ergosterol at 60.16 mg/g. Feeding with post-frying rapeseed oil with new doses of mineral medium promoted maintaining the cellular lipid content at a high level (30.75–31.73%) for 50 h, with maximum yield at 37.50%. The results of the experiment showed that the cellular lipid accumulation efficiency of *Y. lipolytica* yeast and the content of sterols in the cell membrane can be manipulated by selecting waste substrates and culture mode.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; microbial lipids; sterols; thermal analysis; waste valorization; molasses; post-frying rapeseed oil



Citation: Wierzchowska, K.; Pakulska, A.; Derewiaka, D.; Piasecka, I.; Zieniuk, B.; Nowak, D.; Fabiszewska, A. Concept of Batch and Fed-Batch Cultures of *Yarrowia lipolytica* as a Valuable Source of Sterols with Simultaneous Valorization of Molasses and Post-Frying Rapeseed Oil. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12877. <https://doi.org/10.3390/app122412877>

Academic Editor: Ewa Ostrowska-Ligeza

Received: 11 November 2022

Accepted: 13 December 2022

Published: 15 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The circular economy concept includes a model to support responsible management of available resources, and, thus, promotes the 10th Sustainable Development Goal (SDGs) introduced by the United Nations. Many companies around the world, as participants in the food system, use a linear management model to minimize the generation of waste as leakage in the production cycle [1]. Food waste and by-products are generated at every stage of the food procurement process. The food industry generates about 1.3 billion tons of broad-based waste annually and about 38% of food waste comes from the food processing stage. Statistics show an important environmental and ethical problem, but also an economic loss due to undeveloped resources with untapped potential [2,3].

Biotechnological valorization of agri-food industry waste is closely related to sustainable resource reuse technologies. Food side-streams could be potentially transformed into added value products by biotechnological processes based on non-conventional microorganisms, such as *Yarrowia lipolytica* yeast [4–7]. The physiological characteristics of

Y. lipolytica make the species able to utilize both simple and complex wastes as sources of carbon, nitrogen, phosphorus and other essential components [8,9].

The main byproduct of sugar mills is the brown leachate, obtained when sucrose crystals are separated in the final stage of sugar production, called molasses. Generally speaking, the production of 1 ton of raw sugar involves the production of 0.38 tons of molasses. The thick and viscous syrup consists of up to 20% (*w/w*) water and 80% (*w/w*) dry matter. Molasses contains large amounts of sucrose and reducing sugars (20–60% *w/w*), in smaller amounts of inorganic salts, nitrogenous compounds, vitamins and colour-forming substances. Because of the composition, molasses is used as a low-cost substrate necessary for yeast cell growth [10,11].

Regarding the ability of oleaginous *Y. lipolytica* cells to grow and accumulate significant amounts of microbial lipids in media with hydrophobic carbon sources, there was established, that waste cooking oils (WCOs) may be considered as an efficient source of carbon stimulating lipase activity and promoting the Single Cell Oils (SCOs) accumulation process [9,12,13]. In the food industry, microbial oils have gained popularity as additives in infant formula and animal feed. SCOs are primarily a source of triacylglycerols, sterols and sterol esters similar to those from plant sources. Monounsaturated fatty acids stand out in the fatty acid profile of microbial oils with saturated and polyunsaturated acids in smaller amounts, depending on culture conditions and medium composition. The best-known sterol of microbial origin is ergosterol, which can be present in the form of esters and free sterol. The highest content of this compound has been reported for yeasts of the genera *Saccharomyces*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* and *Torulaspora* [14,15].

The aim of the present study was a multifaceted evaluation of the concept of batch culture in comparison with fed-batch culture modes in terms of the growth and the efficiency of microbial oil accumulation by *Yarrowia lipolytica* yeast. The ability of SCOs accumulation in yeast cells over time has been analyzed, depending on culture conditions i.e., medium supplementation, to highlight the potential of yeast biomass as a source of bioactive components, the fatty acid profile and sterols content in extracted oil samples were also determined. Moreover, the oxidative stability of the extracted oils was studied.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms

The wild type yeast strain *Yarrowia lipolytica* KKP 379 from the Collection of Industrial Microorganisms Cultures belonging to Institute of Agricultural and Food Biotechnology (IAFB, Warsaw, Poland) was used in the study. The yeast strain was stored in 20% (*v/v*) glycerol solution in YPG medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at -20°C .

2.2. Culture Conditions

Inoculum culture was provided in YPG medium (yeast extract 1%, peptone 1%, glucose 1%, pH 5.0). The flasks were incubated at 28°C for 24 h with a rotation amplitude of 140 rpm. The batch and fed-batch cultures were conducted in a BIOFLO 3000 laboratory bioreactor from New Brunswick Scientific (44 Talmadge Road, Edison, NJ, USA) (28°C , 0.025% (*v/v*) inoculum) with a working volume of 4 L. The bioreactor was equipped with temperature, pH and oxygenation control. The dissolved oxygen content was measured using an oxygen electrode and regulated using compressed air to maintain the relative degree of oxygenation at a level not lower than 30% of the initial oxygen concentration (variable agitation speed 300–600 rpm). Changes in pH values were monitored using a selective electrode. Parameters for yeast cultures were calculated according to Fabiszewska et al. [16]. Culture conditions were chosen on the basis of our previous researches [4,9,16].

Media M1-b and M2-fb contained molasses 50 g/L, Na_2HPO_4 1.5 g/L and yeast extract 0.5 g/L, which were added at 0 h. Additionally, the M2-fb culture was fed with molasses hydrolysate (MH) after 16, 24, 40 and 48 h. The composition of the O1-fb medium at 0 h was as follows: KH_2PO_4 , 3.0 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8.0 g/L; Na_2HPO_4 , 2.5 g/L; MgSO_4 , 1.5 g/L; CaCl_2 , 0.15 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.16 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L; ZnSO_4 , 0.02 g/L and of

post-frying rapeseed oil, 50.0 g/L. In the next stages of O1-fb cultivation was supplemented with post-frying rapeseed oil and concentrated YNB (Yeast Nitrogen Base) (26.8 g dissolved in 250 mL) with the following composition: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.0 g/L; biotin, 2.0 $\mu\text{g/L}$; calcium pantothenate, 400 $\mu\text{g/L}$; folic acid, 2.0 $\mu\text{g/L}$; inositol, 2.0 mg/L; nicotinic acid, 400 $\mu\text{g/L}$; *p*-aminobenzoic acid, 200 $\mu\text{g/L}$; pyridoxine HCl, 400 $\mu\text{g/L}$; riboflavin, 200 $\mu\text{g/L}$; thiamine HCl, 400 $\mu\text{g/L}$; H_3BO_3 , 500 $\mu\text{g/L}$; CuSO_4 , 40 $\mu\text{g/L}$; KI, 100 $\mu\text{g/L}$; FeCl_3 , 200 $\mu\text{g/L}$; MnSO_4 , 400 $\mu\text{g/L}$; Na_2MoO_4 , 200 $\mu\text{g/L}$; ZnSO_4 , 400 $\mu\text{g/L}$; K_3PO_4 , 1.0 g/L; MgSO_4 , 0.5 g/L; NaCl, 0.1 g/L; CaCl_2 , 0.1 g/L.

2.3. Wastes

The waste from post-frying rapeseed oil originated from a fish processing company in Podlaskie Voivodship, Poland. Cod fillets were fried at 170 °C in full immersion in the oil. The oily waste was filtered and the solid particles were separated. Given that wild *Yarrowia* does not produce the enzyme invertase, the molasses obtained from the sugar refinery was hydrolyzed with 98% sulfuric acid after double dilution. As a result, the by-product consisted of 58% reducing sugars. The dried molasses had the following composition: C—348.87 g/kg, N—22.3 g/kg, S—2.16 g/kg, P—0.14 g/kg, K—45.59 g/kg, Na—7.25 g/kg, Ca—1.61 g/kg, Mg—92.50 mg/kg, Fe—80.63 mg/kg, Al—19.09 mg/kg, Mn—33.11 mg/kg, Cu—2.53 mg/kg, Zn—30.39 mg/kg, Ni—4.46 mg/kg, Pb—2.39 mg/kg, Cr—1.77 mg/kg, V—0.30 mg/kg, Sr—7.10 mg/kg, Ba—6.24 mg/kg, Ti—2.17 mg/kg, Zr—0.30 mg/kg.

2.4. Analytical Methods

Yeast biomass yield was determined by dry cell weight measured by thermogravimetric method. Cells were harvested by centrifugation (8000 rpm, 4 °C for 10 min) washed with redistilled water and dried at 105 °C to a constant weight.

The residual waste oil was extracted from 30 mL of medium by double extraction with portions of *n*-hexane. Cellular lipids were extracted from dry biomass in Soxhlet apparatus; *n*-hexane was used as a solvent. The solvent was removed by distillation under reduced pressure of 360 mbar (Buchi Rotavapor R-200 evaporator, Flawil, Switzerland).

Dried samples of yeast biomass were crushed and homogenized in a mortar. Total C, N and S contents were determined by dry combustion (Vario MacroCube, Elementar, Langenselbold, Germany). Total content of P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Al, Mn, Cu, Zn, Ni, Pb, Cr, V, Sr, Ba, Ti and Zr was measured by inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry—ICP-OES (Avio 200, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) after samples digestion in a mixture of HNO_3 and HCl (3:1 *v/v*) using the microwave digestion system (Milestone Ethos Up, Sorisole, Italy).

Reducing sugars were analyzed using a modified chemical method of Jain et al. [17] The reagent DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) reacts with reducing sugars at elevated temperatures to form a reddish-brown product, 3-amino-5-nitrosalicylic acid. 1 mL of DNS and 1 mL of medium was incubated in a boiling water bath for 5 min, cooled rapidly and 5 mL of redistilled water was added. The concentration of the color compound was determined by measuring the absorbance at 540 nm.

2.5. Fatty Acids Profile and Sterols Determination

The fatty acid composition was determined by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) as described by Wierzychowska et al. [9].

Oil samples or standards (stigmasterol, cholesterol, ergosterol) were weighed and dissolved in 2 mL of hexane. 100 μL of 5 α -cholestane (10.5 mg/25 mL chloroform) was added as an internal standard. Measured compounds were derivatized with 0.5 mL of 2M KOH in methanol for 1 h. 1 mL of upper layer was collected carefully and transferred to a glass vial. The sample was evaporated in a stream of nitrogen and 100 μL of silylating reagent (BSTFA + TMCS, 99:1) and 100 μL pyridine was added to the samples. The prepared sample was shaken and left for 24 h at room temperature in order to fulfill derivatization process.

0.2 mL of hexane was added and the trimethylsilylether sterols content was analyzed. The separation of sterol derivatives was performed with the use of GC coupled with mass spectrometer Shimadzu—QP-2010S and capillary column ZB-5 ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) stationary phase (5%—phenyl-arylene—95%—dimethylpolysiloxane). Column temperature procedure: initial 60 °C for 3 min, temperature rate 15 °C/min to 250 °C, second temperature rate 3 °C/min to 310 °C and hold for 10 min. Injector and ion source temperature were 250 °C and 240 °C, respectively. Carrier gas was helium with the flow 0.7 mL/min. Interface temperature of GC-MS was 250 °C. The ionization energy was 70 eV. The Total Ion Current (TIC) was used to detect sterols (m/z ranged 100–600). The qualitative analysis of trimethylsilylether was made on the basis of a comparison of their retention time with retention time of available standards and mass spectra as well as literature data. The internal standard 5 α -cholestane was used to quantify sterols. Results were presented in mg/g of oil. Each sample was analyzed in duplicate [18].

2.6. PDSC Analysis of Extracted Oils

Pressure differential scanning calorimetry (PDSC) study was conducted using a DSC Q20 TA Instrument (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Samples of oil (3 mg) in aluminum pans were placed in the cell under an oxygen atmosphere (50 mL/min flow rate) with an initial pressure of 1400 kPa. The empty pan was used as a reference. The measurements were carried out in isothermal conditions of 120 °C. The induction time of the samples was determined based on onset time of oxidation reaction (T_{on}) and the maximum rate of oxidation (T_{max}). Parameters are used to characterize different stages of oil oxidation process. Diagrams were registered and analyzed using TA Universal Analysis 2000 software [19,20].

2.7. Statistical Analyses

Statistical analyses of the results was performed using Statistica 13.0 set plus software (Statsoft, Cracow, Poland). Determination of sterols content was performed of repeated measurements with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test and $p \leq 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Batch and Fed-Batch *Yarrowia lipolytica* Cultures

Three experiments were carried out in media containing by-products of the agro-food industry in a laboratory bioreactor under the conditions outlined in the methodology section (Section 2.2). There was evaluated the effect of the culture mode on the growth of yeast strain *Y. lipolytica* KKP 379 and its ability to accumulate lipids. Microbial utilization of hydrophilic and hydrophobic low-cost substrates from the culture media (molasses and rapeseed oil after fish frying) was also investigated.

In M1-b and M2-fb media, molasses hydrolysate was the only source of carbon and the main source of minerals. In the case of M1-b batch culture (Figure 1a), the lag phase lasted about 10 h. High oxygen demand of yeast cells was observed throughout the culture period. When the cells entered the logarithmic growth phase, the sugar content in the medium had already been at a low level of 8.29 g/L. After 16 h of culture in molasses medium, the biomass yield was only 2.9 g_{DCW}/L, and after 24 h its value slightly increased to 3.0 g_{DCW}/L. The low content of the carbon source in the cultivation medium made biomass growth constricted. With a very low sugar content of 3.81 g/L, the biomass yield after 40 h of culture was only 3.5 g_{DCW}/L. In the final stage of culture, the yeast consumed almost the entire pool of available carbon source in the medium, reducing its content from 29 g/L to 2.7 g/L. The pH of the medium remained relatively constant at 5.5 until about 40 h, after which time it began to decrease slightly to 2.89 after 62 h.

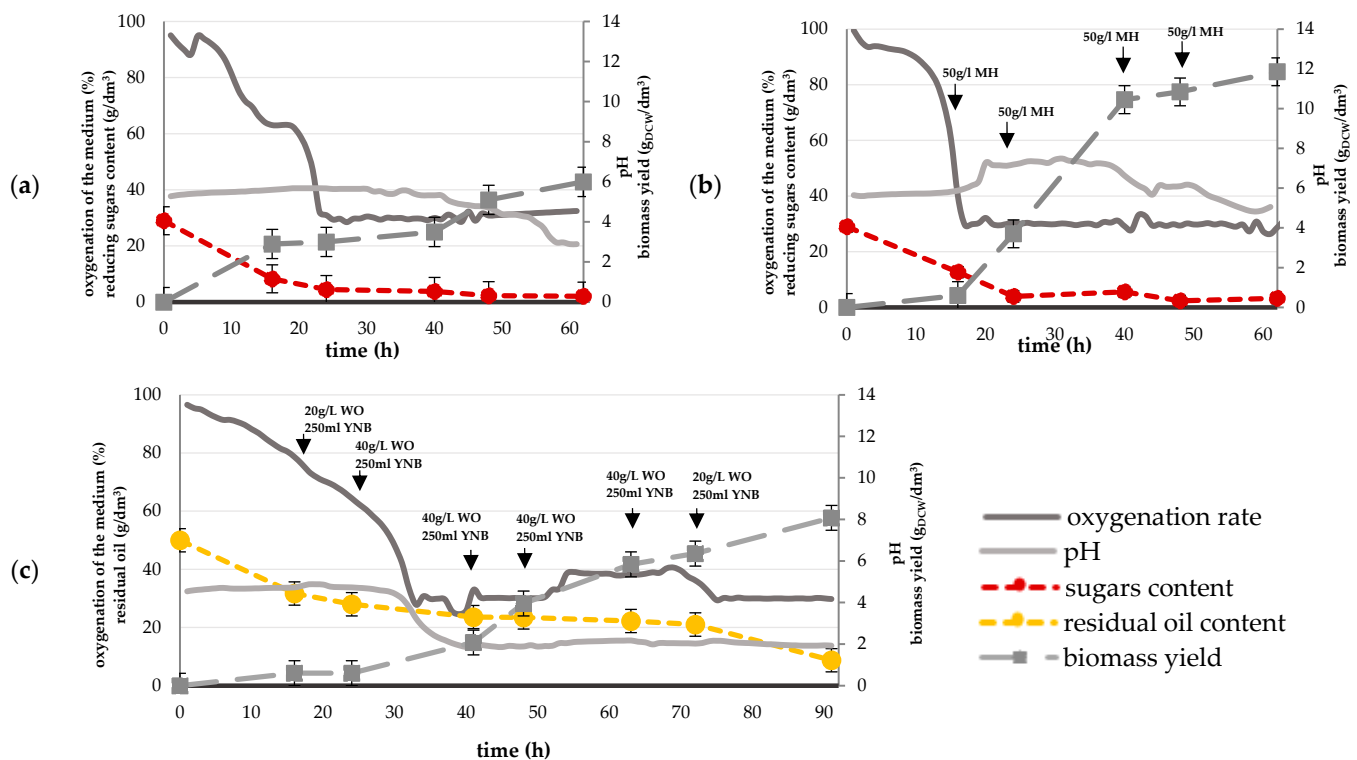


Figure 1. Changes in the oxygenation of the medium, pH, biomass yield of *Y. lipolytica* KKP 379 and content of reducing sugars in medium (a) M1-b and (b) M2-fb with hydrolyzed molasses hydrolysate (MH) as a hydrophilic carbon source and content of residual oil in (c) O1-fb medium with post-frying rapeseed oil (WO) as hydrophobic carbon source and supplemented with YNB medium.

In M2-fb yeast culture (Figure 1b), the medium was supplemented with molasses hydrolysate after 16, 24, 40 and 48 h. It is worth noting that feeding the culture at the beginning of the logarithmic phase of growth promoted biomass growth. Admittedly, the adaptation phase was longer than in M1-b medium and the biomass yield after 16 h of culture was several times lower than at the same point in M1-b culture. After 48 h the biomass yield was 10.84 g_{DCW}/L, compared to 5.10 g_{DCW}/L in the no-feeding mode. Finally, supplying hydrolysate to the culture medium as a source of essential components for the cells resulted in a biomass yield of 11.85 g_{DCW}/L. Taking into account that wild yeast *Y. lipolytica* is unable to break down sucrose, which is the main sugar of molasses, the cheap substrate was treated with acid to hydrolyze the disaccharide. Thus, the hydrolysate of molasses required neutralization before being added to the culture. Therefore, supplementing the medium with ingredients necessary for growth caused periodic fluctuations in the pH. As a result of the 62-h yeast culture, the content of simple sugars in the M2-fb medium decreased to 3.28 g/L. The initial content of hydrolyzed molasses was 50 g/L, which corresponded to 29 g/L of simple sugars. Taking into account the sum of molasses portions with which the M2-fb medium was supplemented during the culture, the yeast utilized a total of 141.72 g/L of simple sugars from the waste medium.

The subsequent O1-fb culture was conducted in mineral medium with 5% post-frying rapeseed oil as a hydrophobic source of carbon for *Yarrowia* cells (Figure 1c). In contrast to cultures conducted in molasses media, the culture was carried out for 90 h. Twice a day, 250 mL of medium was withdrawn from the bioreactor, and then the culture was supplemented with the defined amount of oily waste, as well as 250 mL of sterile concentrated YNB medium. The adaptation phase lasted nearly 24 h. After 16 h of culture, the level of waste oil in the culture medium decreased to 31.7 g/L, while the biomass yield was 0.6 g_{DCW}/L. In an effort to provide the cells with the needed energy source, an addition of 20 g/L of post-frying rapeseed oil was used. Nonetheless, over the next 8 h, the yeast

utilized a significant portion of the lipid carbon source, leaving an unused waste of 28 g/L, with an unchanged biomass yield. After 24 h, the medium was enriched with an increased dose (40 g/L) of waste oil. At 40 h of culture, the residual oil content in the substrate was 23.6 g/L, with a biomass yield of 2.08 g_{DCW}/L, which increased to 3.96 g_{DCW}/L by the end of the second day. After 62 h, the biomass yield was 5.84 g_{DCW}/L. It is worth mentioning that this value was similar to the level of biomass growth in M1-b batch culture with molasses, in which no additional substrate supplementation was used, after 62 h the yield was 6.0 g_{DCW}/L. On the third day of culture, the M1-fb medium was enriched with a dose of post-frying oil at 40 g/L, and part of the medium was replaced. The applied culture conditions and substrate composition caused the biomass yield of *Y. lipolytica* yeast by fed-batch culture with post-frying rapeseed oil to reach 8.08 g_{DCW}/L after 90 h. It is emphasized that, despite periodic dosing of the carbon source into the medium, the yeast effectively utilized a significant amount of waste oil. At the end of the culture, 8.76 g/L of industrial waste remained in the medium, with an initial amount of 50 g/L. During the process, a total of 250 g/L of waste post-frying oil was added to the O1-fb culture.

3.2. Effect of the Culture Mode on Lipid Accumulation

The experiment also compared the efficiency of microbial lipid biosynthesis in cells of *Y. lipolytica* strain KKP 379 in batch and fed-batch media containing molasses hydrolysate and fed batch culture with post-frying rapeseed oil. Figure 2. shows changes in the lipid content of yeast cells over time. For each culture variant, the efficiency of the accumulation process reached a value of more than 30% per gram of dry biomass. Interestingly, the dynamics of microbial lipid biosynthesis for each culture varied. In the case of media in which molasses hydrolysate M1-b and M2-fb were used, the yield was highest on the first and second days of culture. For the culture in medium O1-fb with lipid carbon source on the third day of culture the maximum accumulation yield was observed. After 16 h of biomass culture in M1-b medium, the content of cellular lipids was 21% of dry cell weight, and after 24 h it was already 35%. At the same time (16 h) in M2-fb medium, the efficiency of lipid accumulation was only 8% and did not increase over the next eight hours. Probably, the medium turned out to be deficient in carbon atoms and other necessary components to cover the demand of cells in a culture environment. This type of limitation forced cells cultured in M1-b medium to accumulate lipids as an energy reservoir. In M2-fb medium, the addition of molasses hydrolysate promoted biomass growth (Figure 1b). After 48 h of cultivation, the SCO content of the cells reached a maximum (37%). A gradual decrease in the cellular lipid content of biomass was observed from 24 h of culture in M1-b medium. After 40 h, the SCO accumulation efficiency was at 26%, and after 48 h, only 10%. The observed decrease can be explained by the mobilization of cellular energy reserves in the form of lipids, due to the lack of availability of the necessary components in the substrate. In the end, after 62 h, only 2% fat per dry weight remained inside the cells. In the case of yeast culture in M2-fb medium, a decrease in cellular lipid content to 5% after reaching the maximum efficiency of the SCO accumulation process has been noted. The composition of the medium did not meet the increased biomass energy demand, which also resulted in the exploitation of cellular resources. A different mechanism was observed in O1-fb medium. At the 40th hour for this culture variant, the SCO content of the biomass was the highest at 31.73% and remained relatively high until 90 h, reaching the efficiency maximum at 63 h (37.50%).

The synthesis of microbial oil proceeded intensely during the first days in cultures with molasses as opposed to yeast culture in medium with post-frying rapeseed oil, where the accumulation took place in the stationary growth phase. One of the most important parameters describing the kinetics of SCOs accumulation is concentration of lipid coefficient (L) (Table 1). The highest value of this parameter was observed in 48 h of fed-batch culture with molasses (M2-fb), when L amounted to 4.01 g/L. Lipids concentration in M1-b medium without supplementation was lower, the L_{max} 1.05 g/L was reached in 24 h. The value accounted for approximately 25% of the parameter calculated for the M2-fb medium. In

the case of the O1-fb culture, the maximum amount of microbial oil that could be extracted from the medium was noted at the end of culture, L parameter reached 2.48 g/L.

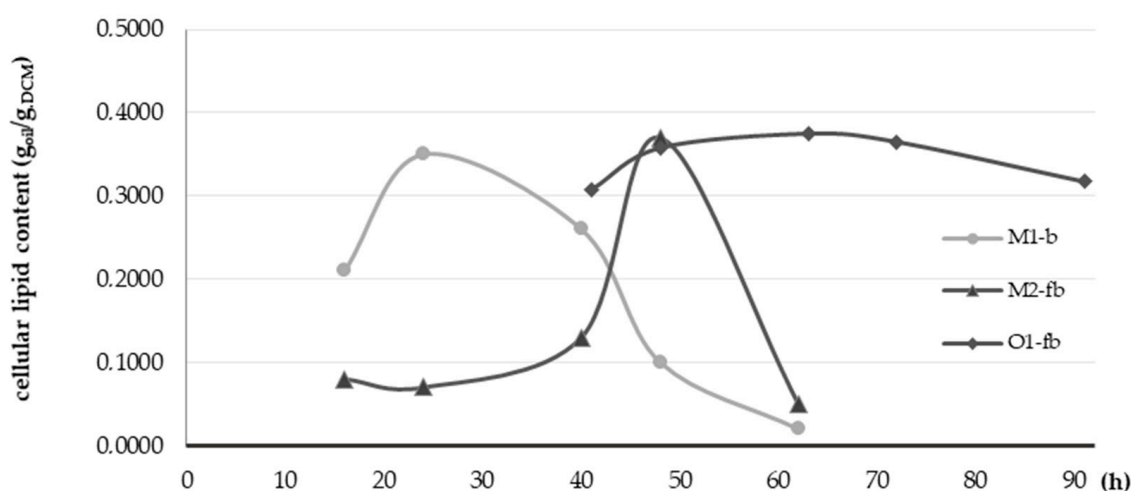


Figure 2. Cellular lipid content of *Y. lipolytica* KKP 379 during batch culture in medium M1-b and fed-batch cultures in medium O1-fb and M2-fb.

Table 1. Parameters of *Y. lipolytica* KKP 379 yeasts strain culture in media M1-b, M2-fb and O1-fb.

Parameter	Unit	M1-b	M2-fb	O1-fb
Initial concentration of carbon source	g/L	50	50	50
Time (t)	h	62	62	91
Biomass yield (X)	gDCW/L	6.00	11.82	8.08
Conversion biomass yield per carbon substrate ($Y_{X/S}$)	gDCW/g	0.1200	0.2364	0.1616
Concentration of lipids produced (L)	16 h	0.6090	0.0480	-
	24 h	1.0500	0.2590	-
	40 h	0.9100	1.3585	0.6600
	48 h	0.5100	4.0108	1.4454
	62 h	0.1200	0.5925	2.1900
	72 h	-	-	2.2762
	90 h	-	-	2.4846

3.3. Fatty Acids Composition of Cellular Lipids from *Y. lipolytica* Cultures

To compare the fatty acid composition of cellular lipids obtained by de novo accumulation in molasses media and by the ex novo pathway in culture with post-frying waste, oil samples from M1-b, M2-fb and O1-fb (Table 2) cultures were analyzed. For both microbial oils accumulated in biomass cultured in molasses media and in cultures with post-frying oil, the fatty acid with the dominant proportion was oleic acid (C18:1). After 62 h, in oil samples from M1-b culture, the C18:1 content was 52.66%, in M2-fb—44.43%, and in O1-fb—61.82%. Linoleic acid (C18:2) was another fatty acid with a significant proportion. The highest percentage of C18:2 was observed in SCO from the M2-fb culture (30.75%). In the oil sample from the M1-b culture as well as the M2-fb medium, linolenic acid (18:3) from the omega-3 fatty acids was present, 7.68% and 6.48%, respectively. Saturated fatty acids such as palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) were also determined in each of the oil samples.

Table 2. The fatty acids profile (%) of microbial lipids extracted from biomass cultured in M1-b, M2-fb and O1-fb media.

Culture Variant	Time	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0
M1-b	62 h	11.67	5.51	52.66	22.49	7.68	n.d.	n.d.
M2-fb	62 h	13.69	4.65	44.43	30.75	6.48	n.d.	n.d.
O1-fb	40 h	3.01	9.25	60.36	18.23	4.20	4.09	1.06
	48 h	4.09	11.08	58.43	18.88	2.94	3.75	0.92
	62 h	4.21	10.86	61.81	16.41	1.76	4.15	1.05
	72 h	5.20	10.13	63.17	15.26	2.23	3.61	0.68
	90 h	4.09	8.49	66.94	14.41	0.72	4.93	0.51

n.d.—not detected.

For microbial oil extracted from biomass cultured in O1-fb medium changes in fatty acid composition were observed after 40, 48, 62, 72 and 90 h. The cellular oil extracted from the biomass after 90 h of culture containing the most C18:1 acid (66.94%) was at the same time characterized by the lowest proportion of C18:2 acid from the omega-6 group (14.41%). Considering the change in the content of C18:2 in the total fatty acids profile of microbial oils from successive O1-fb culture stages, its percentage decreased with the time of cultivation. The highest amount of C18:2 was noted on the second day of the culture stage (18.88%).

Oil samples from O1-fb cultures were characterized by a small proportion of C18:3 acid. Its content after 40 h was 4.20%. In the following hours its content decreased, and at the end of the culture it was only 0.72% of all fatty acids. Microbial oils from O1-fb culture were more differentiated in fatty acid composition. In contrast to cellular lipid samples from strain cultures in molasses media, arachidonic acid (C20:0) and behenic acid (C22:0) was detected in SCOs from O1-fb cultures.

3.4. Effect of the Culture Mode on the Sterol Content and the Elemental Composition of the Biomass

The content of sterols in microbial oils extracted from biomass cultured in molasses media and in medium with post-frying rapeseed oil has been also described. The content of cholesterol, dehydroergosterol, ergosterol, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol determined in analyzed oils samples has been shown in Table 3. The lowest total sterol content 3.25 mg/g_{oil} was noted for microbial lipids from O1-fb culture, in which yeast biomass was fed with rapeseed oil after frying. In SCO derived from medium with post-frying oil, β -sitosterol proved to be the dominant sterol at 44.29%, followed by campesterol (25.22%), ergosterol (13.86%) and dehydroergosterol (12.67%). Stigmasterol accounted for 2.96% of the total sterols content and cholesterol 1.02%.

In SCO sample from M1-b culture of *Yarrowia* yeast in molasses medium, the total sterol content was 8.34 mg/g_{oil}, while in M2-fb culture sterol content amounted to 68.40 mg/g_{oil}. After 62 h in both variants of molasses culture M1-b and M2-fb, the sterol with the highest proportion was ergosterol, with a content of 57.95% and 87.94% respectively. In the culture M2-fb with molasses hydrolysate, the ergosterol content was 60.16 mg per gram of lipids extracted from biomass. In the M1-b medium without feeding mode, the ergosterol content at the end of the culture was 5.00 mg/g of oil. The another sterol with a significant percentage was β -sitosterol (18.25%) and campesterol (10.24%). Dehydroergosterol, cholesterol and stigmasterol were determined in smaller amounts (Table 3).

Table 3. Content of the major sterols in microbial oil samples extracted from cultures of *Y. lipolytica* KKP 379 biomass in medium M1-b, M2-fb and O1-fb.

Oil Samples	M1-b		M2-fb		O1-fb	
	%	mg/g _{oil}	%	mg/g _{oil}	%	mg/g _{oil}
Cholesterol	5.34 ± 0.50	0.45 ± 0.13 ^b	0.32 ± 0.05	0.22 ± 0.04 ^a	1.02 ± 0.26	0.04 ± 0.02 ^a
Dehydroergosterol	6.51 ± 0.31	0.54 ± 0.08 ^a	1.85 ± 0.24	1.26 ± 0.11 ^b	12.67 ± 1.28	0.42 ± 0.23 ^a
Ergosterol	57.95 ± 2.58	5.00 ± 1.33 ^a	87.94 ± 0.91	60.16 ± 3.33 ^b	13.86 ± 1.74	0.40 ± 0.00 ^c
Campesterol	10.24 ± 0.91	0.90 ± 0.10 ^a	2.15 ± 0.17	1.47 ± 0.05 ^b	25.22 ± 3.22	0.84 ± 0.49 ^a
Stigmasterol	2.67 ± 0.53	0.22 ± 0.01 ^a	2.90 ± 0.38	1.98 ± 0.17 ^b	2.96 ± 0.57	0.12 ± 0.09 ^a
β-sitosterol	18.25 ± 3.81	1.50 ± 0.02 ^a	4.86 ± 0.16	3.32 ± 0.04 ^b	44.29 ± 0.38	1.44 ± 0.69 ^a
Σ	100	8.34 ± 1.66	100	68.40 ± 3.75	100	3.25 ± 1.55

Lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

The elemental composition of *Y. lipolytica* yeast biomass cultured in waste media was dominated by carbon, nitrogen, potassium, sodium, phosphorus and sulfur (Table 4). Yeast biomass fed with a lipid carbon source in the form of post-frying rapeseed oil was characterized by a higher content of carbon (601.12 g/kg), iron (0.59 g/kg) and aluminum (55.47 mg/kg) compared to cultures in molasses media. In contrast, biomass from M1-b and M2-fb cultures was richer in minerals such as nitrogen, sodium, sulfur, potassium, manganese, copper, zinc, cobalt and strontium. All biomass samples contained similar amounts of phosphorus (9.84–11.96 g/kg), magnesium (0.65–0.84 g/kg), lead (0.90–1.13 mg/kg) and barium (0.54–0.77 mg/kg). Cells fed with molasses hydrolysate obtained from M2-fb medium were richer than biomass from M1-b batch culture in potassium (47.54 g/kg), phosphorus (11.96 g/kg), calcium (2.13 g/kg), manganese (197.35 mg/kg), zinc (209.80 mg/kg) and strontium (6.45 mg/kg). On the other hand, biomass samples from the M1-b culture compared to the M2-fb culture contained more carbon (447.87 g/kg), nitrogen (65.56 g/kg), sulfur (13.61 g/kg), iron (0.46 g/kg), aluminum (19.25 mg/kg), chromium (10.71 mg/kg), nickel (15.08 mg/kg) and zirconium (10.71 mg/kg).

Table 4. Elemental composition of dry biomass of *Y. lipolytica* KKP 379 from M1-b, M2-fb and O1-fb media.

Biomass Samples	C g/kg	N g/kg	K g/kg	Na g/kg	P g/kg	S g/kg	Ca g/kg	Mg g/kg	Fe g/kg	Al mg/kg	Ti mg/kg	
M1-b	447.87	65.56	25.63	18.47	9.84	13.61	0.87	0.69	0.46	19.25	3.41	
M2-fb	376.26	43.21	47.54	16.89	11.96	8.76	2.13	0.65	0.20	7.98	1.09	
O1-fb	601.12	20.78	16.48	0.46	10.05	2.04	0.08	0.84	0.59	55.47	2.03	
	Mn mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Cr mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg	V mg/kg	Zr mg/kg	Co mg/kg	Sr mg/kg	Ba mg/kg	Li mg/kg
M1-b	136.05	6.90	168.64	10.71	15.08	1.13	0.62	3.94	2.43	2.77	0.54	0.18
M2-fb	197.35	5.77	209.80	3.12	2.54	0.90	0.53	1.27	2.23	6.45	0.77	0.29
O1-fb	50.79	0.79	93.34	2.29	1.08	1.20	0.14	1.30	0.01	0.40	0.66	0.01

3.5. PDSC of Cellular Oil Samples

In this experiment, PDSC measurements were conducted at a temperature of 120 °C at isothermal conditions. The PDSC curves for cellular lipids from M1-b, M2-fb and O1-fb are presented in Figure 3. It can be noted that the oxidation reaction time values for the extracted oil samples are different. At 120 °C, cellular oil from fed-batch culture with molasses (M2-fb) had the shortest T_{on} and T_{max} lasting 2.58 min and 10.04 min, followed by oil from batch culture with molasses (M1-b) with results of about 8.41 min and 16.32 min, respectively. The highest value of T_{on} and T_{max} parameters are observed in the oil sample from the culture fed with post-frying rapeseed oil (O1-fb), which are 14.03 and 26.23 min.

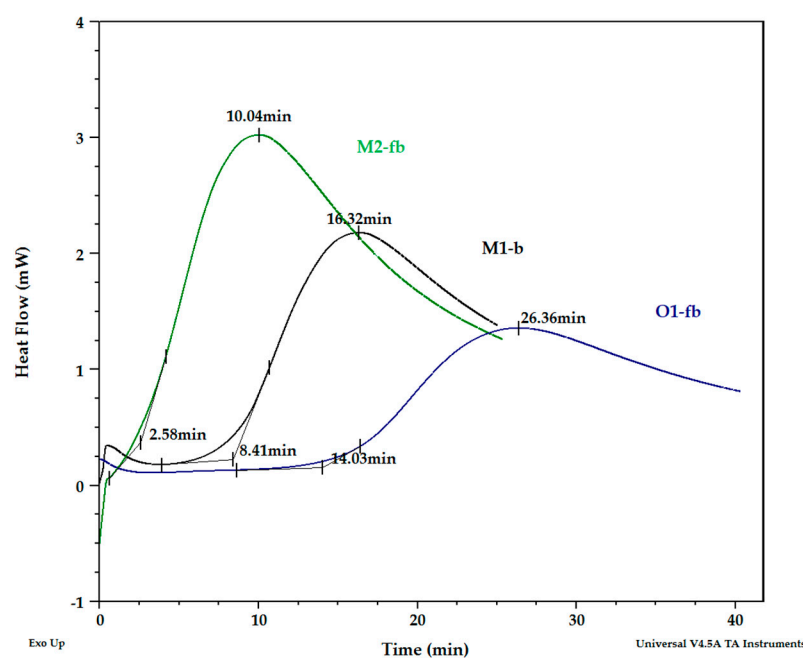


Figure 3. PDSC curves showing oxidation induction times T_{on} and T_{max} of cellular lipid samples from M1-b, M2-fb and O1-fb cultures.

4. Discussion

In the current experiment, among the factors differentiating the culture variants was type of waste substrate, as well as the culture mode. It is worth to note the difference in the supplementation method of the two fed-batch cultures. In the M2-fb culture variant, molasses was the only supplemented medium component. In the culture with post-frying rapeseed oil, in addition to supplementing the hydrophobic carbon source, the mineral medium was enriched with YNB medium, which was primarily a source of nitrogen in the form of ammonium sulfate and amino acids.

4.1. Effect of Culture Mode on Lipid Accumulation in Fed-Batch Culture with Post-Frying Rapeseed Oil

In a study by Wierzchowska et al. [9], *Y. lipolytica* KKP 379 yeast cells were cultured in a mineral medium containing 3.0 g/L KH_2PO_4 , 1.1 g/L Na_2HPO_4 and 8g/L $(NH_4)_2SO_4$. The assumed composition of the medium corresponded to the base of the O1-fb culture medium in the current experiment. Comparing the results of the two studies, a higher biomass yield was obtained in the culture where the medium was not supplemented with a carbon source and enriched with minerals and amino acids—11.10 g_{DCW}/L after 88 h. Meanwhile, the M2-fb culture lasting 90 h resulted in a biomass yield of 8.08 g_{DCW}/L. However, a higher final microbial lipid accumulation efficiency of 30.75% was observed for the M2-fb culture, while the 88-h batch culture resulted in a biomass lipid content of 20.9%. Providing cells with access to a carbon source in the form of post-frying rapeseed oil in the medium promoted lipid accumulation during the stationary phase of biomass growth. These observations support the theory already described in the literature that post-frying wastes are a good feedstock for promoting SCO accumulation [4,5,12]. Cyclically taking away a certain volume of medium and replacing it with a portion of YNB concentrate also had a beneficial effect on maintaining a reservoir of spare lipids in the biomass. Taking into account the L parameter, for both cultures the authors obtained the same result of 2.48 g of oil per liter of medium [9]. This shows that for practical and economic reasons of obtaining microbial oil, batch cultures without feeding can be more cost-effective solution to reduce interference in the culture process making it more laborsaving. Nevertheless, fed-batch cultures using lipid waste as carbon sources allow the use of significantly larger amounts of substrates difficult to store and dispose of [9].

4.2. Comparison of Batch and Fed-Batch Cultures in Molasses Media

The addition of five times the dose of the molasses hydrolysate in portions in the M2-fb culture compared to the M1-b culture resulted in twice the biomass yield—11.82 g_{DCW}/L after 62 h. In a study by Imatoukene et al. [21], batch culture of *Y. lipolytica* yeast JMY5578 in YNB medium without amino acids and ammonium sulfate with molasses and ammonium chloride lasting 72 h, resulted in a biomass yield of 14.2 g_{DCW}/L. To be mentioned, the C/N molar ratio of the molasses hydrolysate used in the current study was 18.3, while in the cited research the C/N value for the culture medium was 35. There is an assumption that, hydrolysate may have contained insufficient amounts of sugars available to the cells. The biomass yield from the M1-b batch culture was more than half the result of the batch culture in the study by Imatoukene et al. [21]. In comparison, the value of biomass yield after 62 h of the M2-fb culture was similar to the batch culture of the JMY5578 strain. What's important, the auxotrophic JMY5578 strain was unable to degrade fatty acids and remobilize triacylglycerols from cellular reserves. Despite this, the content of lipids accumulated in the cells was finally at 6.7% (L = 0.95 g/L). After 62 h of batch and fed-batch culture with molasses hydrolysate, cellular lipid content was negligible. Despite the unsatisfactory final result, wild yeast strain KKP 379 generally accumulated higher amounts of intracellular lipids reaching maximum yields for M1-b and M2-fb after 24 and 48 h in both cases above more than 35%. After this time, due to the depletion of the necessary carbon source in the M1-b culture, there was a significant decrease in cellular lipid content. Nevertheless, the decrease in this case may have been due to the osmotic pressure of the molasses solution and the inadequate C/N ratio of the hydrolysate. Moreover, the M2-fb culture feeding strategy contributed to a gradual decrease in the C/N ratio as a result of medium supplementation with molasses hydrolysate as a source of nitrogen and a shift in the stage of cellular lipid accumulation as a consequence, compared to M1-b. According to the literature, in order to effectively stimulate lipid accumulation in the cells of oleaginous microorganisms, the C/N molar ratio should be above 20. Higher C/N molar ratios, as a consequence of nitrogen limitation, favor the accumulation of SCOs [9,22]. It should be noted that, cell physiology in waste substrates can be disrupted due to reactions with their various components. An example is furfural, which is formed by acidic and thermal treatment of sugars, considered as one of the inhibitors of growth and the process of cellular lipid biosynthesis [23].

4.3. Effect of Culture Conditions on Microbial Sterols Content

The role of preparing hydrolysate of molasses to make it more digestible for yeast cells through the process of acid hydrolysis and following neutralization should be emphasized. The pretreatment process contributed to the high extracellular salt concentrations. Hence, the high osmotic pressure of the culture medium was a stress factor for the yeast. This may explain why, in the current experiment, the highest sterol content, especially high ergosterol content, was observed in yeast cells from molasses-fed culture. The yeast biomass from the fed-batch culture in molasses medium (M2-fb) contained significantly more dehydroergosterol, ergosterol, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol compared to the other cultures conducted in the experiment. Ergosterol is an essential yeast metabolite responsible for adapting cell membranes by altering their fluidity and permeability. This fungal component not only promotes membrane lipids resistance to peroxidation, but most importantly increases the resistance of cell membranes to osmotic stress when cells are environmentally exposed [24,25]. The regulation of membrane sterols is significant in many cellular processes. As demonstrated by Walker et al. [26], the tolerance of *Y. lipolytica* yeast to high concentrations of ionic liquids used as green solvents was associated with the maintenance of cell membrane homeostasis and impaired migration of cations which was possible through the regulation of cellular sterol biosynthesis including ergosterol. The survival rate of *Saccharomyces cerevisiae* mutants incapable of ergosterol synthesis was significantly reduced under osmotic shock conditions [27].

4.4. Analysis of Fatty Acid Composition and Oxidative Stability

It is well known that microbial oils extracted from the oleaginous yeast *Y. lipolytica* are rich in oleic and linoleic acid, which has also been confirmed by conducted studies. The composition of all extracted lipids was dominated by these two acids, as mentioned. Differences in fatty acid composition between biomass oil samples obtained from cultures in molasses hydrolysate media and post-frying rapeseed oil media were noticeable as well. In lipid samples from cultures with molasses hydrolysate, no C20:0 and C22:0 acid content was recorded in opposition to C16:0 and C18:1, whose percentages were increased relative to the other samples. In general, microbial oils from molasses-based media were less diverse in composition than samples from cultures with waste rapeseed oil. When Gajdoš et al. [28] cultured three mutant strains of *Y. lipolytica* overexpressing *DGA2* in medium with 8% (*w/w*) molasses, palmitic acid accounted for 14.0–19.6% of all fatty acids after 3 days of culture. The dominant was oleic acid 53.9–55.7%, but linoleic acid content was significantly lower than in the current experiment with wild strain, ranging from 3.9–9.4%. Very similar results were obtained by the cited authors for cultures in sucrose medium.

Oils with a high content of unsaturated fatty acids, which include the cellular oils of oleaginous yeast, are particularly easily oxidized. Oxidative stability is one of the most important parameters regarding the asses of oil quality. Oxidation of fatty acids under the influence of heat treatment, extraction conditions or during storage causes quality deterioration [29]. The extracted oil samples were less stable compared to conventional rapeseed oil or olive oil for which $T_{\max}$ measured at 120 °C ranged from 66.61–74.78 min and 134.15–180.07 min, respectively [30,31]. While in our study, $T_{\max}$ parameter ranged from 10.04–26.36 min for the analyzed samples. On the other hand, similar oxidative stability was observed for measurements on linseed oil and sunflower oil. The maximum time of oxidative reaction for sunflower oil at 120 °C was 33.4 min [20]. For linseed oil, especially rich in linolenic acid, oleic acid and linoleic acid, the maximum time of induction was 21.20–24.72 min [32], making it the closest to the values obtained in the current experiment.

4.5. Elemental Composition of *Y. lipolytica* Dry Biomass from Waste Media

Through elemental composition analysis, it was possible to found that biomass from media containing molasses hydrolysate was more abundant in minerals such as nitrogen, sodium, sulfur, potassium, manganese, copper, zinc, cobalt and strontium. In contrast, yeast biomass from cultures with post-frying rapeseed oil contained more carbon, iron and aluminum. Generally speaking, all biomass samples were abound in phosphorus (9840–11,960 mg/kg), magnesium (650–840 mg/kg), calcium (80–2130 mg/kg), zinc (93.34–168.64 mg/kg) iron (500.40–594.18 mg/kg), copper (0.01–2.43 mg/kg), manganese (50.79–197.35 mg/kg) than commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where the content of the mentioned elements was as follows: P—7270 mg/kg, Mg—795 mg/kg, Ca—121 mg/kg, Zn—55.0 mg/kg, Fe—35.4 mg/kg, Cu—14.3 mg/kg, Mn—4.9 mg/kg [33].

5. Conclusions

The results of the present study showed that the cellular lipid accumulation efficiency of *Y. lipolytica* yeast and the content of sterols in the cell membrane can be manipulated by selecting waste substrates and culture mode. Due to the unique ability of the species to degrade and utilize a wide range of complex substrates, choosing a mode of yeast culture with feeding may allow for the disposal of larger amounts of waste. However, it is probably impossible to completely exclude the possibility that biomass growth may be disrupted by certain components acting as inhibitors. On the other hand, the complex nature of the waste may affect the modification of the composition of cell membranes, and, thus, the accumulation of components of interest to researchers, such as ergosterol. The authors showed that the fed-batch mode of culture with molasses hydrolysate allowed to obtain higher amounts of microbial oil from the medium by favoring biomass growth. On the other hand, in culture with a post-frying oil, feeding the biomass with both the carbon source and fresh medium promoted maintaining the lipid content of the cells at a high

level for a long time, further leveling the negative impact of harmful metabolites in the medium. Thus, based on the observation of the process of microbial lipid biosynthesis over time, it can be concluded that the choice of culture mode determines the time to achieve maximum accumulation efficiency and the success of the culture process directed at obtaining oil-rich biomass.

Author Contributions: Conceptualization, K.W.; Methodology, K.W., A.F., D.D., D.N., I.P. and B.Z.; Formal analysis, K.W. and A.F.; Investigation, K.W., A.P., D.D., A.F., D.N. and B.Z.; Resources, A.F. and D.N.; Data Curation, K.W.; Writing—Original Draft Preparation, K.W.; Writing—Review & Editing, A.F. and B.Z.; Visualization, K.W.; Supervision, D.N. and A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was financially supported by sources of the Ministry of Education and Science within funds of the Institute of Food Sciences of Warsaw University of Life Sciences (WULS), for scientific research.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rashid, M.I.; Shahzad, K. Food waste recycling for compost production and its economic and environmental assessment as circular economy indicators of solid waste management. *J. Clean. Prod.* **2021**, *317*, 128467. [\[CrossRef\]](#)
2. FAO. Moving Forward on Food Loss and Waste Reduction. In *The State of Food and Agriculture 2019*; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2019.
3. Gottardi, D.; Siroli, L.; Vannini, L.; Patrignani, F.; Lanciotti, R. Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *115*, 74–86. [\[CrossRef\]](#)
4. Fabiszewska, A.; Wierzchowska, K.; Nowak, D.; Wołoszynowska, M.; Zieniuk, B. Brine and Post-Frying Oil Management in the Fish Processing Industry—A Concept Based on Oleaginous Yeast Culture. *Processes* **2022**, *10*, 294. [\[CrossRef\]](#)
5. Wierzchowska, K.; Zieniuk, B.; Fabiszewska, A. Use of Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* in Treatment or Upgradation of Hydrophobic Industry Wastes. *Waste Biomass- Valorization* **2021**, *13*, 757–779. [\[CrossRef\]](#)
6. Liu, N.; Soong, Y.V.; Mirzaee, I.; Olsen, A.; Yu, P.; Wong, H.; Xie, D. Biomanufacturing of value-added products from oils or fats: A case study on cellular and fermentation engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* **2021**, *118*, 1658–1673. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Wang, Z.-P.; Wang, Q.-Q.; Liu, S.; Liu, X.-F.; Yu, X.-J.; Jiang, Y.-L. Efficient Conversion of Cane Molasses Towards High-Purity Isomaltulose and Cellular Lipid Using an Engineered *Yarrowia lipolytica* Strain in Fed-Batch Fermentation. *Molecules* **2019**, *24*, 1228. [\[CrossRef\]](#)
8. Bao, W.; Li, Z.; Wang, X.; Gao, R.; Zhou, X.; Cheng, S.; Men, Y.; Zheng, L. Approaches to improve the lipid synthesis of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2021**, *149*, 111386. [\[CrossRef\]](#)
9. Wierzchowska, K.; Zieniuk, B.; Nowak, D.; Fabiszewska, A. Phosphorus and Nitrogen Limitation as a Part of the Strategy to Stimulate Microbial Lipid Biosynthesis. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 11819. [\[CrossRef\]](#)
10. Chauhan, M.K.; Varun, S.C.; Kumar, S.; Samar. Life cycle assessment of sugar industry: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, *15*, 3445–3453. [\[CrossRef\]](#)
11. Zhang, S.; Wang, J.; Jiang, H. Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. *Food Chem.* **2020**, *346*, 128860. [\[CrossRef\]](#)
12. Lopes, M.; Miranda, S.; Belo, I. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production—A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *50*, 2583–2616. [\[CrossRef\]](#)
13. Gao, Z.; Ma, Y.; Liu, Y.; Wang, Q. Waste cooking oil used as carbon source for microbial lipid production: Promoter or inhibitor. *Environ. Res.* **2021**, *203*, 111881. [\[CrossRef\]](#)
14. Rattray, J.B.M. Yeasts. In *Microbial Lipids*; Ratledge, C., Wilkinson, S.G., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1988; Volume 1, p. 555.
15. Ghazani, S.M.; Marangoni, A.G. Microbial lipids for foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *119*, 593–607. [\[CrossRef\]](#)
16. Fabiszewska, A.; Misiukiewicz-Stępień, P.; Paplińska-Goryca, M.; Zieniuk, B.; Białecka-Florjańczyk, E. An Insight into Storage Lipid Synthesis by *Yarrowia lipolytica* Yeast Relating to Lipid and Sugar Substrates Metabolism. *Biomolecules* **2019**, *9*, 685. [\[CrossRef\]](#)
17. Jain, A.; Jain, R.; Jain, S. Quantitative Analysis of Reducing Sugars by 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method). In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*; Humana: New York, NY, USA, 2020; pp. 181–183. [\[CrossRef\]](#)

18. Derewiaka, D.; Stepnowska, N.; Bryś, J.; Ziarno, M.; Ciecierska, M.; Kowalska, J. Chia seed oil as an additive to yogurt. *Grasas Y Aceites* **2019**, *70*, 302. [[CrossRef](#)]
19. Piasecka, I.; Górka, A.; Ostrowska-Ligeza, E.; Kalisz, S. The Study of Thermal Properties of Blackberry, Chokeberry and Raspberry Seeds and Oils. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 7704. [[CrossRef](#)]
20. Kowalski, B.; Ratusz, K.; Kowalska, D.; Bekas, W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat measurements. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 165–169. [[CrossRef](#)]
21. Imatoukene, N.; Back, A.; Nonus, M.; Thomasset, B.; Rossignol, T.; Nicaud, J.-M. Fermentation process for producing CFAs using *Yarrowia lipolytica*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *47*, 403–412. [[CrossRef](#)]
22. Carsamba, E.; Papanikolaou, S.; Erten, H. Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38*, 1230–1243. [[CrossRef](#)]
23. Drzymała, K.; Mironczuk, A.; Pietrzak, W.; Dobrowolski, A. Rye and Oat Agricultural Wastes as Substrate Candidates for Biomass Production of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Sustainability* **2020**, *12*, 7704. [[CrossRef](#)]
24. Jordá, T.; Puig, S. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* **2020**, *11*, 795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dupont, S.; Lemetais, G.; Ferreira, T.; Cayot, P.; Gervais, P.; Beney, L. Ergosterol biosynthesis: A fungal pathway for life on land? *Evolution* **2012**, *66*, 2961–2968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Walker, C.; Ryu, S.; Trinh, C.T. Exceptional Solvent Tolerance in *Yarrowia lipolytica* Is Enhanced by Sterols. *bioRxiv* **2018**, *54*, 83–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kodedová, M.; Sychrová, H. Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gajdoš, P.; Nicaud, J.-M.; Rossignol, T.; Čertík, M. Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 8065–8074. [[CrossRef](#)]
29. Symoniuk, E.; Ratusz, K.; Ostrowska-Ligeza, E.; Krygier, K. Impact of Selected Chemical Characteristics of Cold-Pressed Oils on their Oxidative Stability Determined Using the Rancimat and Pressure Differential Scanning Calorimetry Method. *Food Anal. Methods* **2017**, *11*, 1095–1104. [[CrossRef](#)]
30. Symoniuk, E.; Ratusz, K.; Krygier, K. Comparison of the oxidative stability of cold-pressed rapeseed oil using Pressure Differential Scanning Calorimetry and Rancimat methods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *119*, 1600182. [[CrossRef](#)]
31. Cierniewska-Żytikiewicz, H.; Ratusz, K.; Bryś, J.; Reder, M.; Koczoń, P. Determination of the oxidative stability of hazelnut oils by PDSC and Rancimat methods. *J. Therm. Anal.* **2014**, *118*, 875–881. [[CrossRef](#)]
32. Symoniuk, E.; Ratusz, K.; Krygier, K. Comparison of the oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil by pressure differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3986–3995. [[CrossRef](#)]
33. Groombridge, A.S.; Miyashita, S.-I.; Fujii, S.-I.; Nagasawa, K.; Okahashi, T.; Ohata, M.; Umemura, T.; Takatsu, A.; Inagaki, K.; Chiba, K. High Sensitive Elemental Analysis of Single Yeast Cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by Time-Resolved Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry Using a High Efficiency Cell Introduction System. *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 597–603. [[CrossRef](#)]



Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits

Katarzyna Wierzchowska^{1,2} · Dorota Derewiaka³ · Bartłomiej Zieniuk¹ · Dorota Nowak² · Agata Fabiszewska¹

Received: 11 April 2023 / Revised: 19 June 2023 / Accepted: 23 June 2023 / Published online: 10 July 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Yarrowia lipolytica has found many biotechnological applications. The species has a number of regulatory mechanisms to maintain cellular homeostasis, enabling biomass growth in complex media. The aim of this study was to evaluate the use of *Y. lipolytica* yeast as a platform for the simultaneous management of several industrial by-products and the production of microbial lipids with application potential in the chemical and food industries. Batch cultures of KKP 379 strain were conducted in media with post-frying rapeseed oil (PFO) and a by-product of curd cheese production—acid whey. To evaluate the potential of *Yarrowia* as a nutraceutical, quantitative and qualitative analyses of microbial sterols were carried out along with an assessment of the biomass mineral composition. It was indicated that the composition and content of sterols varied depending on the phase of cell growth in batch culture. During culture in medium with 20% (v/v) whey and 50 g/L PFO, the cellular lipid content reached 39% (w/w). The highest amount of sterols per dry biomass (7.38 mg/g) and cellular lipids (21.08 mg/g) was recorded after 38 h of culture. The dominant was ergosterol 12.10 mg/g (57%). In addition, the composition of carbon and nitrogen sources in the medium affected the content of selected elements in biomass, indicating that substrate modification can be a tool for manipulating the composition of yeast cells. The results of the study showed that the selection of waste substrates is an important factor in regulation of the cellular lipid accumulation efficiency, as well as the content of certain sterols.

Keywords *Yarrowia lipolytica* · Microbial lipids · Sterols · Whey · Post-frying rapeseed oil

✉ Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl
Dorota Derewiaka
dorota_derewiaka@sggw.edu.pl
Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl
Dorota Nowak
dorota_nowak@sggw.edu.pl
Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

- ¹ Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159C Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland
- ² Department of Food Engineering and Process Management, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159C Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland
- ³ Division of Food Quality Assessment, Department of Food Technology and Assessment, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159 Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

Introduction

Despite the fact that currently there is enough food for about 7 billion people, almost 1 billion people suffer from malnutrition or hunger due to the unequal distribution of wealth and poverty [67]. The challenge is not only to feed the 10 billion people predicted by 2050, but also how to do this in a sustainable way, taking into account losses in biodiversity, soil erosion, climate change, pollution and greenhouse gas emissions [20]. The ability of microorganisms classified as oleaginous to accumulate above-average amounts of lipids called single cell oils (SCOs) in their cells has made them the subject of much research. Current trends continue to focus on obtaining these valuable compounds for the oleochemistry, food and feed industries [73].

Considering the human population growth, increasing demand for new sustainable nutrients, significant amounts of household and industrial wastes produced, microbiological disposal of them with simultaneous obtaining of value-added products is justified. Therefore over the last years,

SCOs extraction from cells of oleaginous microorganisms by culture in waste media has been repeatedly discussed [22, 36–41, 75, 75–80, 4]. The ability of *Y. lipolytica* species to biosynthesize microbial lipids under growth conditions in a variety of low-cost waste media e.g. grease, salad oil, crude glycerol, olive-mill wastewater, palm oil mill effluents, waste cooking oil, tuna wash processing wastewater, molasses, brine, urea, lard, mutton tallow, beef tallow and poultry fat have been reported in the literature [2, 3, 13, 15, 24, 35, 39, 42, 65, 70, 71, 78, 79, 81, 83].

Due to the possibility to achieve high biomass densities with rapid cell growth, which is essential for efficient production of SCOs, the yeast species *Yarrowia lipolytica* is considered to be the best studied microbial producer of bioproducts [36]. The yeast biomass of *Y. lipolytica* is not only a source of proteins, lipids, mainly unsaturated fatty acids (UFA) and carbohydrates, but also other bioactive compounds like minerals, vitamins or enzymes, [28, 33]. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) has given the species Generally Recognized As Safe (GRAS) status. As well as, the European Food and Safety Authority (EFSA) has declared it safe for food and feed [51, 85]. Unique biological capabilities like natural adaptability to various extreme growth environment conditions with limited nutrients, extreme pH values (2.5–8), salinity (up to 12%), temperatures (2–32 °C), tolerance to metal ions (zinc and copper sulphate, cobalt, cadmium, nickel) and ability to degrade both hydrophilic and hydrophobic substrates make the species a promising tool fitting into the concept of circular economy with great potential to be a part of solution for the global waste problem [1, 6].

Whey as a leachate after casein precipitation in the cheese-making process is a by-product of the dairy industry with still untapped potential. Annual worldwide whey output is 162 million tons, of which 75% is reused in Europe and less than 50% in the rest of the world. Acid whey contains more ash and fewer whey proteins compared to sweet whey, which complicates its industrial application, but at the same time creates opportunities as a substrate for microorganisms cultivation [37, 45, 71]. Among the industrial by-products particularly stimulating the process of microbial lipid accumulation, waste cooking oils stand out as a waste carbon source allowing to obtain oil-rich biomass with high efficiency. *Y. lipolytica* accumulated SCOs as high as 47% of cell dry mass [80]. More and more methods of processing and disposing of WCOs are being developed, but still the most common practices are based on landfilling which is associated with the risk of leakage into the environment. In a worse scenario, WCOs are illegally reused for food purposes posing serious risks to human health [19, 43, 84].

The approach of using *Y. lipolytica* yeast as a platform to manage industrial waste and by-products could have both

environmental and economic benefits resulting in new value-added products such as microbial lipids. In the study, batch cultures of *Y. lipolytica* KKP 379 yeast were carried out in media with post-frying rapeseed oil (PFO) and acid whey. A concept for the simultaneous utilization of those wastes has been proposed. PFO was a waste carbon source for yeast and cold-pressed rapeseed oil was used for comparative purposes. On the other hand, the use of whey was aimed at reducing water consumption in the process of growing oleaginous microorganisms, for which it was the main source of nitrogen. The effect of waste substrates on the lipid content of cell dry matter was evaluated. To highlight the potential of the microbial products, the lipid profile of the extracted SCOs was characterized and mineral analysis of the biomass cultured in the waste substrates has been carried out to evaluate their potential as nutraceuticals. In addition, for the first time a qualitative and quantitative analysis of microbial sterols from media containing both plant and animal substrates were conducted.

Materials and methodology

Microorganisms

The material for the study was a wild strain *Y. lipolytica* KKP 379 from the Collection of Industrial Microorganisms Cultures belonging to Institute of Agricultural and Food Biotechnology (IAFB, Warsaw, Poland). The strain was stored in 20% (v/v) glycerol solution in YPG medium (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) at – 20 °C.

Wastes

The waste post-frying rapeseed oil, in which cod fillets were fried at 170 °C in full immersion, came from a fish processing company in Podlaskie Voivodeship, Poland. Fatty acids (FA) composition of waste was myristic acid (C14:0) 0.36%; palmitic acid (C16:0) 3.78%; stearic acid (C18:0) 7.95%; oleic acid (C18:1) 60.92%; linoleic acid (C18:2) 14.93%; linolenic acid (C18:3) 6.18%; arachidic acid (C20:0) 4.15%; behenic acid (C22:0) 1.51%; erucic acid (C22:1) 0.05%; nervonic acid (C24:1) 0.09%. The acid whey was the residue from the production of curd cheese after the complete curdling of cow's milk from a local manufacturer in Podlaskie Voivodship, Poland.

Physicochemical analysis of whey

pH was measured with Elmetron pH-meter (Zabrze, Polska). The dry mass of whey was determined using a Radwag MAC 50/NH moisture analyzer (Radwag, Radom, Poland) at a temperature of 105 °C. The lipid content

was determined by the extraction-weight method. Lipids were extracted twice with n-hexane which was vacuum evaporated. The amount of fat extracted was calculated by relating the weight of the extracted lipids to the volume of whey used in the process. The protein content of whey was determined by the formol method based on the ability of formaldehyde to block the amino groups of proteins. This determination was carried out in two stages. The first was to neutralize the whey with a standard solution of sodium hydroxide in the presence of phenolphthalein. The second consisted in adding formaldehyde to the whey, as a result of which hydrogen ions from ϵ -amino groups were released and titration of the released hydrogen ions with a 0.1 M NaOH solution. The amount of amino groups that have been bound to the formalin were calculated (1 mL of 0.1 M NaOH corresponded to the content of 1.92 g of protein in 100 g of sample).

Culture conditions

Inoculum culture was provided in YPG medium at 28 °C for 24 h with a rotation amplitude of 140 rpm. Batch cultures of the strain were carried out in four medium variants in a BIOFLO 3000 laboratory bioreactor from New Brunswick Scientific (New Jersey, USA) at 28 °C (inoculum 0.025% (v/v)). During culture, the temperature, pH and oxygenation of the medium were monitored. The relative degree of oxygenation of at least 30% of the initial oxygen concentration was maintained by adjusting with compressed air at an overflow of 100 dm³/h/L of medium and a variable stirring speed in the range of 300–600 rpm. The base for all growth media was a mineral medium with the following composition: Na₂HPO₄, 2.5 g/L; MgSO₄, 1.5 g/L; CaCl₂, 0.15 g/L; FeSO₄ × H₂O, 0.16 g/L; MnCl₂ × 4H₂O, 0.08 g/L; ZnSO₄, 0.02 g/L. The culture variants differed in carbon sources (50 g/L) in the form of cold-pressed rapeseed oil or post-frying rapeseed oil, the content of (NH₄)₂SO₄ and KH₂PO₄ and the addition of acid whey which was used to replace part of the water in the culture media (Table 1). Kinetic parameters of *Y. lipolytica* batch culture were calculated according to Fabiszewska et al. [16].

Table 1 Composition of culture media in batch cultivation of *Y. lipolytica* strain

Medium	Hydrophobic carbon source	Whey	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄
CPO-0	Cold-pressed rapeseed oil	–	2.5 g/L	7.0 g/L
CPO-0.3	Cold-pressed rapeseed oil	30%	2.5 g/L	7.0 g/L
PFO-0.2	Post-frying rapeseed oil	20%	–	3.0 g/L
PFO-0.3	Post-frying rapeseed oil	30%	–	3.0 g/L

General analytical techniques

Biomass concentration in medium was determined based on cell dry weight (CDW) measured by thermogravimetric method. Cells were harvested by centrifugation (8000 rpm, 10 min) washed with redistilled water and dried at 105 °C. Dried samples of yeast biomass were crushed and homogenized in a mortar. Total C, N and S contents were determined by dry combustion (Vario MacroCube, Elementar, Germany). Total content of P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Al, Mn, Cu, Zn, Ni, Pb, Cr, V, Sr, Ba, Ti and Zr was measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry—ICP-OES (Avio 200, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) after samples digestion in a mixture of HNO₃ and HCl (3:1 v/v) using the microwave digestion system (Milestone Ethos Up, Sorisole, Italy). Microbial lipids were extracted from dry biomass using a Soxhlet apparatus; n-hexane was used as a solvent. The residual oil was extracted from 30 mL of medium by double straight extraction with portions of n-hexane. Next, after evaporation of the solvent by distillation under reduced pressure of 360 mbar (Buchi Rotavapor R-200 evaporator, Flawil, Switzerland), residual oil weight was measured.

Determination of cellular lipid composition

FA composition was analyzed by FAME gas chromatography. To generate volatile FA derivatives, the lipid samples were esterified with BF₃ (boron trifluoride) solution in methanol, according to the ISO method [27]. Measurements were made using a YL6100 GC chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and a BPX70 capillary column of 0.25 mm i.d. × 60 m in length and a layer thickness of 0.25 µm. The temperature program was as follows: 60 °C (5 min) to 180 °C (10 °C/min), 180 °C to 230 °C (15 min) (3 °C/min), injector temperature: 225 °C; detector temperature: 250 °C; injection volume: 2 µL. Nitrogen was used as the carrier gas. FAs were identified by retention time values compared to the standards.

Oil samples or standards were weighed and dissolved in 2 mL of hexane. 100 µL of 5 α -cholestane (10.5 mg/25 mL chloroform) was added as an internal standard. Measured compounds were derivatized with 0.5 mL of 2 M KOH in methanol for 1 h. 1 mL of upper layer was collected carefully and transferred to a glass vial, evaporated in a stream of nitrogen and 100 µL of silylating reagent (BSTFA + TMCS, 99:1) and 100 µL pyridine were added. The prepared sample was shaken and left for 24 h at room temperature to fulfill derivatization process. 0.2 mL of hexane was added and the trimethylsilyl ether sterols content was analyzed. The separation of sterol derivatives was performed with GC coupled with mass spectrometer Shimadzu-QP-2010S and capillary column ZB-5 ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)

stationary phase (5%—phenyl-arylene, 95%—dimethylpolysiloxane). Column temperature procedure: initial 60 °C (3 min) to 250 °C (temperature rate 15 °C/min), 250 °C to 310 °C (10 min) (temperature rate 3 °C/min). Carrier gas was helium with the flow 0.7 mL/min. Interface temperature of GC–MS was 250 °C. The ionization energy was 70 eV. The Total Ion Current (TIC) was used to detect sterols (m/z ranged 100–600). The qualitative analysis of trimethylsilyl ether was made on the basis of a comparison of their retention time with retention time of available standards and mass spectra as well as literature data. The internal standard 5 α -cholestane was used to quantify sterols. Results were presented in mg/g of oil. Each sample was analyzed in duplicate [12].

Statistical analysis

Statistical analyses of the results were performed using Statistica 13.0 set plus soft-ware (Statsoft, Cracow, Poland). Determination of fatty acid composition and sterols content was performed of repeated measurements with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test and p -value ≤ 0.05 were considered to be statistically significant.

Results and discussion

The oleaginous *Y. lipolytica* KKP 379 strain was cultured in 4 variants of media (Fig. 1) with hydrophobic carbon sources post-frying rapeseed oil (PFO) and conventional cold-pressed rapeseed oil (CPO). It was investigated how the waste nature of the substrates yeast growth and the quality of microbiological products: biomass and cellular lipids. The concept presented in the current paper assumed the use of whey as a diluent for the culture medium ingredients in order to replace a part of tap water.

Whey composition is influenced by many factors, e.g., lactation phase, method of breeding cattle or storage of milk [59]. It consists of about 93% water and contains 55% of the nutrients present in milk and about 20% of the total protein content. Its yellow-green color is due to the presence of riboflavin (vitamin B12). The main component of whey is lactose, the content of which varies around 70–75% of the total dry matter [29, 52]. Nevertheless, lactose content in the whey was irrelevant in the present study, because *Y. lipolytica* yeast are not capable of lactose utilization [28]. Since wild type strains do not assimilate lactose, a major carbon source in whey, a secreted β -galactosidase was introduced

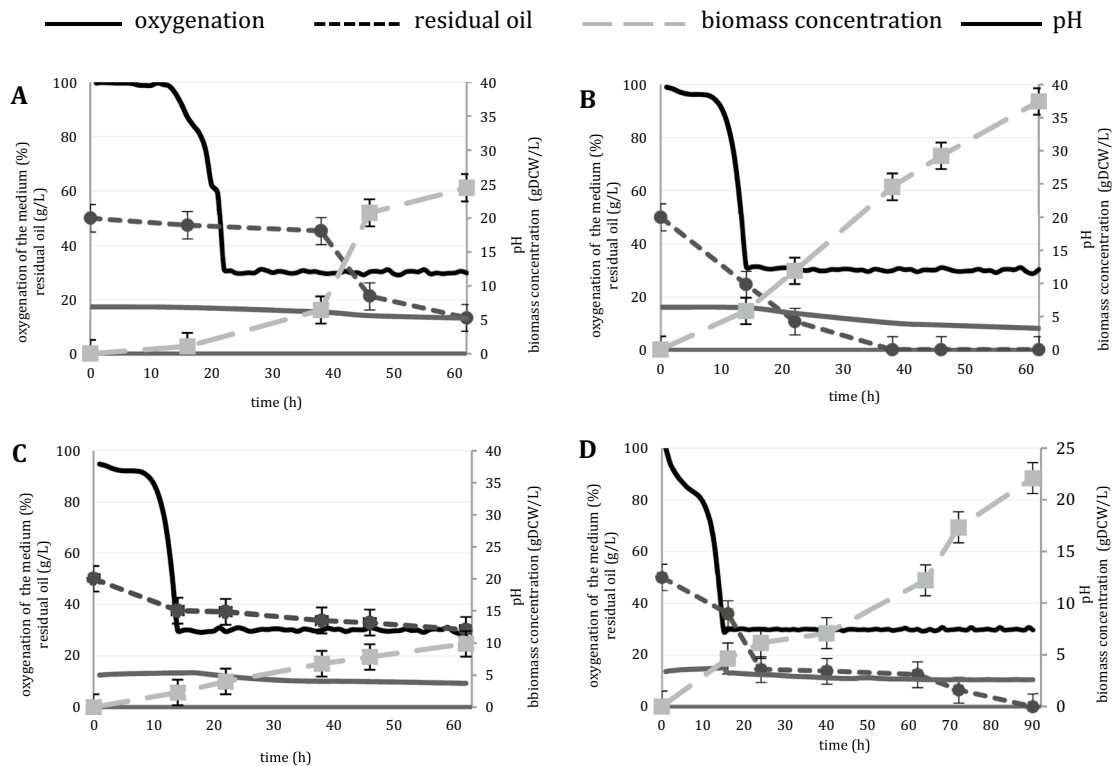


Fig. 1 Changes in the oxygenation of the medium, pH, biomass concentration of *Y. lipolytica* KKP 379 and content of residual lipid carbon sources in media with **A** cold-pressed rapeseed oil (CPO-0), **B** cold-pressed rapeseed oil and 30% addition of acid whey (CPO-0.3),

C post-frying rapeseed oil and 20% addition of acid whey (PFO-0.2) and **D** post-frying rapeseed oil and 30% addition of acid whey (PFO-0.3)

into engineered *Y. lipolytica* yeast strain what allowed to achieve rapid total conversion of all carbon sources in acid whey, producing 6.61 g/L of fatty acids [47]. Lactose was an insignificant source of carbon in yeast culture and hydrophobic compounds constituted only 0.2% m/v (Table 2.) The main source of carbon utilized by *Y. lipolytica* yeast was PFO or CPO. Still, the whey could be considered as additional nitrogen source as proteins constituted 1.4% m/v in the solution.

Batch cultures of *Y. lipolytica* in waste-based media

The CPO-0.3 culture with cold-pressed rapeseed oil and 30% acid whey addition had the highest biomass concentration, 37.44 g/L after 62 h of incubation (Fig. 1B). After 10 h, the cells entered an exponential growth phase resulting in a biomass concentration of 5.88 g/L. In second day of cultivation, the biomass production reached 29.22 g/L. The strain used the hydrophobic carbon source efficiently from the beginning of the culture period. Its initial concentration in medium was reduced from 50 to 24.67 g/L within the first 16 h. Until 38 h, the cells utilized the entire pool of carbon source available in the medium. The best result of biomass growth may have been related to the higher addition of whey, which contains not only nitrogen, but also phosphorus and other components necessary for growth. In addition, the medium was enriched with ammonium sulphate and potassium phosphate. The yield of microbial lipid biosynthesis in CPO-0.3 medium was 11.86% and the highest lipid concentration was noticed (4.44 g/L) (Table 2). The biomass concentration was nearly 40% lower (44 g/L) (Fig. 1A) after 62 h incubation of yeast in CPO-0 medium without the addition of whey, compared to the CPO-0.3 culture, corresponds to the result obtained after 38 h. The lag phase lasted 15 h, according to the medium oxygenation decrease. A significant increase in biomass concentration was noticed between 38 and 48 h, from 6.44 to 20.78 g/L. The cells utilized the lower amount of CPO. The content of the carbon source decreased to 21.22 g/L after 38 h. Finally, 5.23 g/L of oil remained unused by the cells in the medium. During culture, the yeast cells accumulated 3.83 g/L of storage lipids, which corresponds to 15.07% of dry cell weight.

The next two medium variants contained a waste PFO and an addition of acid whey at the level of 20 and 30%. The

ammonium sulfate was lacking in the medium and whey was the only nitrogen source. The addition of the source of phosphorus was decreased compared to the media with CPO. The culture conditions resulted in a lower dry cell mass. After 62 h of growth in PFO-0.2 and PFO-0.3 medium, the biomass concentration was 12.2 g/L and 9.89 g/L, respectively (Fig. 1C, D). Lag phase in both cultures lasted about 10 h. The extended culture time of PFO-0.3 variant resulted in a final biomass concentration of 22.1 g/L. The yeast efficiently utilized the lipid carbon source, reducing its content in the medium to 14.45 g/L after 24 h of incubation. The uninhibited yeast growth was observed, following which the yeast utilized the entire available pool of waste substrate. As opposed to the PFO-0.2 culture where the residual oil concentration amounted 30.22 g/L what reflected in limited growth potential. The disruption in yeast growth may have been caused by the depletion of the medium in nitrogen, which resulted from the lower proportion of whey in the medium. The yeast was unable to dispose of the entire carbon source. There can be seen a significant difference between culture provided in PFO-0.2 and PFO-0.3 medium (Fig. 1C, D). For yeast grown in post-frying oil with 30% whey medium the culture period was prolonged up to 90 h. At 60 h similar biomass concentrations have been achieved for variants C and D. pH was also not diverse as well as oxygen concentration profile. However, the difference could be noticed in residual oil content. Waste oil was fully utilized at 90 h in PFO-0.3 medium.

The differences in the efficiency of cellular lipid accumulation between culture variants were also noticeable. For PFO-0.2 and PFO-0.3 medium, changes in microbial lipid content during the culture process were analyzed (Table 3). The highest amount of lipids in the biomass from the PFO-0.3 medium occurred at the 16th hour of culture (30.77%), and decreased in the following hours. After 24 h of culture, the biomass contained 23.58% lipids, after 62 h—15.79%, and after 90 h—9.17%, corresponding to a final lipid concentration of 2.02 g/L. Higher SCO yields in PFO-0.2 medium could be explained by higher C:N ratio. Whey was considered as nitrogen source and its higher content lowered C:N ratio. It can be concluded that due to nitrogen content in whey its usage in growth medium is limited.

Regardless of the culture variant, a degradation of storage lipids in cells was noticeable. Biodegradation of previously synthesized lipids is a known process for oleaginous yeast. SCO are synthesized under carbon source excess. During growth of microorganisms carbon source is usually depleted and as a consequence storage metabolites are reused for purposes of growth and cell metabolism. This phenomenon was reported previously [78]. It has been also described for *Y. lipolytica* yeast cultured in glycerol medium when citric acid production was accompanied by storage lipids turnover and remarkable biosynthesis of glycolipids, sphingolipids and

Table 2 Physicochemical analysis of acid whey

Parameter (units)	Value
pH	4.4
Water content	92.5
Dry mass (%)	7.6
Lipids (% m/v)	0.2
Protein (% m/m)	1.4

Table 3 Kinetic parameters of *Y. lipolytica* KKP 379 batch cultures

	$T_{(h)}$	$S_{(g/L)}$	$X_{(g/L)}$	$L_{max_{(g/L)}}$	$Y_{L/X_{(g/g)}}$	$Y_{L/S_{(g/g)}}$	$Y_{L/X_{(g/g)}}$	$T_{(h)}$	PFO-0.2	PFO-0.3
CPO-0	62	50	25.44 ± 0.54	3.83 ± 0.18	0.1507	0.0766	16	0.2462	0.3077	0.3077
CPO-0.3	62	50	37.44 ± 0.74	4.44 ± 0.08	0.1186	0.0888	22	0.3077	0.2358	0.2358
							38	0.3500	0.2083	0.2083
PFO-0.2	62	50	9.89 ± 0.36	3.84 ± 0.19	0.3879	0.0768	48	0.3333	0.1955	0.1955
							62	0.3879	0.1579	0.1579
PFO-0.3	62	50	12.20 ± 0.22	1.93 ± 0.04	0.1579	0.0386	72	–	0.1719	0.1719
							90	–	0.0917	0.0917

Time (T), initial source of carbon concentration (S), maximum biomass concentration (X), maximum concentration of cellular lipids (L_{max}), cellular lipid yield per carbon source ($Y_{L/S}$), storage lipids yield per biomass ($Y_{L/X}$)

phospholipids [11, 46]. Not only *Y. lipolytica* but also *Rhodospiridium toruloides* revealed reconsumption of synthesized lipid metabolites [64]. Transfer of lipids from the neutral lipid fraction to fat-like compounds was also observed in this work.

In PFO-0.2 medium, yeast cells efficiently accumulated storage lipids even at the early stages of culture (Table 3). The storage lipid content in dry cells mass after 16 h of incubation was 24.61%. Subsequently, a further increase in the proportion of cellular lipids was observed until the end of the culture. After 24 h, the efficiency increased to 30.77%, and after 38 h to 35.0%. Finally, as a result of 62 h of the cultivation, the cellular lipid content of *Y. lipolytica* grown in PFO-0.2 medium reached the highest result among the four culture variants (38.79%).

Our experiment showed that in media containing whey and ammonium sulfate as an additional nitrogen source, the biosynthesis of cellular lipids was significantly reduced (Fig. 1, Table 3). The observations that were made are consistent with those in the experiment of Takin et al. (2015). The use of whey in culture medium requires the elimination of additional sources of phosphorus and nitrogen. As a result of *Y. lipolytica* culture in acid whey, it was proven that potassium phosphate as an additional phosphorus source at all concentration levels (0–2 g/L) significantly reduced the yield of lipid accumulation. It is well known that whey as a by-product of cheese making process is rich in phosphorus [71]. Excess of this element significantly reduces lipid accumulation in oleaginous yeast, as proven by the authors of the previous study. Through the approach of limiting the supplementation of nitrogen as well as phosphorus in the mineral medium with PFO, it was possible to increase the lipid content of *Y. lipolytica* to 47.5%. This proved that simultaneous limitation of both ingredients promoted lipid accumulation in cells [79].

The growth of yeast biomass was hindered in a medium with a lower addition of whey (PFO-0.2), but the conditions assumed favored efficient lipid accumulation at level

3.84 g/L (Table 3). The maximum lipid yield (L_{max}) was similar to the result achieved for CPO-0 culture (3.83 g/L). According to the previous reports, higher concentrations of ammonium sulfate in whey media significantly reduced lipid production, which is why no additional nitrogen supplementation was used in the PFO-0.2 culture. In the experiment of Taskin et al. [71] a lipid concentration of 3.16 g/L was also obtained in the medium without additional nitrogen source. For a maximum lipid yield of 4.29 g/L, as well as lipid content (58%), the researchers cultured a selected strain of a wild-type strain of *Y. lipolytica* isolated from soil samples in whey medium with the addition of lactose as an additional carbon source for 120 h. Lopes et al. [39] achieved a significant amount of microbial lipids in the medium (3 g/L) with an accumulation efficiency of 48% by culturing *Y. lipolytica* in a medium based on waste cooking oils, a result similar to those cited in the literature. Wierzchowska et al. [80] by limiting nitrogen and phosphorus in the culture medium also increased the proportion of SCO in biomass to 48%. Unfortunately, the composition of the medium reduced the concentration of lipids in the substrate to 0.37 g/L. There have been many experiments [25, 26, 31, 83], demonstrating that under conditions of mineral limitation and simultaneous unrestricted access to carbon, oleaginous yeast accumulate greater amounts of lipids in cells. The current experiment is another example supporting this assumption. The maintenance of cellular lipid content at high levels in the PFO-0.2 culture can be explained by the constant access of cells to carbon in the medium with the simultaneous reduction or depletion of the nitrogen source. In contrast to the PFO-0.3 culture, by having a higher proportion of whey in the medium, the yeast had better access to nitrogen and its growth was uninhibited. The hydrophobic carbon source was fully utilized for the growth needs, which did not promote the accumulation of storage lipids.

Whey composition is influenced by many factors, e.g. lactation phase, method of breeding cattle or storage of milk [59]. It consists of about 93% water and contains 55% of the

nutrients present in milk and about 20% of the total protein content. Its yellow-green color is due to the presence of riboflavin (vitamin B12). The main component of whey is lactose, the content of which varies around 70–75% of the total dry matter [29, 52]. Nevertheless, lactose content in the whey was irrelevant in the present study, because *Y. lipolytica* yeast are not capable of lactose utilization [28]. Since wild type strains do not assimilate lactose, a major carbon source in whey, a secreted β -galactosidase was introduced into engineered *Y. lipolytica* yeast strain what allowed to achieve rapid total conversion of all carbon sources in acid whey, producing 6.61 g/L of fatty acids [47]. The concept presented in the current paper assumed the use of whey as a diluent for the culture medium ingredients in order to replace a part of tap water. Lactose was an insignificant source of carbon in yeast culture (Table 2) and hydrophobic compounds constituted only 0.2% m/v. The main source of carbon utilized by *Y. lipolytica* yeast was waste rapeseed oil. Still, the whey could be considered as additional nitrogen source as proteins constituted 1.4% m/v in the solution.

Fatty acid composition and sterol content of microbial lipids

The fatty acid profile is essential to assess the SCOs quality. In the current study, oleic (C18:1), linoleic (C18:2), palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids were the mainly fatty acids, regardless of the medium variant (Table 4). The predominance of the unsaturated fraction was detected in all extracted SCOs, particularly C18:1 (41.67–71.60%) and C18:2 (14.74–18.41%) acids. Linolenic acid was noted in each sample, with the highest percentage in SCO from

PFO-0.3 culture (4.83%). Analyses showed that SCO samples from cultures with PFO and whey had an increased proportion of C16:0 acid compared to the media with CPO, PFO-0.3–17.09% and PFO-0.2–19.22%. The highest percentage of unsaturated fatty acids (UFA—87.66%) was detected in SCO from CPO-0 medium without whey. In contrast, the highest percentage of saturated fraction was found in cellular lipids from PFO-0.2 culture (SFA—40.28%). It should be mentioned that the composition of lipids extracted from the biomass is related to the composition of the substrates used in the cultures. The post-frying waste used in the current experiment was composed of 76% UFAs [15]. For all SCOs samples, the proportion was similar except for the PFO-0.2 culture, where UFAs accounted for only 59.71%. In commercial CPO, the content of C16:0 ranges from 3.97 to 5.30% [7, 32, 48], and C18:0 is from 1.10 to 2.14% [82]. In general, the composition is dominated by UFAs, C18:1 (56.2–70.01%) [48, 60] and C18:2 (7.74–20.54%) [62, 82] similarly to the samples of microbial lipids in our study. In contrast, bovine milk fat consists primarily of the saturated fraction, C16:0 (23.6–31.4%), C18:0 (10.4–14.6%) and C14:0 (9.1–11.9%), while the unsaturated C18:1 content ranges from 14.9 to 22.0% [44, 50].

SCOs from the cultures with hydrophobic animal wastes such as chicken or goat tallows are characterized by an increased proportion of SFAs, compared to microbial lipids obtained from the cultures containing vegetable fats including waste cooking oils. The microbial lipids derived from this type of substrate were dominated by saturated C16:0, 55% for chicken tallow and 43% for goat tallow. Interestingly, in the presence of pork lard, the ratio of unsaturated to saturated acids in SCO was higher than the composition of the waste substrate would indicate, C18:1 (35–53%) and C16:0 (25–48%) were predominantly accumulated in cells [39, 55, 56]. What should be added, the KKP 379 yeast strain cells accumulated proportionally free fatty acids from carbon source and slight differences could be observed for their content in cellular lipids and waste oil medium. Culture conditions do not significantly influence the fatty acids profile in lipids extracted from *Y. lipolytica* cells which usually reflect the fatty acids composition in waste oil [16, 14].

Very long chain fatty acids (VLCFAs) with 20 or more carbon atoms (C20:0, C20:1, C22:1, C24:1) were present in cellular lipids from all *Y. lipolytica* cultures variants in the current study. VLCFAs are usually found in small amounts in microbial oils of wild-type strains. The exception was a sample of cellular lipids from PFO-0.2 cultures, C20:0 FA accounted for 9.68% of all fatty acids. It is also necessary to add that in the post-frying waste profile, VLCFAs accounted for 7.59%, (C20:0–6.91%, C22:0–0.68%), but C22:1 and C24:1 acids were not detected [15]. The biosynthesis of VLCFAs may be associated with the elongation of C16–C18 FAs with fewer carbon atoms to C20–C26 FAs

Table 4 Fatty acid profile (%) of cellular lipids from batch culture of *Y. lipolytica* KKP 379 strain

	CPO-0	CPO-0.3	PFO-0.2	PFO-0.3
C14:0	0.37 ± 0.05 ^b	1.35 ± 0.03 ^a	0.81 ± 0.16 ^{ab}	0.82 ± 0.25 ^{ab}
C16:0	12.77 ± 0.53 ^b	4.47 ± 0.71 ^a	19.22 ± 2.48 ^c	17.09 ± 0.06 ^{ab}
C18:0	9.00 ± 3.62 ^a	4.13 ± 2.72 ^a	9.97 ± 2.60 ^a	4.86 ± 0.13 ^a
C18:1	51.74 ± 0.40 ^a	71.60 ± 3.58 ^b	41.67 ± 4.40 ^a	52.94 ± 7.09 ^a
C18:2	17.08 ± 1.89 ^a	14.71 ± 1.51 ^a	15.61 ± 0.52 ^a	18.41 ± 0.43 ^a
C18:3	2.07 ± 1.41 ^{ab}	0.77 ± 0.18 ^a	2.09 ± 0.51 ^{ab}	4.83 ± 0.90 ^b
C20:0	2.64 ± 1.13 ^{ab}	5.10 ± 0.59 ^a	9.68 ± 2.35 ^b	0.57 ± 0.19 ^a
C22:0	0.55 ± 0.45 ^a	0.65 ± 0.32 ^a	0.60 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.18 ^a
C22:1	0.13 ± 0.04 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.10 ^a	0.15 ± 0.03 ^a
C24:1	0.13 ± 0.05 ^{ab}	0.58 ± 0.32 ^b	0.12 ± 0.04 ^{ab}	0.08 ± 0.08 ^a
UFA	71.15 ± 2.98 ^{ab}	87.86 ± 5.23 ^b	59.71 ± 5.57 ^a	76.41 ± 5.64 ^{ab}
MUFA	52.00 ± 0.31 ^a	72.38 ± 3.89 ^b	42.01 ± 4.54 ^a	53.17 ± 6.98 ^a
PUFA	19.15 ± 3.30 ^a	19.15 ± 1.34 ^a	17.70 ± 1.03 ^a	23.24 ± 1.33 ^a
SFA	28.87 ± 5.78 ^{ab}	12.16 ± 2.89 ^a	40.28 ± 7.31 ^b	23.60 ± 0.32 ^{ab}

Lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

[17, 58]. Part of the fatty acids can be assimilated from the substrate, in connection with the “leaky-hose pipe model”, some intermediates of acyl-CoAs can be released from β -oxidation. PFO also contained the mentioned fatty acids, but in different proportions. This indicates other possible strain-dependent modifications promoting VLCFAs accumulation. Gajdoš et al. [17] reported the presence of arachidic (C20:0), eicosenoic (C20:1), behenic (C22:0) and lignoceric (C24:0) VLCFAs less than 3% of the total fatty acid in *Y. lipolytica* W29 wild strain. Moreover, a *Y. lipolytica* YL10 mutant capable of producing large amounts of VLCFAs especially erucic acid has been constructed to convert waste cooking oil (WCO) and crude glycerol to VLCFAs [17]. In another study, VLCFAs accounted for 34% of all fatty acids in the biomass of the YL53 mutant [18]. In the Fabiszewska et al. [16] study, fish industry waste was used to grow the wild KKP 379 strain, as in the current study. The carbon source for the cells was fish waste oil from the industrial smoking process. VLCFAs such as C20:0, C20:1, C22:1, C24:1 were present in the cell oils. In addition, the authors noted the contribution of C20:5 (eicosapentaenoic acid) and C22:6 (docosahexaenoic acid) which underscores the value of the unexploited potential of waste and by-products of the food industry [16]. Controlling the fatty acid profile of microbial lipids by selecting substrates with different more or less saturated fractions seems to be a promising solution giving the possibility of obtaining oils with a variety of compositions possible to design. SCO is a promising substrate in biodiesel synthesis and an alternative strategy for plant oils based on non-food sources. Dairy wastewater was efficiently used in *Chlorella vulgaris* microalgae culture with high biomass and lipid yield for biogas purposes [8]. Carota et al. [5] investigated 18 strains of oleaginous yeasts in Ricotta cheese whey as a growth medium. *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 turned out to be a promising candidate for biodiesel productions and the oil synthesized in cells resembled that of the *Jatropha* oil [5]. Good candidates for the synthesis of storage lipids constituted non-conventional oleaginous yeast *C. curvatus* ATCC 20509 and *Papiliotrema laurentii* NRRL Y-2536 grown in second cheese whey (main by-product in Mizithra cheese) supplemented with condensed cheese whey-derived lactose [76].

In cellular lipid samples from cultures with cold-pressed oil, post-frying rapeseed oil and acid whey, six major sterols were identified (Tables 5, 6, 7). Comparing the analyzed samples, β -sitosterol (2.17–47.57%), campesterol (9.74–40.15%), and stigmasterol (1.47–15.48%), phytosterols typical of vegetable oils, were identified. Microbial metabolites such as ergosterol (4.24–62.53%), dehydroergosterol (1.40–14.01%) and the animal membrane component cholesterol (0.2–14.84%) were also present (Table 6). Finally, the highest sterol content of 12.96 mg/g was found in lipid samples from yeast cells cultured in CPO-0.3 medium

Table 5 The content of major sterols in dry biomass *Y. lipolytica* KKP 379 cultured with cold-pressed rapeseed oil (CPO), post-frying rapeseed oil (PFO), 20% (0.2) and 30% (0.3) addition of acid whey

Culture variant	Time	Unit	Σ sterols
CPO-0	62 h	mg/g	1.12 ± 0.06^{abc}
CPO-0.3	62 h	mg/g	1.54 ± 0.31^{bc}
PFO-0.2	14 h	mg/g	0.06 ± 0.02^a
	22 h	mg/g	2.36 ± 0.29^{cd}
	38 h	mg/g	7.38 ± 0.41^e
	46 h	mg/g	3.57 ± 0.05^d
	62 h	mg/g	2.21 ± 0.27^c
PFO-0.3	90 h	mg/g	0.68 ± 0.05^{ab}

Lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

(Table 7), where ergosterol accounted for more than half (7.08 mg/g). In addition to the regulation of phospholipids and sphingolipids, the change in sterol composition is the main mechanism for maintaining membrane homeostasis [23, 66, 77]. As a stress response, sterols can be stored as steryl esters in lipid particles, free forms as a component of membrane structures, or secreted by cells into the medium [38, 69].

The content of cellular sterols from PFO-0.2 medium was analyzed during culture time. With the start of the culture process, sterol content increased. The highest amount of sterols both in terms of the amount of dry biomass (7.38 mg/g) (Table 5) and cellular oil extracted (21.08 mg/g) was recorded after 38 h (Table 7). The dominant compound was ergosterol 12.10 mg/g. During the following hours, the ergosterol content significantly decreased for the oil sample extracted from biomass cultured at 46 h and after 62 h (6.69 mg/g and 1.49 mg/g respectively) (Table 7).

Sterols, similar to FA, perform a regulatory function in the global fluidity and permeability of the cell membrane. Cells are able to increase the synthesis of sterols and saturated fatty acids (SFA) as an attempt to adapt the cell to environmental conditions. More UFA and less sterols increase the fluidity of the phospholipid bilayer structure [21, 53]. Therefore, the main role of ergosterol as a fungal equivalent of cholesterol is to stabilize the cell and protect it from harmful stress factors such as hypoxia, osmotic pressure or toxic components presence in medium [38, 69]. Disruption of cell integrity is associated with membrane modification, as well as metabolic disorders, which hinders biomass growth and reduces cell survival [54, 63]. As it is well known, acetyl-CoA is essential for cellular metabolism including ergosterol and microbial lipid biosynthesis. Therefore, the reduction of sterols between 38 and 62 h with in PFO-0.2 culture with simultaneous efficient accumulation of cellular lipids may be explained by the competitiveness of lipogenesis and the ergosterol biosynthesis pathway, which

Table 6 Quality profile of major sterols in cellular lipid samples from *Y. lipolytica* KKP 379 cultures with cold-pressed rapeseed oil (CPO), post-frying rapeseed oil (PFO), 30% (0.3) and 20% (0.2) addition of acid whey

	CPO-0	CPO-0.3	PFO-0.2					PFO-0.3
	62 h	62 h	14 h	22 h	38 h	46 h	62 h	90 h
Cholesterol (%)	0.38 ± 0.3 ^a	0.20 ± 0.05 ^a	11.49 ± 0.17 ^c	14.84 ± 2.34 ^c	4.16 ± 0.00 ^{ab}	3.61 ± 0.67 ^{ab}	4.88 ± 0.82 ^{ab}	5.61 ± 0.42 ^b
Dehydroergosterol (%)	14.01 ± 5.4 ^a	1.40 ± 0.03 ^a	8.24 ± 3.15 ^a	9.85 ± 0.05 ^a	6.35 ± 0.00 ^a	4.21 ± 0.69 ^a	12.03 ± 1.00 ^a	8.36 ± 0.21 ^a
Ergosterol (%)	49.90 ± 0.76 ^d	54.62 ± 0.09 ^{de}	4.24 ± 1.76 ^a	6.92 ± 0.53 ^a	57.40 ± 0.01 ^{de}	62.53 ± 5.25 ^e	26.09 ± 0.20 ^b	37.80 ± 0.28 ^c
Campesterol (%)	13.88 ± 4.04 ^a	40.15 ± 0.14 ^b	12.98 ± 7.09 ^a	24.08 ± 0.37 ^{ab}	12.59 ± 0.00 ^a	9.74 ± 1.89 ^a	20.36 ± 0.10 ^a	18.93 ± 0.82 ^a
Stigmasterol (%)	2.95 ± 0.23 ^a	1.47 ± 0.00 ^a	15.48 ± 3.96 ^b	7.51 ± 1.41 ^{ab}	1.90 ± 0.01 ^a	4.51 ± 0.47 ^a	4.13 ± 0.27 ^a	4.76 ± 2.21 ^a
β-sitosterol (%)	18.89 ± 2.07 ^{ab}	2.17 ± 0.31 ^a	47.57 ± 7.86 ^d	36.80 ± 1.87 ^{cd}	17.60 ± 0.00 ^{ab}	15.42 ± 2.46 ^{ab}	30.97 ± 1.00 ^{bcd}	26.92 ± 1.05 ^{bc}

Lowercase letters indicate significant differences between treatments for each sterol ($p < 0.05$)

Table 7 The content of major sterols in cellular lipid samples from *Y. lipolytica* KKP 379 cultures with cold-pressed rapeseed oil (CPO), post-frying rapeseed oil (PFO), 30% (0.3) and 20% (0.2) addition of acid whey

	CPO-0	CPO-0.3	PFO-0.2					PFO-0.3
	62 h	62 h	14 h	22 h	38 h	46 h	62 h	90 h
Cholesterol (mg/g)	0.03 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	1.14 ± 0.32 ^c	0.88 ± 0.04 ^{bc}	0.39 ± 0.10 ^{ab}	0.28 ± 0.01 ^{ab}	0.39 ± 0.00 ^{ab}
Dehydroergosterol (mg/g)	1.04 ± 0.45 ^{bc}	0.18 ± 0.03 ^{ab}	0.02 ± 0.00 ^a	0.76 ± 0.10 ^{abc}	0.134 ± 0.01 ^c	0.45 ± 0.08 ^{abc}	0.69 ± 0.14 ^{abc}	0.58 ± 0.22 ^{abc}
Ergosterol (mg/g)	3.71 ± 0.25 ^{bc}	7.08 ± 1.42 ^c	0.01 ± 0.00 ^a	0.53 ± 0.11 ^{ab}	12.10 ± 0.81 ^d	6.69 ± 0.91 ^c	1.49 ± 0.15 ^{ab}	2.61 ± 0.22 ^{ab}
Campesterol (mg/g)	1.03 ± 0.25 ^{ab}	5.20 ± 1.04 ^c	0.03 ± 0.01 ^a	1.85 ± 0.26 ^{ab}	2.65 ± 0.23 ^b	1.04 ± 0.27 ^{ab}	1.16 ± 0.15 ^{ab}	1.33 ± 0.05 ^{ab}
Stigmasterol (mg/g)	0.22 ± 0.03 ^{ab}	0.19 ± 0.04 ^{ab}	0.04 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.04 ^b	0.40 ± 0.12 ^{ab}	0.48 ± 0.08 ^{ab}	0.24 ± 0.04 ^{ab}	0.33 ± 0.00 ^{ab}
β-sitosterol (mg/g)	1.40 ± 0.08 ^b	0.28 ± 0.09 ^a	0.12 ± 0.08 ^a	2.82 ± 0.21 ^{cd}	3.71 ± 0.20 ^d	1.65 ± 0.34 ^b	1.77 ± 0.27 ^b	1.86 ± 0.07 ^{bc}
Σ (mg/g)	7.43 ± 0.38 ^{bc}	12.96 ± 2.63 ^c	0.25 ± 0.11 ^a	7.68 ± 0.95 ^{bc}	21.08 ± 1.17 ^d	10.71 ± 0.19 ^{bc}	5.70 ± 0.69 ^{ab}	6.90 ± 0.54 ^{bc}

Lowercase letters indicate significant differences between treatments for each sterol ($p < 0.05$)

starts with the condensation of two acetyl-CoA molecules. It is worth adding, that for yeast overproduction of ergosterol, access to oxygen is also a critical issue [38, 54]. Culture conditions may have led to changes in membrane structure. Manipulating the content of individual sterols is an effective method of yeast adaptation [77]. Yeast mutually converts steryl esters and free sterols depending on culture conditions [69, 72]. During *Y. lipolytica* yeast culture in media with a lipid carbon source, conversion from steryl esters stored in lipid particles to free sterols was observed to protect cell membranes from interference by hydrophobic substrates. In glucose medium, the opposite correlation was found [69]. According to the literature, *Y. lipolytica* biomass in lipid media contained more ergosterol in both free and ester forms than in glucose media. In addition, cells cultured with glucose were more susceptible to sterol depletion as a consequence of stress [68, 69].

In the authors' previous study, higher sterol contents were achieved in microbial lipid samples. *Y. lipolytica* lipid samples from fed-batch cultures with molasses as well as PFO contained 68.4 mg/g oil and 8.34 mg/g oil of sterols, respectively. In molasses-based cultures, the high content of

total sterols and especially ergosterol (60.16 mg/g oil) was explained by pretreatment of the substrate. Acid hydrolysis of molasses resulted in increased osmotic pressure of the growth medium [78]. Culture mode also may have influenced differences in sterol content between cultures. Ta et al. [69] suggested that cells cultured in media with peptone and amino acid additives are more resistant to sterol depletion.

The sterol content of conventional vegetable oils depends on many factors. For example, [34] proved that temperature conditioning of rapeseed increased sterol content by 16% compared to cold-pressed oils. The sterol content of all analyzed rapeseed oils ranged from 5.9 to 8.2 mg/g. Similarly, in the study by [61], the analyzed rapeseed oil samples contained 5.7–6.6 mg/g of total sterols. Based on literature reports describing the composition of vegetable oils, it is important to emphasize the potential of SCOs as a source of bioactive compounds such as sterols, the content of which was similar or higher with intensified biosynthesis of yeast ergosterol compared to conventional oils. Moreover, the unique properties of SCOs are related to the possibility of quality profiling through substrate regulation.

Ergosterol as provitamin D has been extensively studied for its positive effects behind the human body. The basis of the theory on the health-promoting effects of ergosterol was the great importance of vitamin D for the functioning of the entire body, such as bone health or the proper functioning of the cardiovascular and immune system, but also fertility [9, 30]. In vitro studies have demonstrated selective cytotoxicity of a combination of ergosterol and lipophilic triphenylphosphonium cations (TPP⁺) between healthy gastric endothelial cells (GES) and cancer cells, as well as inhibitory effects on breast (MCF-7) and liver (HepG2) cancer cells [57]. Additionally, research by Tiwari et al. [74] highlighting the promising role of bioactive components including ergosterol as nutraceuticals against COVID-19 seems extremely interesting. Therefore, SCOs with high ergosterol content could be a natural nutraceutical formula.

Mineral composition of *Y. lipolytica* biomass

Y. lipolytica biomass is considered a carrier of many nutrients, which accounts for its potential as an enrichment ingredient in the human diet, especially for vegetarians, vegans or athletes. This oleaginous species is not only a source of primarily UFAs, protein, sterols, but also B vitamins and minerals [28]. We investigated how waste substrates affected

the mineral composition of biomass from individual cultures with CPO, PFO and acid whey (Table 8). Biomass from CPO-0 substrate had the highest contents of N, K, S, Ca, Cr, Ni, V, Co, Sr and Li. There were no significant differences in the contents of Ti (1.80–8.12 mg/kg), Pb (0.88–1.63 mg/kg) and Al (26.75–62.2 mg/kg) between samples from all of the culture variants.

A favorable feature of *Y. lipolytica* biomass is its low sodium concentration [10, 28]. The biomass obtained from cultures with PFO-0.2 (1.12 g/kg) and PFO-0.3 (0.40 g/kg) had a significantly lower sodium content compared to CPO-0 and CPO-0.3 media, but also to the results presented by Czech et al. [10], where Na—12.81–19.38 g/kg. Czech et al. [10] analyzed the effects of feeding piglets with *Y. lipolytica* yeast biomass cultured on glycerol derived from rapeseed biofuel production. At the same time, the biomass of strain KKP 379 contained more P, Mg, Zn, Fe, Mn than the biomass produced from waste glycerol. [10, 49]. Sodium content was higher in biomass samples from cultures with CPO. The highest amount of Na was found for biomass grown in CPO-0.3 medium (71.62 g/kg).

The opposite trend was observed for Mn and Zn, whose content was higher in biomass cultured in PFO medium. Biomass samples from cultures with acid whey contained significantly more P (16.47–17.16 g/kg). Surprisingly, the

Table 8 Concentration of minerals in *Y. lipolytica* KKP 379 dry biomass from cultures with cold-pressed rapeseed oil (CPO), post-fried rapeseed oil (PFO), 30% (0.3) and 20% (0.2) addition of acid whey

Element	Unit	CPO-0	CPO-0.3	PFO-0.2	PFO-0.3	mean
C	g/kg	393.60 ± 1.00 ^a	544.25 ± 11.45 ^b	553.38 ± 0.64 ^b	542.50 ± 2.80 ^b	508.43 ± 76.70
N		46.26 ± 0.10 ^b	22.72 ± 0.00 ^a	12.16 ± 10.71 ^a	23.41 ± 0.35 ^a	26.14 ± 14.37
K		47.22 ± 0.01 ^d	11.48 ± 0.22 ^a	27.31 ± 0.18 ^c	20.25 ± 0.28 ^b	26.56 ± 15.22
Na		18.05 ± 0.14 ^b	71.62 ± 1.44 ^c	1.12 ± 0.03 ^a	0.40 ± 0.01 ^a	22.80 ± 33.56
P		12.51 ± 0.10 ^a	14.46 ± 0.31 ^b	16.47 ± 0.47 ^c	17.16 ± 0.10 ^c	15.15 ± 2.10
S		8.18 ± 0.58 ^b	2.12 ± 0.05 ^a	2.91 ± 0.01 ^a	3.04 ± 0.03 ^a	4.06 ± 2.78
Ca		3.61 ± 0.26 ^c	0.25 ± 0.10 ^a	2.37 ± 0.03 ^b	0.79 ± 0.05 ^a	1.75 ± 1.53
Mg		0.63 ± 0.00 ^a	1.91 ± 0.01 ^b	6.08 ± 0.04 ^d	3.95 ± 0.06 ^c	3.14 ± 2.39
Fe		0.14 ± 0.01 ^b	0.39 ± 0.04 ^c	0.56 ± 0.03 ^a	0.65 ± 0.01 ^a	0.44 ± 0.22
Mn		0.17 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.00 ^a	0.30 ± 0.00 ^d	0.23 ± 0.00 ^c	0.20 ± 0.08
Zn		0.15 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.00 ^b	0.17 ± 0.02
Al	mg/kg	26.75 ± 3.35 ^a	43.75 ± 39.65 ^a	59.66 ± 17.49 ^a	62.20 ± 21.20 ^a	48.09 ± 16.40
Ti		1.80 ± 0.43 ^a	4.09 ± 2.31 ^a	8.12 ± 0.13 ^a	2.04 ± 0.02 ^a	4.01 ± 2.93
Cr		6.37 ± 0.02 ^b	2.67 ± 0.52 ^a	2.56 ± 0.10 ^a	2.29 ± 0.24 ^a	3.47 ± 1.94
Cu		1.62 ± 0.08 ^{ab}	0.94 ± 0.08 ^a	5.96 ± 0.15 ^c	2.84 ± 0.57 ^b	2.84 ± 2.22
Ni		9.39 ± 0.30 ^c	5.14 ± 1.36 ^{ab}	4.77 ± 0.02 ^{ab}	1.08 ± 0.82 ^a	5.09 ± 3.40
Pb		0.95 ± 0.31 ^a	0.88 ± 0.34 ^a	1.63 ± 0.05 ^a	0.90 ± 0.27 ^a	4.84 ± 7.37
V		1.01 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.14 ^{ab}	0.51 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.43
Zr		1.94 ± 0.01 ^b	0.69 ± 0.17 ^a	2.17 ± 0.08 ^b	0.44 ± 0.05 ^a	1.31 ± 0.87
Co		0.41 ± 0.01 ^c	0.15 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^b	0.17 ± 0.17
Sr		12.18 ± 0.33 ^c	0.61 ± 0.16 ^a	5.43 ± 0.43 ^b	0.93 ± 0.08 ^a	4.78 ± 5.40
Ba		1.19 ± 0.06 ^a	0.89 ± 0.27 ^a	2.27 ± 0.01 ^b	0.45 ± 0.01 ^a	1.20 ± 0.78
Li		0.39 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.19

Lowercase letters indicate significant differences between treatments for each element ($p < 0.05$)

yeast biomass from the culture with 30% whey contained less calcium compared to the other two cultures. The composition of the medium in the PFO-0.2 culture resulted in biomass samples with the highest contents of Mg (6.08 g/kg), Cu (5.96 mg/kg) and Ba (2.27 mg/kg).

Overall, yeast biomass cultured in medium with whey and CPO or PFO contained more K, P, Mg, Zn and Fe compared to the biomass of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the Czech et al. [10] study, which contained K—1.34 g/kg, P—10.02 g/kg, Mg—1.48 g/kg, Zn—30.93 mg/kg and Fe—101.07 mg/kg. In the study, the authors demonstrated that *Y. lipolytica* yeast produced with waste glycerol is a good source of minerals, including Ca (3.04–5.48 g/kg), Zn (57.97–82.57 mg/kg), Na (12.81–19.38 g/kg), Mn (12.03–18.21 mg/kg), S (3.53–6.21 g/kg), K (19.10–25.14 g/kg) and Mg (1.82–2.04 g/kg). 82–2.04 g/kg, as well as valuable amino acids (tyrosine, tryptophan, leucine, lysine, valine or glycine), and can be successfully applied instead of the commonly used yeast *S. cerevisiae* [10].

Comparing the results with the authors previous study, KKP 379 strain grown in molasses medium contained more Cr, N, S and Cu. However, biomass was less abundant in minerals such as Na, P Ca, Mg, Fe and Al compared to acid whey media, which underscores the potential of the dairy industry by-product in *Y. lipolytica* biomass production [78].

Conclusions

In the face of the growing human population and the increasing amount of industrial waste, the search for sustainable solutions aimed at both waste utilization and meeting the nutritional needs of people seems to be one of the most important challenges of modern food science. The nutritional value of unconventional yeasts, such as *Y. lipolytica*, is still not fully understood. Once again, it has been proven that in a culture where it is possible to obtain a high concentration of biomass, it is not possible to obtain a high yield of microbial oil. During cell division, unlimited access to a source of nitrogen is necessary, the limitation of which promotes the accumulation of storage lipids. It seems reasonable to start work on continuous culture, in which it would be possible to collect the biomass characterized by a high concentration of microbial oil.

Meanwhile, this work is also the first in which both the mineral composition of oleaginous yeast biomass and the quantitative and qualitative assessment of sterols were simultaneously described. It was indicated that the composition and content of sterols in microbial lipids depending on the phase of cell growth in batch culture. In turn, the substrates in the culture medium affected the content of selected elements, which indicates that modification the culture medium may be a tool of manipulating the yeast cell

composition. This provides opportunities to profile the quality of *Y. lipolytica* yeast biomass, as well as the extracted oil. It is currently known that SCO can be a substitute for vegetable oils in terms of fatty acid profile. However, the present study proves the competitiveness of SCOs by highlighting their unique profile and content of valuable bioactive components like sterols.

In addition, the results of the experiment confirmed that the choice of waste substrates is a regulator of the cellular lipid accumulation efficiency, as well as the content of certain sterols. As can be seen, both vegetable and animal waste can be used in many ways in oleaginous yeast cultures. There is a clear trend in the use of oily wastes for the SCOs production, as well as yeast biomass. Highlighting the yeast's excellent job of valorizing troublesome fats, intracellular lipids can be used in many ways, such as the production of substitutes for different vegetable oils, where the sourcing of them may be costly, consuming time and resources. It is possible to control the culture process in such a way as to obtain the most valuable microbial products, e.g. for food purposes.

Author contributions KW: conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft preparation, visualization. DD: methodology, investigation. BZ: methodology, investigation, writing—review and editing. DN: methodology, investigation, resources, and supervision. AF: methodology, formal analysis, investigation, resources, writing—review and editing, and supervision.

Funding The study was financially supported by sources of the Ministry of Education and Science within funds of the Institute of Food Sciences of Warsaw University of Life Sciences (WULS), for scientific research.

Data availability The data generated during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Compliance with Ethics requirements This article does not contain any studies with humans and animal subjects.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Bao W, Li Z, Wang X, Gao R, Zhou X, Cheng S et al (2021) Approaches to improve the lipid synthesis of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 149:111386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111386>
- Bednarski W, Adamczak M, Kowalewska-Piontas J, Zadernowski R (1994) Biotechnological methods for the up-grading and modification of animal waste fats. *Acta Biotechnol* 14(4):387–393. <https://doi.org/10.1002/abio.370140412>
- Brabender M, Hussain MS, Rodriguez G, Blenner MA (2018) Urea and urine are a viable and cost-effective nitrogen source for *Yarrowia lipolytica* biomass and lipid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:2313–2322. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8769-z>
- Caporusso A, Capece A, De Bari I (2021) Oleaginous yeasts as cell factories for the sustainable production of microbial lipids by the valorization of agri-food wastes. *Fermentation* 7(2):50
- Carota E, Crognale S, D'Annibale A, Gallo AM, Stazi SR, Petruccioli M (2017) A sustainable use of Ricotta cheese whey for microbial biodiesel production. *Sci Total Environ* 584–585:554–560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>
- Carsanba E, Papanikolaou S, Erten H (2018) Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Crit Rev Biotechnol* 38(8):1230–1243. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>
- Chew SC (2020) Cold-pressed rapeseed (*Brassica napus*) oil: chemistry and functionality. *Food Res Int* 131:108997. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108997>
- Choi H-J (2016) Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application. *Environ Eng Res*. <https://doi.org/10.4491/eer.2015.151>
- Cito G, Cocci A, Micelli E, Gabutti A, Russo GI, Coccia ME, Franco G, Serni S, Carini M, Natali A (2020) Vitamin D and male fertility: an updated review. *World J Men's Health* 38(2):164. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190057>
- Czech A, Smolczyk A, Ognik K, Kiesz M (2016) Nutritional value of *Yarrowia lipolytica* yeast and its effect on growth performance indicators in piglets. *Ann Anim Sci* 16(4):1091–1100. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0034>
- Daskalaki A, Vasiladou IA, Bellou S, Tomaszewska-Hetman L, Chatzikotoula C, Kompoti B, Papanikolaou S, Vayenas D, Pavlou S, Aggelis G (2018) Data on cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* grown on fatty substrates. *Data Brief* 21:1037–1044. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.116>
- Derewiaka D, Stepnowska N, Bryś J, Ziarno M, Ciecierska M, Kowalska J (2019) Chia seed oil as an additive to yogurt. *Grasas Aceites* 70(2):e302–e302. <https://doi.org/10.3989/gya.0705182>
- Dobrowolski A, Mituła P, Rymowicz W, Mirończuk AM (2016) Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biores Technol* 207:237–243
- Fabiszewska A, Misiukiewicz-Stępień P, Paplińska-Goryca M, Zieniuk B, Białecka-Florjańczyk E (2019) An insight into storage lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules* 9(11):685. <https://doi.org/10.3390/biom9110685>
- Fabiszewska A, Wierzychowska K, Nowak D, Wołoszynowska M, Zieniuk B (2022) Brine and post-frying oil management in the fish processing industry—a concept based on oleaginous yeast culture. *Processes* 10(2):294. <https://doi.org/10.3390/pr10020294>
- Fabiszewska AU, Zieniuk B, Kozłowska M, Mazurczak-Zieniuk PM, Wołoszynowska M, Misiukiewicz-Stępień P, Nowak D (2021) Studies on upgradation of waste fish oil to lipid-rich yeast biomass in *Yarrowia lipolytica* batch cultures. *Foods* 10(2):436. <https://doi.org/10.3390/foods10020436>
- Gajdoš P, Hambalko J, Slaný O, Čertík M (2020) Conversion of waste materials into very long chain fatty acids by the recombinant yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 367(6):fnaa042. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa042>
- Gajdoš P, Urbaníková V, Vicenová M, Čertík M (2022) Enhancing very long chain fatty acids production in *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact* 21(1):138. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01866-6>
- Gao Z, Ma Y, Liu Y, Wang Q (2022) Waste cooking oil used as carbon source for microbial lipid production: promoter or inhibitor. *Environ Res* 203:111881. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111881>
- Ghazani SM, Marangoni AG (2022) Microbial lipids for foods. *Trends Food Sci Technol* 119:593–607. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.014>
- Girardi Piva G, Casalta E, Legras JL, Tesnière C, Sablayrolles JM, Ferreira D et al (2022) Characterization and role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during white wine alcoholic fermentation. *Fermentation* 8(2):90. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020090>
- Gottardi D, Siroli L, Vannini L, Patrignani F, Lanciotti R (2021) Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Trends Food Sci Technol* 115:74–86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.025>
- Guo L, Pang Z, Gao C, Chen X, Liu L (2020) Engineering microbial cell morphology and membrane homeostasis toward industrial applications. *Curr Opin Biotechnol* 66:18–26. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.05.004>
- Hamimed S, Barkaoui T, Trabelsi I, Landoulsi A, Chatti A (2021) High-performance biological treatment of tuna wash processing wastewater using *Yarrowia lipolytica*. *Environ Sci Pollut Res* 28:1545–1554. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10586-6>
- Hoarau J, Petit T, Grondin I, Marty A, Caro Y (2020) Phosphate as a limiting factor for the improvement of single cell oil production from *Yarrowia lipolytica* MUCL 30108 grown on pre-treated distillery spent wash. *J Water Process Eng* 37:101392. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101392>
- Huang X, Luo H, Mu T, Shen Y, Yuan M, Liu J (2018) Enhancement of lipid accumulation by oleaginous yeast through phosphorus limitation under high content of ammonia. *Biores Technol* 262:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.063>
- ISO 5509; Animal and Vegetable Fats and Oils—Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2001
- Jach ME, Malm A (2022) *Yarrowia lipolytica* as an alternative and valuable source of nutritional and bioactive compounds for humans. *Molecules* 27(7):2300. <https://doi.org/10.3390/molecules27072300>
- Jelicic I, Božanic R, Trawnik L (2008) Whey-based beverages—a new generation of dairy products. *Mljekarstvo* 58(3):257–274. <https://www.researchgate.net/publication/228631581>
- Jiang Q, Zhang M, Mujumdar AS (2020) UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms: effect of different drying conditions. *Trends Food Sci Technol* 105:200–210. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.011>
- Kolouchová I, Maťátková O, Sigler K, Masák J, Řezanka T (2016) Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiol* 61:431–438. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0454-y>
- Konuskan DB, Arslan M, Oksuz A (2019) Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region. *Saudi J Biol Sci* 26(2):340–344. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.005>

33. Kothri M, Mavrommati M, Elazzazy AM, Baeshen MN, Moussa TA, Aggelis G (2020) Microbial sources of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and the prospect of organic residues and wastes as growth media for PUFA-producing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 367(5):fnaa028. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa028>
34. Kraljić K, Škevin D, Pospišil M, Obranović M, Nederal S, Bosolt T (2013) Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperatures. *J Am Oil Chemists' Soc* 90(4):589–599
35. Lan WU, Gang GE, Jinbao WAN (2009) Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *J Environ Sci* 21(2):237–242. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62257-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62257-3)
36. Lazar Z, Liu N, Stephanopoulos G (2018) Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol* 36(11):1157–1170. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.007>
37. Lievore P, Simões DR, Silva KM, Drunkler NL, Barana AC, Nogueira A, Demiate IM (2015) Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *J Food Sci Technol* 52:2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
38. Liu JF, Xia JJ, Nie KL, Wang F, Deng L (2019) Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World J Microbiol Biotechnol* 35:1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2673-2>
39. Lopes M, Gomes AS, Silva CM, Belo I (2018) Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. *J Biotechnol* 265:76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.007>
40. Lopes M, Miranda SM, Alves JM, Pereira AS, Belo I (2019) Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production. *Eur J Lipid Sci Technol* 121(1):1800188. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800188>
41. Lopes M, Miranda SM, Costa AR, Pereira AS, Belo I (2022) *Yarrowia lipolytica* as a biorefinery platform for effluents and solid wastes valorization—challenges and opportunities. *Crit Rev Biotechnol* 42(2):163–183. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1931016>
42. Louhasakul Y, Cheirsilp B, Prasertsan P (2016) Valorization of palm oil mill effluent into lipid and cell-bound lipase by marine yeast *Yarrowia lipolytica* and their application in biodiesel production. *Waste Biomass Valoriz* 7:417–426. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9451-7>
43. Ma Y, Shen Y, Liu Y (2020) Food waste to biofertilizer: a potential game changer of global circular agricultural economy. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02210>
44. MacGibbon AKH (2020) Composition and structure of bovine milk lipids. In: *Advanced dairy chemistry, volume 2: lipids*. pp 1–32. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48686-0_1
45. Macwan SR, Dabhi BK, Parmar SC, Aparnathi KD (2016) Whey and its utilization. *Int J Curr Microbiol App Sci* 5(8):134–155. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2016.508.016>
46. Makri A, Fakas S, Aggelis G (2010) Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Biores Technol* 101(7):2351–2358. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.024>
47. Mano J, Liu N, Hammond JH, Currie DH, Stephanopoulos G (2020) Engineering *Yarrowia lipolytica* for the utilization of acid whey. *Metab Eng* 57:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.09.010>
48. McDowell D, Elliott CT, Koidis A (2017) Characterization and comparison of UK, Irish, and French cold pressed rapeseed oils with refined rapeseed oils and extra virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 119(8):1600327. <https://doi.org/10.1002/ejlt.20160327>
49. Merska M, Czech A, Ognik K (2015) The effect of yeast *Yarrowia lipolytica* on the antioxidant indices and macro-and microelements in blood plasma of turkey hens. *Pol J Vet Sci* 18(4):709–714. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0092>
50. Pacheco-Pappenheim S, Yener S, Heck JM, Dijkstra J, van Valenberg HJ (2021) Seasonal variation in fatty acid and triacylglycerol composition of bovine milk fat. *J Dairy Sci* 104(8):8479–8492. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19856>
51. Panel EB (2018) Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. *EFSA J* 16(7):5315. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5315>
52. Pires AF, Marnotes NG, Rubio OD, Garcia AC, Pereira CD (2021) Dairy by-products: a review on the valorization of whey and second cheese whey. *Foods* 10(5):1067. <https://doi.org/10.3390/foods10051067>
53. Qi Y, Liu H, Chen X, Liu L (2019) Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains. *Metab Eng* 53:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.010>
54. Qian YD, Tan SY, Dong GR, Niu YJ, Hu CY, Meng YH (2020) Increased campesterol synthesis by improving lipid content in engineered *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(16):7165–7175. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10743-4>
55. Radha P, Narayanan S, Chaudhuri A, Anjum S, Thomas DL, Pandey R, Ramani K (2023) Synthesis of single-cell oil by *Yarrowia lipolytica* MTCC 9520 utilizing slaughterhouse lipid waste for biodiesel production. *Biomass Convers Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01132-y>
56. Radha P, Suhazsini P, Prabhu K, Jayakumar A, Kandasamy R (2020) Chicken tallow, a renewable source for the production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* MTCC9520, and its application in silver nanoparticle synthesis. *J Surfactants Deterg* 23(1):119–135. <https://doi.org/10.1002/jsde.12357>
57. Ren W, Wu J, Wang J, Wang H, Han Y, Lin Y, Bu M (2023) Mitochondria-targeted ergosterol peroxide derivatives: synthesis, anticancer properties and their preliminary mechanism of inhibiting MCF-7 cell proliferation. *J Braz Chem Soc*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230054>
58. Rigouin C, Croux C, Borsenberger V, Ben Khaled M, Chardot T, Marty A, Bordes F (2018) Increasing medium chain fatty acids production in *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering. *Microb Cell Fact* 17:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0989-5>
59. Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Krentz A, Zhang L, Badiger S, Miyagusuku-Cruzado G, García-Cano I (2021) Acid whey trends and health benefits. *J Dairy Sci* 104(2):1262–1275. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>
60. Różańska MB, Kowalczyński PŁ, Tomaszewska-Gras J, Dwiecki K, Mildner-Szkudlarz S (2019) Seed-roasting process affects oxidative stability of cold-pressed oils. *Antioxidants* 8(8):313. <https://doi.org/10.3390/antiox8080313>
61. Rękas A, Siger A, Wroniak M, Ścibisz I, Derewiaka D, Anders A (2017) Dehulling and microwave pretreatment effects on the physicochemical composition and antioxidant capacity of virgin rapeseed oil. *J Food Sci Technol* 54:627–638
62. Rękas A, Wroniak M, Szterk A (2016) Characterization of some quality properties and chemical composition of cold-pressed oils obtained from different rapeseed varieties cultivated in Poland. *Polish J Nat Sci* 31(2):249–261
63. Sandoval NR, Papoutsakis ET (2016) Engineering membrane and cell-wall programs for tolerance to toxic chemicals: beyond solo genes. *Curr Opin Microbiol* 33:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.005>
64. Sarantou S, Stoforos NG, Kalantzi O, Papanikolaou S (2020) Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and

- Rhodospiridium sp. Carbon Resour Convers 4:61–75. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2020.12.006>
65. Sarris D, Rapti A, Papafotis N, Koutinas AA, Papanikolaou S (2019) Production of added-value chemical compounds through bioconversions of olive-mill wastewaters blended with crude glycerol by a *Yarrowia lipolytica* strain. Molecules 24(2):222. <https://doi.org/10.3390/molecules24020222>
 66. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. Nat Rev Mol Cell Biol 18(6):361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
 67. Sharma P, Dwivedi S, Singh D (2016) Global poverty, hunger, and malnutrition: a situational analysis. Biofortification of food crops. pp 19–30. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2716-8_2
 68. Ta TMN, Cao-Hoang L, Romero-Guido C, Lourdin M, Phan-Thi H, Goudot S et al (2012) A shift to 50 °C provokes death in distinct ways for glucose-and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 93:2125–2134. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3537-3>
 69. Ta TMN, Romero-Guido C, Phan TH, Tran HD, Dinh HT, Waché Y (2022) Encapsulation of flavours into *Yarrowia lipolytica* active yeast cells. Fluorescence study of the lipid droplets morphology and steryl/sterol balance during the shock. AIMS Biophysics 9(3):257–270. <https://doi.org/10.3934/biophy.2022022>
 70. Tan KH, Gill CO (1985) Batch growth of *Saccharomycopsis lipolytica* on animal fats. Appl Microbiol Biotechnol 21(5):292–298. <https://doi.org/10.1007/BF00252707>
 71. Taskin M, Saghaian A, Aydogan MN, Arslan NP (2015) Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. Biofuels Bioprod Biorefin 9(5):595–605. <https://doi.org/10.1002/bbb.1560>
 72. Taylor FR, Parks LW (1978) Metabolic interconversion of free sterols and steryl esters in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 136(2):531–537. <https://doi.org/10.1128/jb.136.2.531-537.1978>
 73. Thevenieau F, Nicaud JM (2013) Microorganisms as sources of oils. Oilseeds Fats Crops Lipids 20(6):D603. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013034>
 74. Tiwari A, Singh G, Choudhir G, Motiwale M, Joshi N, Sharma V, Srivastava RK, Sharma S, Tutone M, Singour PK (2022) Deciphering the potential of pre and pro-vitamin D of mushrooms against Mpro and PLpro proteases of COVID-19: an in silico approach. Molecules 27(17):5620. <https://doi.org/10.3390/molecules27175620>
 75. Tomás-Pejó E, Morales-Palomo S, González-Fernández C (2021) Microbial lipids from organic wastes: outlook and challenges. Biores Technol 323:124612. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124612>
 76. Vasilakis G, Karayannis D, Massouras T, Politis I, Papanikolaou S (2022) Biotechnological conversions of mizithra second cheese whey by wild-type non-conventional yeast strains: production of yeast cell biomass, single-cell oil and polysaccharides. Appl Sci 12:11471. <https://doi.org/10.3390/app122211471>
 77. Walker C, Ryu S, Trinh CT (2019) Exceptional solvent tolerance in *Yarrowia lipolytica* is enhanced by sterols. Metab Eng 54:83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.03.003>
 78. Wierzchowska K, Pakulska A, Derewiaka D, Piasecka I, Zieniuk B, Nowak D, Fabiszewska A (2022) Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Appl Sci 12(24):12877. <https://doi.org/10.3390/app122412877>
 79. Wierzchowska K, Zieniuk B, Fabiszewska A (2021) Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. Waste Biomass Valoriz 13:757–779. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01516-9>
 80. Wierzchowska K, Zieniuk B, Nowak D, Fabiszewska A (2021) Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Appl Sci 11(24):11819. <https://doi.org/10.3390/app112411819>
 81. Wonganu B, Kongruang S, Charoensakdi R (2021) Statistical design and optimization of nutritional value production by an oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* cultured in industrial-waste molasses. E3S Web Conf 302:02022. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202130202022>
 82. Wroniak M, Rekas A (2016) Nutritional value of cold-pressed rapeseed oil during long term storage as influenced by the type of packaging material, exposure to light & oxygen and storage temperature. J Food Sci Technol 53:1338–1347. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2082-y>
 83. Wu S, Hu C, Jin G, Zhao X, Zhao ZK (2010) Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. Biores Technol 101(15):6124–6129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.111>
 84. Zhao N, Li B, Li H, Li G, Wu R, Hong Q et al (2021) The potential co-benefits for health, economy and climate by substituting raw coal with waste cooking oil as a winter heating fuel in rural households of northern China. Environ Res 194:110683. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110683>
 85. Zieniuk B, Fabiszewska A (2019) *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. World J Microbiol Biotechnol 35:1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs

Katarzyna Wierzchowska^{a,b,*}, Marek Roszko^c, Dorota Derewiaka^d, Karolina Szulc^b,
Bartłomiej Zieniuk^a, Dorota Nowak^b, Agata Fabiszewska^{a,**}

^a Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776, Warsaw, Poland

^b Department of Food Engineering and Process Management, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776, Warsaw, Poland

^c Department of Food Safety and Chemical Analysis, Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, State Research Institute, Rakowiecka 36 Street, Warsaw, Poland

^d Division of Food Quality Assessment, Department of Food Technology and Assessment, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159 Nowoursynowska Street, 02-776, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Yarrowia lipolytica

Microbial lipids

Fatty acids

Sterols

Plant-based camembert analog

Waste oil

ABSTRACT

The main objective of the study was to develop a concept for the use of oleaginous *Yarrowia lipolytica* biomass and single-cell oil (SCO) as vegan food components. SCOs were derived from the wild-type strain KKP 379, cultured in media containing glucose, cold-pressed rapeseed oil, and cost-effective carbon sources such as molasses and post-frying rapeseed oil. Confocal microscopy analysis of the biomass and detailed analysis of the composition of fatty acids, sterols, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the extracted lipids were conducted. The choice of substrates allowed to obtain SCO from post-frying rapeseed oil medium with the desired yield (3.27 g/L), composition (UFA - 93.34%), and high oxidative stability (T_{max} -204.94 min, 120 °C, isothermal conditions). The content of hexane as an extraction solvent was also evaluated, which also complied with European Union requirements (0.0007 mg/kg). All SCOs from *Y. lipolytica* met the European Commission's requirements for marketed oils and fats for maximum levels of benzo[a]pyrene and the sum of benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene and chrysene. The content of benzo[a]pyrene was in the range of 0.52–1.71 µg/kg. Finally, the oleaginous yeast biomass was subsequently applied as an enrichment additive in plant-based analogs of Camembert-type cheese, and its potential for use in fat-rich vegan food products was discussed.

1. Introduction

As the global population continues to rise, the Earth's ability to replenish its resources is gradually declining. The resources necessary for food production are diminishing, highlighting the need for innovative strategies to ensure a sufficient and sustainable supply for both the current and future populations. To meet the needs of a growing population, it is essential to integrate the principles of a circular economy with increased food production. Various strategies have been developed to overcome the challenges of food production and the efficient use of available resources. These include the genetic modification of beneficial microorganisms and plant species, improving the nutritional value of food, and producing new food alternatives or ingredients using insects,

microorganisms, algae, or cell cultures (Grafton et al., 2015; Hassoun et al., 2023; Valoppi et al., 2021).

Biotechnologies based on microorganisms have a long history in the food industry. Oleaginous yeasts are considered one of the tools for sustainably maximizing food production. Lipids are an essential component of microorganism cell membranes, but among the approximately 600 known yeast species, only about 25 can accumulate more than 20% of lipids in dry biomass as lipid bodies (Ratledge, 1987; Bélignon et al., 2016; Ghazani & Marangoni, 2022). In the 1940s, extensive research on the commercialization of microbial oils was conducted in Europe and the United States. However, the development of mass production of plant oils, market saturation, and a decline in the prices of seed oils led to Single-Cell Oils (SCO) becoming economically

* Corresponding author. Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159c Nowoursynowska Street, 02-776, Warsaw, Poland.

** Corresponding author.

E-mail addresses: katarzyna.wierzchowska@sggw.edu.pl (K. Wierzchowska), marek.roszko@ibprs.pl (M. Roszko), dorota.derewiaka@sggw.edu.pl (D. Derewiaka), bartlomiej.zieniuk@sggw.edu.pl (B. Zieniuk), dorota.nowak@sggw.edu.pl (D. Nowak), agata.fabiszewska@sggw.edu.pl (A. Fabiszewska).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105321>

Received 8 July 2024; Received in revised form 16 October 2024; Accepted 20 October 2024

Available online 22 October 2024

2212-4292/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

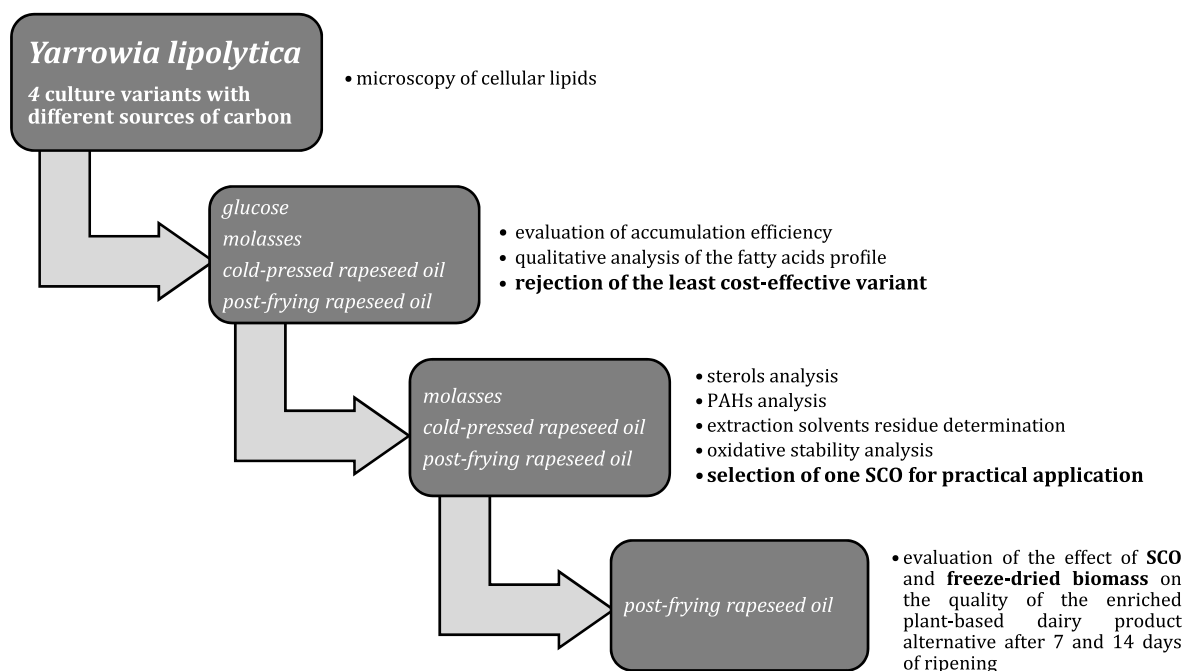


Fig. 1. The idea of the experiment.

unviable and non-competitive (Ratledge, 2010).

Oleaginous microorganisms can be cultivated in various modes, including batch, fed-batch, and continuous. The fed-batch mode has been suggested as the most efficient solution allowing precise control of substrate and nutrient dosage during culture (Beopoulos & Nicaud, 2012; Wierchowska et al., 2022). The cultivation mode strongly influences the performance of microbial lipid biosynthesis, similar to the limitation of mineral substrates, especially nitrogen and phosphorus (Bao et al., 2021; Kamzolova et al., 2022; Wierchowska et al., 2021, 2022). On the other hand, maintaining a high level of carbon flux is crucial and plays a substantial role in determining cultivation expenses. Hence, researchers have explored the utilization of inexpensive substrates like industrial or agricultural by-products to reduce the overall cost of SCO production. The cost of the substrate can account for up to 80% of the total cultivation cost of oleaginous microorganisms. The utilization of various materials has already been investigated, including molasses, waste cooking oils, whey, brine, wastewater from palm oil mills, crude glycerol, and lignocellulosic biomass (Fabiszewska et al., 2022; Rafiq et al., 2023; Vasaki et al., 2022; Wierchowska, Zieniuk, Nowak, & Fabiszewska, 2021, 2022, 2023).

The main factors determining the potential of bioprocesses using the oleaginous yeast are not only the natural ability of yeast to produce valuable lipids and extensive knowledge of microorganism metabolism but also the ability to control cultivation conditions while simultaneously utilizing inexpensive substrates, resistance to harmful by-products in the media (Rafiq et al., 2023; Wierchowska, Zieniuk, Nowak, & Fabiszewska, 2021).

The features of oleaginous biomass and microbial lipids production allow for the recognition of the potential of products obtained through this approach. SCOs do not contain residues of fertilizers, pesticides, or herbicides that might be present in plant oils (Ghazani & Marangoni, 2022). The microbial lipids are free of heavy metal residues that can pose a risk in fish oils (Wierchowska et al., 2022, 2023). The undoubted advantage of microbial lipid production is that its supply is not affected by fluctuations in environmental conditions and can be produced year-round with consistent composition and quality. Importantly, cell biomass after SCO extraction may be regarded as valuable animal feed, but its nutritional value can also be useful in food technology (Bélignon et al., 2016; Jach & Malm, 2022; Rafiq et al., 2023). Much research is

currently being conducted on the best ways to utilize the biomass of oleaginous yeast. This involves using microbial biomass as a carrier for lipids, vitamins, and minerals, as well as extracted components such as triacylglycerols, specific unsaturated fatty acids, or various sterols (Juszczak, Tomaszewska, Kita, & Rymowicz, 2013; Jach & Malm, 2022; Wierchowska et al., 2023). These can be used as dietary supplements or as additives to enrich new or existing food products (Commission Implementing Regulation (EU) 2024/2044 of 29 July 2024). The development of product formulations that include oleaginous biomass or SCOs can be a way to take advantage of the potential of oleaginous microorganisms.

The perceived trend toward vegan and plant-based alternatives to conventional products has contributed to the development of interest in dairy analogs as well, including cheese. In addition, the nutritional value of cheese analogs can be varied by enriching them with vitamins, minerals, and other additives, due to their compositional flexibility (Kamath et al., 2022). In this regard, the current study attempted to develop a concept for the application of oleaginous *Y. lipolytica* yeast biomass and extracted microbial oil as vegan food additives. The fatty acid composition, sterols, and polycyclic aromatic hydrocarbons in single-cell oil (SCO) from biomass grown in substrates containing glucose, cold-pressed rapeseed oil, as well as cost-effective carbon sources like molasses and post-frying rapeseed oil were thoroughly analyzed. The highest-quality oil identified in the analysis was considered for potential use as an enriching additive in plant-based cheese analogs, and the impact of the additive on the quality of the final product was evaluated. This study is the first to incorporate yeast-derived lipids into plant-based cheese analogs using both extracted intracellular lipids and whole yeast biomass.

2. Methods

2.1. Chemicals

All reagents and solvents, including components of media, used in the following study were provided by Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Poland), excluding fatty acids mixture and sterols standards used in the GC study, provided by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). High-purity (>97%) native PAH standards were supplied by

Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and AccuStandard (New Haven, CT, USA).

2.2. Yeast strain and culture conditions

Y. lipolytica KKP 379 strain was obtained from the Collection of Industrial Microorganisms Cultures belonging to the Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology – State Research Institute (IAFB, Warsaw, Poland). The strain was stored in 30% (v/v) glycerol solution in YPG medium (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) at -80°C . Microbial lipid samples were collected from yeast biomass cultured in four media variant with different sources of carbon: glucose (100 g/L), molasses (50 g/L), cold-press rapeseed oil (50 g/L) or waste rapeseed oil after fish frying (50 g/L) (Fig. 1). All culture media also contained: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 g/L and KH_2PO_4 , 7 g/L Na_2HPO_4 , 2.5 g/L; MgSO_4 , 1.5 g/L; CaCl_2 , 0.15 g/L; $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.16 g/L; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L; ZnSO_4 , 0.02 g/L. The exception was the culture medium with molasses contained: Na_2HPO_4 , 1.5 g/L, and yeast extract, 0.5 g/L. Batch cultures of yeast were carried out in the BIOFLO 3000 laboratory bioreactor from New Brunswick Scientific (New Jersey, USA) at 28°C (inoculum 0.025% (v/v)). During the process, the temperature, pH, and oxygenation of the medium were monitored. The relative degree of oxygenation at a minimum of 30% of the initial oxygen concentration was maintained by adjusting with compressed air (variable stirring speed of 200–600 rpm).

2.3. Waste

The waste oil after cod frying originated from a fish processing company in Podlaskie Voivodship in Poland. The oil was filtered and the solid particles separated. Taking into account that *Yarrowia* yeast does not produce the invertase enzyme, molasses obtained from the sugar refinery was hydrolyzed with 98% sulfuric acid after double dilution, and the obtained hydrolysate consisted of 58% reducing sugars.

2.4. Experimental plan

To fulfill the aim of the study, there was planned an experiment comprising four steps (Fig. 1). Yeast cells from cultures in media with four different carbon sources (glucose, molasses, cold-pressed rapeseed oil, and post-frying rapeseed oil) were analyzed microscopically and subjected to microbial lipids extraction. The kinetic parameters of the culture and the fatty acid profile of the extracted SCOs were evaluated. In the next step, the selected three SCOs were examined for sterol content, polycyclic aromatic hydrocarbon content, and oxidative stability in order to select one SCO in the final step of the experiment, which could become an ingredient in the recipe of the selected food product.

2.5. General analytical techniques for yeast biomass

Biomass concentration was determined based on dry cell weight (DCW) measured by the drying method at 80°C . Cells were harvested by centrifugation (8000 rpm, $(6869 \times g)$, 10 min) in an MPW-351R centrifuge (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland), washed with redistilled water, and dried. Dried yeast biomass samples were crushed and homogenized in a laboratory grinder (Tube Mill control, IKA Poland Sp. z o.o, Warsaw, Poland). Microbial lipids were extracted from dry biomass using a Soxhlet apparatus with *n*-hexane as a solvent. Next, the solvent was evaporated by distillation under a reduced pressure of 360 mbar (Buchi Rotavapor R-200 evaporator, Flawil, Switzerland).

2.6. Confocal microscopy

A scanning laser confocal microscope, the Olympus Fluoview FV3000 (Olympus Corporation, Japan), was used to image the morphology of *Y. lipolytica*. Nile Red (Sigma-Aldrich) was used to stain

the lipid bodies. Nile Red solution was prepared in ethanol at a concentration of 1 mg/mL. Observations were made at an excitation wavelength of 488 nm using a 63 $\times$ objective (oil immersion).

2.7. Fatty acids analysis

Fatty acids (FA) composition was analyzed by using a YL6100 GC gas chromatograph (Young Lin Bldg., Anyang, Hogyedong, Korea), as described by Bryś et al. (2017). To generate volatile FA derivatives, the lipid samples were methylated to fatty acid methyl esters (FAME) with the PN-EN ISO:2001 method (2001). FAs were identified by retention time values compared to the standards. To obtain the fatty acid profile of microbial lipid samples, the percentage of each FA was calculated using the area normalization procedure.

2.8. Sterol analysis

Methods used in this study have been previously described by Wierzchowska et al. (2022; 2023). In brief: microbial lipids samples were weighed and dissolved in 2 mL of hexane. 100 μL of 5 α -cholestane (10.5 mg/25 mL chloroform) was added as an internal standard. Measured compounds were derivatized with 0.5 mL of 2M KOH in methanol for 1 h. The upper layer (1 mL) was collected carefully and transferred to a glass vial, evaporated in a stream of nitrogen and 100 μL of silylation reagent (BSTFA + TMCS, 99:1) and 100 μL pyridine were added. The prepared sample was shaken and left for 24 h at room temperature to fulfill the derivatization process. 0.2 mL of hexane was added and the trimethylsilyl ether sterols content was analyzed. The separation of sterol derivatives was performed with GC coupled with mass spectrometer Shimadzu-QP-2010S and capillary column ZB-5 ms (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) stationary phase (5%- phenyl-arylene, 95%- dimethylpolysiloxane). The qualitative analysis of trimethylsilyl ether was made based on a comparison of their retention time with a retention time of available standards and mass spectra as well as literature data. Results were presented in mg/g of oil. Each sample was analyzed in duplicate (Wierzchowska et al., 2023).

2.9. PAHs analysis

For the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), the parameters described by Roszko et al. (2018, 2020) were used. A Thermo-Finnigan Trace GC Ultra gas chromatograph (Austin, TX, USA) connected via a heated transfer line with a Polaris Q low-resolution ion trap mass spectrometer (Austin, TX, USA) equipped with a programmable temperature vaporizer (PTV)-based injector and TriPlus Autosampler (Austin, TX, USA) were used. Chromatographic separations were performed on a 20 $\times$ 0.18 mm $\times$ 0.18-mm Rtx-17MS fused-silica capillary column (Restek, Bellefonte, PA, USA) connected via a Vu2 Union connector (Restek) to a 5m $\times$ 0.53 mm guard column/retention gap (Restek). As a carrier gas, helium was used at a constant flow of 1.2 mL/min. Cellular lipid analyses were performed in duplicate (Roszko et al., 2020).

2.10. Residual solvents determination

Approximately 0.3 g of samples were transferred into glass vials with a 20 mL capacity, and the vials were sealed with a silicone septum. The internal standard (1,2-dichlorobenzene) was added to each sample (5 μL of 0.01% solution in methanol). The sampling process was carried out using DVB/CAR/PDMS fiber, which was 1 cm in length, at a temperature of 50°C , with an absorption time of 40 min through the SPME system. Subsequently, the fiber was inserted into the GC/MS injector, and desorption took place after 2 min in splitless mode. The equipment used for the experiment was GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Japan). A Stabilwax column (30.00 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm , made of polyethylene glycol) by Restek was employed for the separation of aroma

compounds. Helium served as a carrier gas with a column flow rate of 0.64 mL/min. The column temperature program was as follows: an initial temperature of 40 °C for 10 min, followed by a ramping rate of 5 °C/min to 200 °C, where it was held for 2 min, and then a further increase 220–250 °C at a rate of 20 °C/min, with 10-min hold at 250 °C. The entire analysis lasted for 54.5 min. The interface and injector temperatures were maintained at 250 °C, and the ion source temperature was also set at 250 °C. Mass spectra were acquired in the electron impact mode 70 eV energy, using a full scan over a mass acquisition range of 40–450 m/z. The identification of aroma compounds was made based on mass spectra libraries (NIST 2008; Wiley 175) and information from relevant literature. The internal standard 1,2-dichlorobenzene was used to semi-quantify volatile compounds. All analyses were conducted in duplicate.

2.11. PDSC analysis

A pressure differential scanning calorimetry (PDSC) study was conducted using a DSC Q20 TA Instrument (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Samples of oil (3 mg) in aluminum pans were placed in the cell under an oxygen atmosphere (50 mL/min flow rate) with an initial pressure of 1400 kPa. The measurements were carried out in isothermal conditions of 120 °C. For each sample, the output was automatically recalculated and presented as the amount of energy per 1 g. The induction time of the samples was determined based on the onset time of the oxidation reaction (T_{on}) and the maximum rate of oxidation (T_{max}). The maximum PDSC oxidation time was determined based on the maximum rate of oxidation (maximum rate of heat flow) as a peak's point of maximum deviation from a linear. Diagrams were registered and analyzed using TA Universal Analysis 2000 software (Piasecka et al., 2021).

2.12. Plant-based camembert analogs

A base mass of the plant analog was prepared consisting of blended cashews and water in a 1:1 ratio, which was then subjected to a

microwave sterilization process in flasks in a volume of up to 100g of the mass. After the sterilization process, boiled water was again added to the paste in an amount equal to half of the portion added in the first stage, obtaining a moisture content of c.a. 40%–45%. Once the mass had cooled, starter cultures of lactic fermentation bacteria and mold were added. Commercial mold starter culture of *Geotrichum camemberti* (Cashewbert, Berlin, Germany) was prepared in 200 mL of culture medium with composition: NH_4NO_3 , 1 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L; K_2HPO_4 , 4 g/L; KH_2PO_4 , 2 g/L; NaCl, 1 g/L; glucose, 10 g/L; yeast extract, 1 g/L; 57 mL/L 10% citric acid solution. The culture was carried out for 72 h. The mold mycelium was drained from the medium, washed with sterile saline, and added to the base mass of the cheese analog. The starter culture of bacteria consisted of *Lactococcus lactis* KKP 3020 and *Streptococcus salivarius* KKP 3251 species multiplied in a 24-h culture in 100 mL of MRS liquid medium at 35 °C. Strains were obtained from the Collection of Industrial Microorganisms Cultures belonging to the Institute of Agricultural and Food Biotechnology (IAFB, Warsaw, Poland). Each strain was cultured separately. The bacterial biomass was washed with saline and suspended in 10 mL of sterile saline. To enrich the cashew pulp with microbial oil, the following shall be added to the pulp: 1 g of inactivated freeze-dried *Y. lipolytica* yeast biomass (yeast biomass enriched analog variant) or 1 g of microbial oil (yeast cell extracted oil enriched analog variant). The mass was transferred in an amount of $150\text{g} \pm 10\text{g}$ into sterile plastic round containers, in which baking paper was placed and left for 5 h at room temperature. This was followed by a ripening period of 14 days at 12 °C. The analogs were turned over on their sides and the paper was replaced once a day for the first two days and then every 3 days. On the fourth day, the analog was salted on both sides, spreading 0.5 g NaCl on each side.

For the determination of dry matter, samples of cheese analogs from each variant and the two different experimental periods were weighed 20 g to the falcon in duplicate and dried for 48 h at 80 °C until constant weight. The titratable acidity determination was performed using a TitraLab AT1000 Series HACH titrator (Wrocław, Poland), which is used for automatic potentiometric titration. The titrant was 0.1M NaOH and the instrument was equipped with a pH electrode. Before the

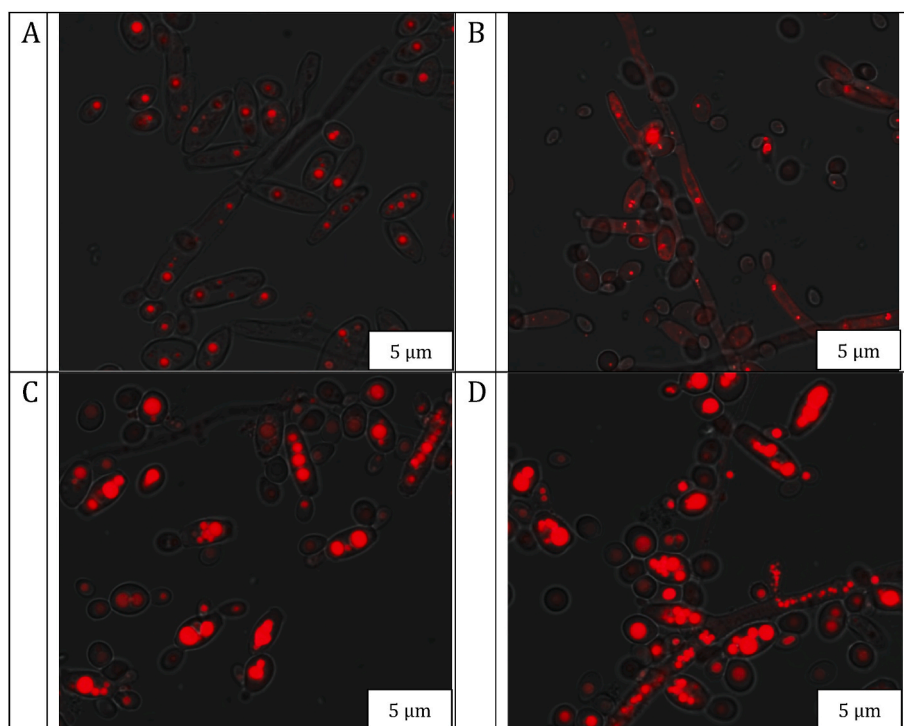


Fig. 2. Scanning laser confocal microscopy of Nile red-stained cellular lipids from cultures with glucose (A), molasses (B), cold-pressed rapeseed oil (C), post-frying rapeseed oil (D). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

measurement, 1 g of the sample was dissolved with 50 mL distilled water. Results were calculated as grams of lactic acid. Total protein content was determined by Kjeldahl's method after 0.5 g sample mineralization. To convert the amount of 0.1 M HCl titrant, a conversion factor for nuts equal to 5.3 was used. Lipids were extracted from dry camembert analogs using a Soxhlet apparatus and *n*-hexane was used as a solvent.

Mono- and disaccharide content was measured with the method with DNS. It takes advantage of the reducing properties of sugars, which reduce the nitro group of the sodium salt of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) at position 3 to an amino group in an alkaline medium. The resulting DNS derivatives are orange in color, which strongly absorb light at wavelengths in the range of 540 nm. The cheese analog (1 g) was diluted to 100 mL with distilled water. Acid hydrolysis was carried out using 6.25 mL of 36% hydrochloric acid at 70 °C for 15 min for the determination of total mono- and disaccharide content. Monosaccharide-reducing sugar content was measured for non-hydrolyzed samples. All samples were deproteinized using Carrez solutions before simple sugar determination.

Total microbial counts were determined on nutrient agar according to EN ISO 4833-1:2013-12 for 72 h at 30 °C. Lactic acid bacteria were cultured in MRS Agar (GRASO Biotech, Poland) for 48 h at 35 °C. Molds were cultured at room temperature for 96 h at 25 °C on DRBC Agar with Bengal rose (GRASO Biotech, Poland). Each cheese analog variant was analyzed in duplicate after 7 and 14 days of ripening.

The fiber content was determined in the Fibertec^{MC} 8000 system (Foss Analytics, Warsaw, Poland). The percentage of crude fiber was determined by the method PN-ISO 5498 (1996).

2.13. Statistical analyses

Statistical analysis of the results was performed using Statistica 13.3 (Statsoft, Poland). Standard deviation and arithmetic mean were calculated. Normal distribution was checked using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance was analyzed with Levene's test. One-factor and two-factor analysis of variance was performed, and a detailed comparison of means was made using Tukey's post-hoc test. The confidence in the results obtained is 95%.

3. Results and discussion

The use of inexpensive substrates, especially carbon sources, in the culture of oleaginous microorganisms is a solution that combines both environmental and economic benefits. To become acceptable for commercial SCO production, waste substrates must support satisfactory biomass growth and efficient lipid accumulation without compromising the quality characteristics of the microbial product. Therefore, the first stage of the study compared the effects of different substrate types on the growth of *Y. lipolytica* KKP 379 and the efficiency of lipid accumulation through two pathways: de novo by fermenting hydrophilic substrates, and ex novo by metabolizing hydrophobic substrates. Molasses has been used as a low-cost substitute for glucose, while cold-pressed rapeseed oil and waste rapeseed oil from frying have been utilized as hydrophobic carbon sources.

The production of a wide range of metabolites and the ability to change cell morphology in response to environmental conditions are hallmarks of the unconventional yeast *Y. lipolytica*. This species grows as a combination of two morphotypes: pseudo-filamentous and yeast-like cells, both of which are reversible (Barth & Gaillardin, 1997; Braga et al., 2016). In the current study, a higher proportion of elongated cells and filaments was observed in media with hydrophilic carbon sources (Fig. 2A and B), particularly in media with waste molasses, for which hydrolysis was used as a pretreatment. A characteristic feature of yeast from cultures with molasses was the accumulation of lipid substances at the margins of the filamentous cells (Fig. 2B). Much less characteristic lipid bodies were observed as round droplets inside the cells. Unlike cells

Table 1
Parameters of *Y. lipolytica* KKP 379 cultures.

carbon source	T (h)	S (g/L)	X _g (g/L)	L _g (g/L)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{L/S} (g/g)
glucose	62	100	17.44 ± 0.91 ^d	1.48 ± 0.08 ^b	0.0850	0.0148
molasses	62	50	6.50 ± 0.40 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.0361	0.0047
cold-pressed rapeseed oil	62	50	14.51 ± 0.10 ^c	3.69 ± 0.03 ^d	0.2541	0.0737
rapeseed oil post-frying	62	50	9.96 ± 0.09 ^b	3.27 ± 0.03 ^c	0.3456	0.0619

Time (T), initial source of carbon concentration (S), maximum biomass concentration (X), concentration of cellular lipids (L_{max}), cellular lipid yield per carbon source (Y_{L/S}), storage lipids yield per biomass (Y_{L/X}).

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments (p < 0.05).

from media containing hydrophobic substrates, microbial lipids were stored in a more concentrated form as round lipid bodies. This phenomenon was particularly noticeable in biomass from cultures with post-frying oil (Fig. 2D), where the proportion of cellular lipids was the highest. Morphological analysis by Pomraning et al. (2015) showed that hydrophobic substrates promoted the growth of *Yarrowia* yeast in the form of single cells, while hydrophilic substrates, including glucose, caused a transition to a filamentous morphotype. Among the factors influencing the dimorphic transition of the species are the sources of carbon and nitrogen (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002; Szabo & Štofanková, 2002), the pH of the medium, and the concentration of dissolved oxygen. Neutralization of molasses hydrolysate caused an increase in the initial pH (data not shown), which could induce the formation of filaments. This is confirmed by observations from other authors, who have correlated the maximum formation of filaments with a pH close to neutral or conditions of low aeration of the medium (Bellou et al., 2014; Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002).

Y. lipolytica has many applications in waste management due to its wide range of favorable physiological characteristics, which allow it to adapt to unusual growth conditions and efficiently utilize waste carbon sources. For example, a 90-h culture of the species in a 4-liter bioreactor facilitated the disposal of nearly a liter of post-frying rapeseed oil, while a 62-h molasses-fed culture in a bioreactor of the same volume consumed about 570 g of sugars (Wierchowska et al., 2022). Pomraning et al. (2015), using microscopy techniques, noted a possible correlation between the amount of carbon source in culture and the thickness of *Yarrowia* cell walls. The cell walls were thicker at later stages of culture when the carbon source was depleted. This relationship has been explained by the incorporation of carbon atoms into cellular polymers. On the one hand, these observations could help optimize the biosynthesis processes of carbon-based products, including single-cell oils. The literature repeatedly emphasizes the need for an excess supply of carbon sources in the culture of oleaginous microorganisms (Ratledge & Cohen, 2008; Wierchowska, Zieniuk, Nowak, & Fabiszewska, 2021). On the other hand, the mechanism of increasing cell wall thickness can undoubtedly be a bottleneck for the efficient extraction of SCO accumulated in biomass. As is well known, the process of SCO biosynthesis is most efficient during the late exponential and early stationary growth phases (Carsanba et al., 2020; Papanikolaou & Aggelis, 2011). Currently, research is being conducted to improve the efficiency of SCO extraction, including unconventional methods such as pulsed electric fields, ultrasound, or high-pressure homogenization (Fabiszewska et al., 2023; Wierchowska et al., 2022).

In the medium with glucose, a conventional carbon source, the best strain growth (17.44 g/L) was observed, but cellular lipid content in dry cell weight (DCW) was low (8.5%) (Table 1). The use of molasses did not yield similar final parameters for yeast culture; after 62 h, the biomass concentration was 6.50 g/L, and the efficiency of lipid accumulation was

Table 2
Fatty acid profile (%) of cellular lipids of *Y. lipolytica* KKP 379 cultured in media with different carbon sources.

Fatty acid symbol	carbon sources			
	glucose	molasses	cold-pressed rapeseed oil	post-frying rapeseed oil
C16:0	20.84 ± 1.51 ^c	13.43 ± 0.71 ^b	5.71 ± 1.43 ^a	4.45 ± 0.72 ^a
C16:1	3.83 ± 0.57 ^a	2.73 ± 0.89 ^a	0.78 ± 0.48 ^a	4.41 ± 0.82 ^a
C18:0	8.62 ± 1.47 ^c	4.68 ± 0.45 ^b	1.48 ± 0.12 ^a	0.74 ± 0.54 ^a
C18:1	51.71 ± 1.73 ^a	54.09 ± 1.77 ^{ab}	62.16 ± 2.04 ^{bc}	65.14 ± 0.68 ^c
C18:2	13.14 ± 0.61 ^a	19.68 ± 0.64 ^b	21.07 ± 0.21 ^b	18.04 ± 0.83 ^b
C18:3	1.86 ± 0.51 ^a	5.41 ± 0.86 ^{ab}	8.24 ± 0.58 ^b	5.75 ± 0.67 ^b
C20:0	n.d	n.d.	0.17 ± 0.03 ^a	0.44 ± 0.09 ^a
C20:1	n.d	n.d.	0.44 ± 0.09 ^a	1.03 ± 0.07 ^b
SFA	29.46 ± 0.04 ^c	18.11 ± 1.17 ^b	7.36 ± 1.27 ^a	5.63 ± 0.09 ^a
UFA	70.54 ± 0.04 ^a	81.89 ± 1.17 ^b	92.25 ± 1.19 ^c	93.34 ± 0.02 ^c
MUFA	55.54 ± 1.16 ^a	56.82 ± 2.66 ^a	63.33 ± 1.65 ^{ab}	70.58 ± 0.06 ^b
PUFA	15.00 ± 1.12 ^a	25.08 ± 1.49 ^{bc}	29.31 ± 0.37 ^{bc}	23.79 ± 0.16 ^b

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments (p < 0.05).

Table 3
Content of the major sterols in cellular lipids of *Y. lipolytica* KKP 379 cultured in media with molasses, cold-pressed rapeseed oil, and post-frying rapeseed oil.

	carbon sources					
	molasses		cold-pressed rapeseed oil		post-frying rapeseed oil	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
cholesterol	0.38 ± 0.05 ^b	5.34 ± 0.27 ^{ab}	0.23 ± 0.07 ^a	3.66 ± 1.24 ^a	0.28 ± 0.02 ^{ab}	6.59 ± 1.06 ^b
dehydroergosterol	0.75 ± 0.33 ^a	11.42 ± 6.82 ^a	0.71 ± 0.49 ^a	8.03 ± 6.82 ^a	0.27 ± 0.04 ^a	6.26 ± 0.38 ^a
ergosterol	3.90 ± 0.63 ^b	54.80 ± 1.67 ^c	1.19 ± 0.28 ^a	16.74 ± 4.30 ^a	1.24 ± 0.11 ^a	29.30 ± 1.50 ^b
campesterol	0.71 ± 0.22 ^a	9.81 ± 1.93 ^a	1.43 ± 0.33 ^b	19.16 ± 3.90 ^b	0.87 ± 0.13 ^{ab}	20.60 ± 1.41 ^b
stigmasterol	0.18 ± 0.06 ^a	2.44 ± 0.54 ^a	1.10 ± 0.43 ^b	18.68 ± 6.63 ^a	0.29 ± 0.08 ^a	6.88 ± 2.20 ^a
β-sitosterol	1.19 ± 0.46 ^a	16.19 ± 4.97 ^a	2.49 ± 0.29 ^b	37.28 ± 2.03 ^b	1.29 ± 0.14 ^a	30.37 ± 2.76 ^b
Σ	7.10 ± 1.05 ^b	–	7.16 ± 0.80 ^b	–	4.22 ± 0.36 ^a	–
phytosterols	2.08 ± 0.73 ^a	28.44 ± 2.44 ^a	5.02 ± 0.43 ^b	73.78 ± 4.46 ^b	2.45 ± 0.22 ^a	57.85 ± 1.59 ^b
mycosterols	4.65 ± 0.44 ^b	66.22 ± 2.20 ^b	1.90 ± 0.66 ^a	27.58 ± 9.10 ^a	1.50 ± 0.12 ^a	35.56 ± 1.33 ^a
zoosterols	0.38 ± 0.05 ^b	5.34 ± 0.27 ^{ab}	0.23 ± 0.07 ^a	3.66 ± 1.24 ^a	0.28 ± 0.02 ^{ab}	6.59 ± 1.06 ^b

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments (p < 0.05).

only 3.61%. The medium with 5% cold-pressed rapeseed oil proved to be effective for *Yarrowia* growth, with a biomass concentration reaching 14.51 g/L. In comparison, waste post-frying oil did not support as efficient biomass growth, achieving only 9.96 g/L. It is worth noting that cultures with hydrophobic carbon sources resulted in the most efficient biosynthesis of microbial lipids. The lipid content in DCW was 25.41% for the cold-pressed oil medium and 35.56% for the post-frying oil medium, respectively. Considering practical applications, it is most reasonable to use SCOs obtained by culturing *Y. lipolytica* yeast in media containing hydrophobic carbon sources, where lipid contents of 3.69 g/L and 3.27 g/L were obtained from cold-pressed oil and post-frying oil media, respectively.

Comparing the available literature reports, it can be concluded that batch cultures of oleaginous yeast in media with hydrophobic substrates, including waste cooking oils, achieve higher process efficiencies than cultures in media based on sugars. Wild-type *Y. lipolytica* strains W29 and CBS 6303 fed glucose accumulated cellular lipids at 3%–35% of dry biomass, with lipid content ranging between 0.15 and 1.27 g/L, similar to results obtained for glucose and molasses in the current study. Mutants were able to accumulate lipids up to 61%, but the SCO yield remained at 0.36–1.28 g/L (Carsanba et al., 2020).

Several experiments using waste cooking oil as a substrate provide evidence supporting its use as a low-cost carbon source (Lopes, Miranda, & Belo, 2020; Gao et al., 2022; Wierzchowska et al., 2022; 2023). Raut et al. (2022) achieved lipid accumulation efficiencies of 25%–35% and lipid yields of 1.46–2.49 g/L when culturing *Y. lipolytica* strain NCIM 3589 in a medium with various waste cooking oils. By employing chemical mutagenesis, the authors developed mutants in which SCO accounted for 35%–67% of the cells, and 1.57–5.97 g of SCO could be obtained per liter of medium, depending on the strain and experimental parameters used (Raut et al., 2022). In addition to genetic engineering techniques, an effective strategy for improving microbial lipid production efficiency is to limit selected substrate components, particularly nitrogen and phosphorus. Higher SCO accumulation efficiency in *Y. lipolytica* cells was correlated with lower doses of phosphorus sources in the medium. In a mineral medium with 3.0 g/L KH₂PO₄ and 3.0 g/L (NH₄)₂SO₄, the cell lipid yield was 47.5% (m/m) (Wierzchowska et al., 2022).

Assuming that we consider using sugars as substrates for oleaginous yeast cultivation, one effective strategy to enhance the accumulation efficiency of cellular lipids and obtain larger quantities of SCO is the application of the fed-batch cultivation mode. In a previous experiment, the fed-batch mode and feeding *Yarrowia* with molasses as a carbon source led to an increase in SCO concentration from 0.51 g/L to 4.01 g/L after 48 h of fermentation. The fed-batch mode also resulted in maintaining the concentration of cellular lipids above 2 g/L for nearly 30 h of cultivation with the wild strain KKP 379 and post-frying oil (Wierzchowska et al., 2022).

Analyzing the changes in fatty acid composition depending on the carbon sources used in culture (Table 2), it can be observed that the lipids of microorganisms from the glucose medium had the highest proportion of saturated fatty acids (SFA) such as palmitic (C16:0–20.84%) and stearic (C18:0–8.62%), and the lowest proportion of unsaturated fatty acids (UFA), particularly linoleic (C18:2–13.14%) and linolenic (C18:3–1.86%) acids. Notably, the cellular lipids of yeast cultured with hydrophobic carbon sources contained significantly less SFA, C16:0 (4.45%–5.71%), and C18:0 (0.74%–1.48%). The main characteristic of SCOs accumulated by the ex novo route is a high percentage of UFA. Cellular lipids from cultures with post-frying oil contained the highest proportion of oleic acid (C18:1–65.14%). Interestingly, when it came to polyunsaturated fatty acids (PUFA), no significant differences were observed between SCOs from molasses medium and cultures with cold-pressed or post-frying oil. Fatty acid profiles underscore the potential nutritional value of these three types of SCOs, especially lipids from cultures in waste substrates.

When the results of the fatty acids composition from this study are

Table 4Contents of PAHs (µg/kg) in cellular lipids of *Y. lipolytica* KKP 379 cultured in media with molasses, cold-pressed rapeseed oil, and post-frying rapeseed oil.

PAHs (µg/kg)		carbon sources		
		molasses	cold-pressed rapeseed oil	post-frying rapeseed oil
Naf	Naphtalene	81.98 ± 1.98 ^c	9.13 ± 1.08 ^a	20.62 ± 2.38 ^b
Acy	Acenaphthylene	8.24 ± 0.64 ^b	0.68 ± 0.07 ^a	1.47 ± 0.16 ^a
Ace	Acenaphthene	12.59 ± 1.04 ^b	1.80 ± 0.17 ^a	3.49 ± 0.43 ^a
Fluo	Fluorene	32.02 ± 2.02 ^b	3.14 ± 0.34 ^a	4.56 ± 0.21 ^a
Phe	Phenanthrene	34.68 ± 2.68 ^b	7.54 ± 0.51 ^a	12.04 ± 1.30 ^a
Ant	Anthracene	2.07 ± 0.07 ^b	0.64 ± 0.09 ^a	0.60 ± 0.04 ^a
Car	Carbazole	1.86 ± 0.06 ^b	0.17 ± 0.02 ^a	1.31 ± 0.18 ^b
Flua	Fluoranthene	7.47 ± 0.37 ^c	1.55 ± 0.17 ^a	3.13 ± 0.11 ^b
Pyr	Pyrene	29.94 ± 1.44 ^c	3.30 ± 0.31 ^a	7.98 ± 0.44 ^b
B[a]A	Benzo[a]anthracene	1.71 ± 0.11 ^b	0.52 ± 0.05 ^a	1.28 ± 0.09 ^b
Chry	Chrysenes	5.26 ± 0.46 ^b	0.84 ± 0.06 ^a	1.77 ± 0.24 ^a
B[b]F	Benzo[b]fluoranthene	0.99 ± 0.09 ^b	0.30 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.04 ^a
B[k]F	Benzo[k]fluoranthene	2.62 ± 0.12 ^b	0.69 ± 0.09 ^a	1.16 ± 0.14 ^a
B[j]F	Benzo[j]fluoranthene	1.55 ± 0.05 ^b	0.46 ± 0.05 ^a	0.94 ± 0.08 ^c
B[a]P	Benzo[a]pyrene	0.92 ± 0.12 ^b	0.38 ± 0.06 ^a	0.61 ± 0.06 ^{ab}
IndP	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.63 ± 0.14 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.04 ^a
Db[ah]A	Dibenz[a,h]anthracene	0.52 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.05 ^b
Db[ghi]P	Benzo[ghi]pyrene	1.53 ± 0.33 ^a	0.93 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.05 ^a
Σ		226.60 ± 11.74 ^b	32.48 ± 3.19 ^a	63.07 ± 6.02 ^a

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments (p < 0.05).

compared to those from the literature (Papanikolaou et al., 2009; Car-sanba et al., 2020; Wierzychowska et al., 2022; 2023), it can be assumed that FAs with the highest proportion in cellular lipids of *Y. lipolytica* were oleic, linoleic, palmitic and stearic acids. Moreover, the concentration of palmitic acid in cellular lipids derived from sugar-based media was higher than in cultures with vegetable oils. In the work done by Car-sanba et al. (2020), when *Y. lipolytica* strain W29 was cultured in a medium with 30 g/L glucose, the concentration of C16:0 was in the range of about 23.1%–25.2%. In a study with two levels of glucose addition, 30 g/L and 60 g/L, no significant differences were observed in the concentration range of this acid (14.3%–20.1%), depending on the level of substrate addition (Papanikolaou et al., 2009). In contrast, when *Yarrowia* was cultured with post-frying oil, the 16:0 acid content was much lower, 3.01%–5.20% (Wierzychowska et al., 2022). The presence of C18:3 linolenic acid is a distinctive characteristic of SCO from cultures with vegetable oils. Depending on the culture parameters of strain KKP 379, the proportion of 18:3 ranged from 1.76% to 8.89%. Once again, our study showed that the proportion of very long-chain fatty acids (VLCFA) with 20 or more carbon atoms was not recorded in SCO from cultures with sugars. Microbial oils from the culture-fed rapeseed oil after fish frying were more diverse in terms of fatty acid composition. This is in contrast to cellular lipid samples from strain cultures in molasses medium, in which arachidonic acid (C20:0) and behenic acid (C22:0) were not detected. The proportion of VLCFAs in the cellular lipids of strain KKP 379 was 0.61% and 1.47% for the medium with cold-pressed oil and post-frying waste. VLCFAs are usually found in small amounts in SCO of wild-type strains. When in another study, 20% of the water in the medium was replaced with whey, and cod fillet frying oil was used as a carbon source, the content of VLCFAs was close to 10%, and C20:0 acid dominated (Wierzychowska et al., 2023).

Regarding the efficiency of SCO biosynthesis for various culture variants and their fatty acid profiles, cellular lipids from the media with cold-pressed oil and post-frying oil were selected for further analysis. To conduct a broader characterization of SCO obtained from cultures with waste substrates, sterol and polycyclic aromatic hydrocarbon analyses were also performed on SCO from cultivation with waste molasses (Table 3). The lowest amount of sterols was found in SCO from cultivation with post-frying rapeseed oil, at 4.22 mg/g of oil. For cultures with molasses and cold-pressed oil, the sterol content was similar, at 7.10 and 7.16 mg/g, respectively. In the yeast cellular lipids cultivated with cold-pressed and waste rapeseed oil, phytosterols predominated, including β-sitosterol and campesterol. In contrast, the use of molasses

as a substrate favored the biosynthesis of ergosterol, which was the dominant sterol in the obtained SCO, with mycosterols accounting for 66.22% of the total sterols.

It can be said that the total content of phytosterols in refined and cold-pressed rapeseed oil ranges from approximately 6.24 to 8.14 mg/g and 7.741–8.36 mg/g of oil, respectively (Ghazani et al., 2014; Kmiecik et al., 2020). This allows us to conclude that the results obtained for all three samples of SCOs correspond to values characteristic of vegetable oils. The exception is the microbial oil from the post-frying waste culture, where the reduced total sterol content is likely related to the low concentration of this compound in the starting substrate. Kmiecik et al. (2020) observed that heating refined rapeseed oil for 48 h at 170 °C decreased the sterol content to nearly 4 mg/g of fat.

In the present study, *Y. lipolytica* yeast did not synthesize significant amounts of ergosterol compared to our previous experiments. Microbial oil from batch cultures with molasses hydrolysate contained as much as 60.16 mg/g of ergosterol (Wierzychowska et al., 2022). The content of specific sterols, as well as fatty acids in cellular lipids, can change during yeast culture as the cells adapt to environmental conditions. Analyzing changes in the sterol profile of microbial lipids during culture, the highest amount of total sterols (21.08 mg/g) was observed after 38 h, which was associated with the peak synthesis of ergosterol at this time (12.10 mg/g). In the following hours, the ergosterol content decreased significantly (Wierzychowska et al., 2023). Undoubtedly, the diverse sterol profile of *Y. lipolytica* microbial oils combines the nutritional advantages of phytosterols and mycosterols. Phytosterols play an essential role in scavenging free radicals, thereby contributing to the prevention of cancer and cardiovascular diseases (Nattagh-Eshtivani et al., 2022; Sujith Kumar et al., 2017). Ergosterol is considered a pro-vitamin D2 and is widely studied due to its potential positive effects on the human body. The theory suggests that the health benefits of ergosterol are based on its conversion to vitamin D2, which plays a crucial role in the functioning of the skeletal, cardiovascular, and immune systems. More recently, it has also been suggested that ergosterol has antiviral and immunoreactive effects, as it is involved in triggering programmed cell death in host cells (Rodrigues, 2018; Tiwari et al., 2022).

Due to the similarity in fatty acid composition between microbial lipids and plant oils, SCOs are still considered suitable substitutes for conventional fats. Analysis of PAH content (Table 4) showed that the SCOs obtained by culturing *Y. lipolytica* met the requirements for oils and fats marketed to final consumers or used as food ingredients regarding maximum levels of process contaminants such as benzo(a)

Table 5

Evaluation of the quality of SCOs from a culture with molasses, cold-pressed rapeseed oil, or post-frying rapeseed oil concerning the European Union criteria for oils and fats placed on the market, n. a. – not analyzed.

	Maximum level/residue limits	carbon sources			
		molasses	cold-pressed rapeseed oil	post-frying rapeseed oil	
B[a]P	2.0 µg/kg	0.92 µg/kg	0.38 µg/kg	0.61 µg/kg	(A)
B[a]P + Chry + B[b]F + B[a]A	10.0 µg/kg	8.95 µg/kg	2.04 µg/kg	4.12 µg/kg	(A)
Hexane	1.0 mg/kg	n. a.	0.00139 mg/kg	0.0007 mg/kg	(B)

(A) COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 of April 25, 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006

(B) DIRECTIVE 2009/32/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of April 23, 2009 on the approximation of the laws of the Member States on the extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients.

pyrene and the sum of benzo(a)pyrene (B[a]P), benz(a)anthracene (B[a]A), benzo(b)fluoranthene (B[k]F), and chrysene (Chry), as specified in Regulation (EU) 2023/915 (European Commission Regulation (EU) 2023/915 of April 25, 2023). The maximum level of B[a]A set by the regulation is 2 µg/kg. The content of B[a]A in the analyzed SCOs ranged from 0.52 to 1.71 µg/kg, with SCO from cold-pressed oil cultures containing the least amount of this compound (Table 4). Similarly, the guidelines for the content of the four PAHs—B[a]P, Chry, B[b]F, and B[a]A—indicated by Regulation No. 2023/915, which should not exceed 10 µg/kg of oil, were also met. The sum of the four PAHs for SCOs from cultures in molasses medium was 8.95 µg/kg, while for cultures with hydrophobic sources, the content of the compounds was lower, at 2.04 µg/kg and 4.12 µg/kg for SCOs obtained from yeast fed with cold-pressed oil and frying oil, respectively. The highest total PAH content was recorded in cell oil from cultures with molasses, at 226.60 µg/kg.

Finally, considering SCOs as an ingredient in the formulation of a plant-based Camembert analog and based on previous results, SCOs from cultures with cold-pressed oil and post-frying oil were selected for the next stage of the experiment. The content of hexane as an extraction solvent was 0.00139 mg/kg and 0.0007 mg/kg, respectively (Table 5). According to European Union regulations, the permissible content of hexane in fats and oils should not exceed 1 mg/kg (Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of April 23, 2009).

Oxidative stability is one of the most important quality assessment parameters for oils and fats. Oxidation under the influence of heat treatment, extraction conditions, or during storage reduces the quality

and nutritional value of a food product. In the study, PDSC measurements for microbial oils (Fig. 3) and lipids extracted from plant-based cheese analogs (Fig. 5) were carried out at 120 °C under isothermal conditions. PDSC measures the time it takes to initiate the oxidation of a sample (observed as the rapid release of energy as heat flow deviates from the baseline), expressed as T_{on} , and the maximum oxidation time at which the oxidation process proceeds most rapidly, expressed as T_{max} . Both parameters correspond with different stages of oxidation. Higher values T_{max} times are correlated with higher oxidative stability of the analyzed oils.

For SCO extracted from biomass cultured with cold-pressed rapeseed oil, the maximum oxidation time (T_{max}) was 49.95 min. The PDSC method was previously used to measure the oxidative stability of oils and fats. Based on the available literature, the maximum oxidation reaction time for sunflower oil at 120 °C was 33.4 min (Kowalski et al., 2004), and for linseed oil, a range of 21.20–24.72 min was estimated (Symoniuk et al., 2016). The results of a study by Ciemnińska-Żytkiewicz et al. (2014) for rapeseed oil (82.41–98.4 min), olive oil (134.15–134.47 min), and hazelnut oil (191.06–119.95 min) under the same conditions of analysis were higher, but still lower than the value of maximum oxidation time for SCO from the culture with post-frying oil, for which the highest T_{max} (204.94 min) and also the highest oxidative stability have been observed. It should also be mentioned that the oxidative stability of SCOs was analyzed in our previous study for cultures grown with molasses and post-frying oil and the values of maximum oxidation time were much lower (10.04–23.36 min). The rate of oxidation is determined by several factors, including fatty acid

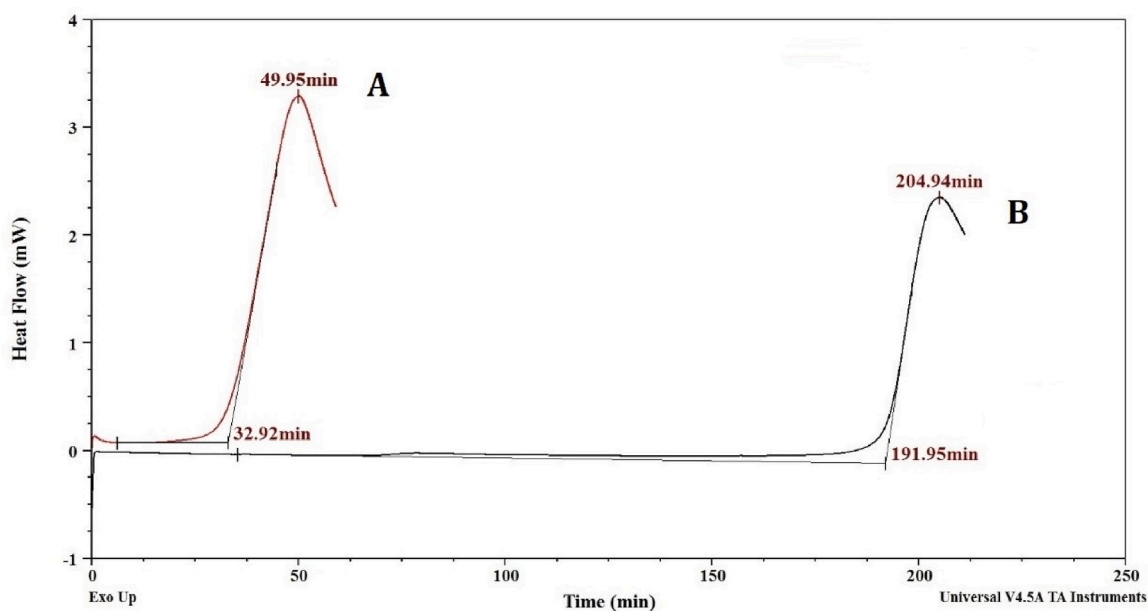


Fig. 3. PDSC curves showing oxidation induction times T_{on} and T_{max} of SCOs from cultures with cold-pressed rapeseed oil (A) and post-frying rapeseed oil (B).

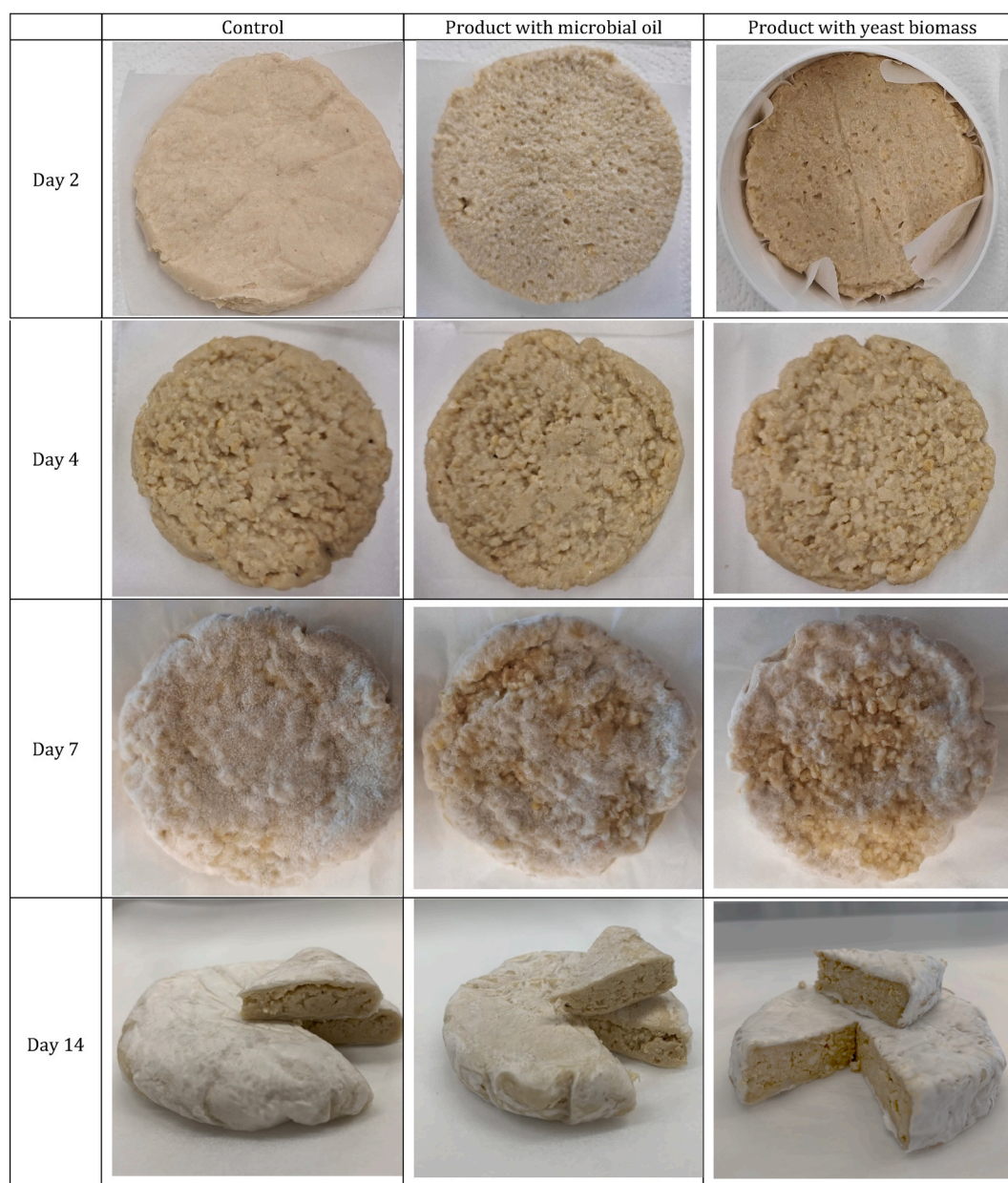


Fig. 4. Photographs of plant-based analogs of Camembert cheese prepared from cashews with and without microbial oil or yeast biomass after 2, 4, 7, and 14 days of ripening.

composition, the presence of prooxidants, antioxidants, or access to light and oxygen during storage. In the following experiment, both oils had similar unsaturated fatty acid contents, but the oil from the cold-pressed oil culture contained twice as many sterols. There is a need to identify the compounds that determine the oxidative stability of SCOs.

Based on the previous stages of the experiment, it was decided to choose SCO from the waste culture as a potential additive to the plant-based analog of camembert cheese. Plant-based analogs of Camembert cheese were prepared in 3 variants: with oleaginous biomass, microbial oil, and without yeast additives (control). The addition of microbial oil or biomass affects neither the appearance of plant analogs (Fig. 4) nor the development of microflora in the starter culture (Table 6). After 14 days of ripening, lactic acid bacteria and molds were 8.71–8.85 and 6.71–6.85 CFU/mL, respectively. Turning to the description of other parameters, it was found that after 14 days of ripening, the content of protein (11.13 g/100g), fiber (4.56 g/100g), and the dry mass of the product (39.18 g/100g) were the highest in analog with yeast biomass

addition. It should be noted that the SCO-enriched analog had the highest fat content in the formulation (14.36 g/100g). However, the content of carbohydrates (1.11–1.40 g/100g) was at similar levels in all products.

This section describes the first analog of Camembert cheese, and the results are compared with the dairy original. According to product characteristics, mold-ripened Camembert cheese should contain, on average per 100 g of product: 20 g of protein, 24 g of fat, and 52 g of dry matter. This product is characterized by the absence of fiber, a cholesterol content of 0.72 mg/g, and a high content of saturated fatty acids. The fat in Camembert cheese consists of 66.4% saturated fatty acids, 30.4% monounsaturated fatty acids, and 3.2% polyunsaturated fatty acids (U.S. Department of Agriculture's FoodData Central database). From a nutritional perspective and consumer expectations, it would be beneficial for a product to have low cholesterol content and a predominance of unsaturated fatty acids, including a high content of polyunsaturated fatty acids.

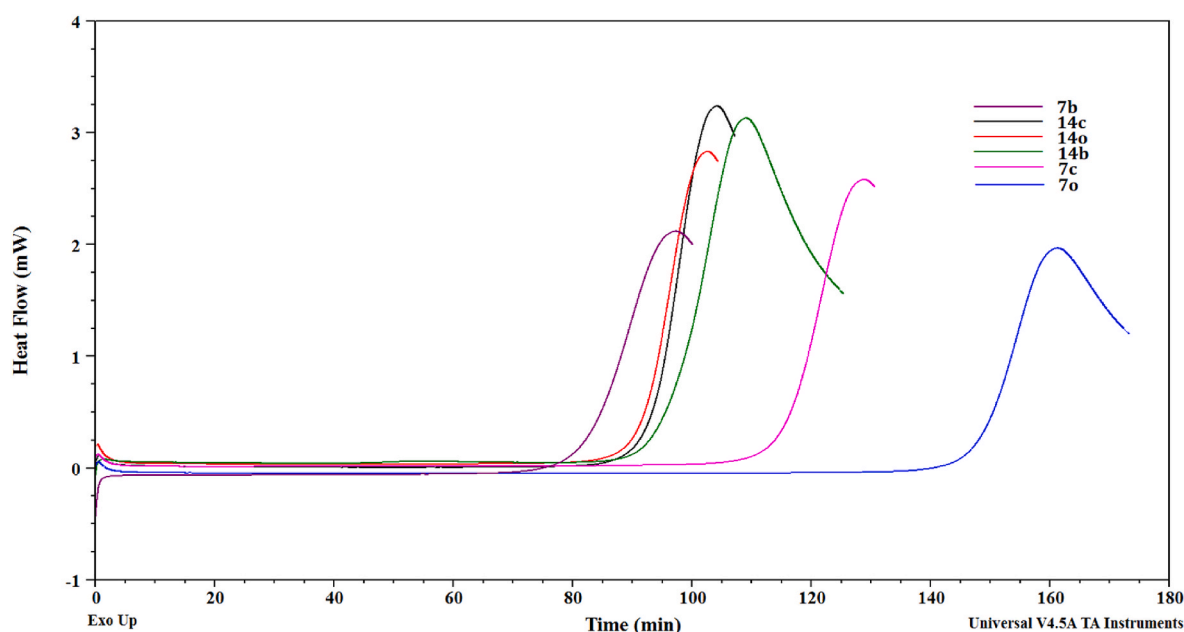


Fig. 5. PDSC thermogram of oil extracted from cashew plant analogous of camembert cheese: control, with microbial oil and with oleaginous yeast biomass after 7 days (7c, 7o, 7b) and 14 days (14c, 14o, 14b) of ripening.

Table 6

Characterization of selected physicochemical and microbiological parameters of plant-based analogs of Camembert cheese prepared from cashews with and without the addition of microbial oil after 7 and 14 days of ripening. n. a. – not analyzed.

Days of ripening	Plant analogs from cashews					
	control		with microbial oil		with oleaginous yeast biomass	
	7	14	7	14	7	14
Physicochemical characteristics [g/100g]						
Dry mass	n. a.	35.89 ± 0.51 ^a	n. a.	34.90 ± 0.49 ^a	n. a.	39.18 ± 0.44 ^b
Lipid content	14.71 ± 0.56	14.00 ± 1.07 ^a	14.71 ± 0.99	14.36 ± 0.49 ^b	11.13 ± 0.56	13.28 ± 0.39 ^a
Mono- and disaccharides	n. a.	1.40 ± 0.00 ^b	n. a.	1.36 ± 0.00 ^b	n. a.	1.11 ± 0.00 ^a
Monosaccharides reducing sugars	n. a.	0.54 ± 0.00 ^c	n. a.	0.39 ± 0.00 ^a	n. a.	0.43 ± 0.00 ^b
Crude fiber	n. a.	1.50 ± 0.40 ^a	n. a.	1.50 ± 0.41 ^a	n. a.	1.79 ± 0.37 ^{ab}
Protein content	9.33 ± 0.36	10.05 ± 0.31 ^a	9.33 ± 0.29	10.05 ± 0.36 ^a	10.77 ± 0.31	11.13 ± 0.36 ^b
Lactic acid content	0.81 ± 0.07	0.46 ± 0.08 ^a	0.46 ± 0.07	0.46 ± 0.01 ^a	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.09 ^b
Microbiological characteristics [CFU/mL]						
A general number of bacteria	n. a.	8.68 ± 0.1	n. a.	8.70 ± 0.1	n. a.	8.87 ± 0.1
A number of molds	n. a.	6.71 ± 0.1	n. a.	6.85 ± 0.2	n. a.	6.85 ± 0.1
Number of lactic acid bacteria	n. a.	8.76 ± 0.1	n. a.	8.71 ± 0.1	n. a.	8.85 ± 0.1

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Table 7

Fatty acid profile (%) of lipids in plant analogs of Camembert cheese prepared from cashews with and without the addition of microbial oil after 7 and 14 days of ripening. Statistical analyses reflect only results after 14 days of ripening.

Fatty acid symbol	Plant analogs from cashews					
	control		with microbial oil		with oleaginous yeast biomass	
	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days
C16:0	9.43 ± 0.01	9.85 ± 0.75 ^a	9.43 ± 0.05	9.21 ± 0.44 ^a	11.65 ± 0.01	10.25 ± 0.01 ^a
C16:1	0.35 ± 0.0	0.37 ± 0.04 ^a	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.02	0.38 ± 0.01 ^a
C17:0	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.0	0.14 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.0	0.14 ± 0.01 ^a
C18:0	9.99 ± 0.10	10.29 ± 0.12 ^a	9.64 ± 0.12	10.36 ± 0.11 ^a	9.22 ± 0.12	10.20 ± 0.26 ^a
C18:1	59.37 ± 0.50	57.50 ± 0.56 ^a	59.40 ± 0.49	58.15 ± 0.52 ^a	58.26 ± 0.50	57.59 ± 0.34 ^a
C18:2	19.33 ± 0.08	20.45 ± 0.12 ^a	19.32 ± 0.10	20.48 ± 0.07 ^a	19.20 ± 0.05	20.15 ± 0.08 ^a
C18:3	0.24 ± 0.0	0.23 ± 0.0 ^a	0.57 ± 0.01	0.25 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.0	0.23 ± 0.0 ^a
C20:0	0.82 ± 0.0	0.79 ± 0.0 ^a	0.77 ± 0.0	0.79 ± 0.0 ^a	0.49 ± 0.01	0.78 ± 0.0 ^a
C20:1	0.24 ± 0.0	0.24 ± 0.0 ^a	0.27 ± 0.0	0.21 ± 0.0 ^a	0.17 ± 0.0	0.19 ± 0.02 ^a
C22:0	0.07 ± 0.0	0.14 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.0	0.07 ± 0.0 ^c	0.17 ± 0.0	0.11 ± 0.0 ^b
SFA	20.46 ± 0.50	21.22 ± 0.64 ^a	20.10 ± 0.50	20.58 ± 0.56 ^a	21.70 ± 0.30	21.47 ± 0.27 ^a
UFA	79.54 ± 0.60	78.78 ± 0.64 ^a	79.90 ± 0.60	79.42 ± 0.56 ^a	78.30 ± 0.20	78.53 ± 0.27 ^a
MUFA	59.97 ± 0.60	58.10 ± 0.52 ^a	60.01 ± 0.10	58.69 ± 0.50 ^a	58.85 ± 0.61	58.16 ± 0.35 ^a
PUFA	19.57 ± 0.12	20.68 ± 0.12 ^a	19.89 ± 0.06	20.72 ± 0.06 ^a	19.45 ± 0.08	20.37 ± 0.08 ^a

Microbial oil from *Y. lipolytica* yeast cultured with post-frying oil (Table 2) was compositionally similar to cashew oil (Table 7). The fatty acid profile of plant-based Camembert cheese analogs was characterized by a high proportion of unsaturated fatty acids (UFAs), primarily C18:1 (57.50%–59.37%) and C18:2 (19.20%–20.45%). The chosen microbial

Table 8

Oxidation induction time (and maximum oxidation time for lipids extracted from plant analogs of Camembert cheese prepared from cashews with and without the addition of microbial oil after 7 and 14 days of ripening. Means with the same capital letter (a, b) did not differ significantly ($\alpha = 0.05$). Statistical analyses reflect only to results after 14 days of ripening.

Days of ripening	Plant analogs from cashews	τ_{on} [min]	τ_{max} [min]
7	control	115.80 $\pm$ 0.21 ^b	129.94 $\pm$ 0.96 ^b
	with microbial oil	146.17 $\pm$ 1.51 ^c	159.57 $\pm$ 1.33 ^c
	with oleaginous yeast biomass	87.95 $\pm$ 4.5 ^a	101.16 $\pm$ 3.24 ^a
14	control	88.99 $\pm$ 4.65 ^a	101.08 $\pm$ 3.31 ^a
	with microbial oil	89.90 $\pm$ 5.55 ^a	101.51 $\pm$ 5.86 ^a
	with oleaginous yeast biomass	95.07 $\pm$ 3.07 ^a	107.57 $\pm$ 5.03 ^a

τ_{on} -oxidation induction time, τ_{max} -maximum oxidation time.

oil had similar proportions of C18:1 (65.14%) and C18:2 (18.04%), but saturated fatty acids (SFAs) accounted for only 5.63%, while cashew oil's SFA percentage was close to 20%. Given this, the addition of SCO did not alter the favorable composition of the product in terms of unsaturated, including polyunsaturated fatty acids, which is a positive aspect. Future work can focus on using fat-rich yeast biomass, as its addition increases protein and fiber content. For food products with a significant fat percentage, adding oleaginous biomass does not affect fat reduction. Reducing the fat content of a plant-based cheese analog with mold growth should not be a goal, given the taste and nutritional value of the conventional counterpart. Future research can focus on increasing the addition of fat-rich biomass or SCO without adversely affecting taste and appearance.

The quality of lipids present in Camembert analogs was also evaluated. The addition of microbial oil resulted in an increase in the oxidative stability of the fat fraction of the product (159.57 min), compared to the control product without the additive (129.94 min) (Table 8). However, changes were observed only after 7 days of ripening. When cheese-like products were enriched with oleaginous yeast biomass, a lower value of the oxidation reaction time was observed (101.16 min), but similarly only in the first week of the ripening process. After 14 days of storage, no significant effect of yeast additives was observed on the change in the oxidative stability of the lipid fraction of products, which were more susceptible to oxidation regardless of composition. τ_{max} values of oxidation were in the range (101.08–107.57 min). It could be concluded that the addition of SCO or oleaginous yeast biomass to the plant alternative of Camembert did not influence the stability of the final product (Fig. 5, Table 8).

Y. lipolytica is considered a safe species, and various yeast-based manufacturing processes have been classified by the Food and Drug Administration (FDA) as Generally Recognized as Safe (GRAS). The first step toward the use of *Y. lipolytica* biomass was the approval by the European Food Safety Authority (EFSA) for the use of biomass cultured in a waste medium (e.g., biofuel waste) as a novel food in dietary supplements for the general population over 3 years of age. The proposed maximum daily level is 3 g/day for children aged 3–9 years and 6 g/day thereafter (Jach & Malm, 2022). Regulation number 2024/2044 sets the conditions for the use of *Y. lipolytica* biomass in, among other things, meal replacements for weight control for adults, foods for special medical purposes, total diet replacements for weight control, dairy products, cheese and cheese products, nut spreads, cereal products, bread, coffee, soups, and many other food categories. The maximum level of addition of dried and heat-killed *Y. lipolytica* yeast biomass is 10 g/kg for cheese and cheese products, and 30 g/kg for nut spreads. In the product proposed in this work, the addition of oleogenic yeast biomass

was used at a level of 10 g/kg (Commission Implementing Regulation (EU) 2024/2044 of 29 July 2024). In the future, it would be worthwhile to analyze other levels of additives and their impact on the final quality of the product.

4. Conclusion

The paper emphasized the advantages of SCOs, such as their nutritionally favorable composition and the potential for a sustainable process of culturing yeast as a valuable source of microbial lipids. The study presented a solution for the management of waste substrates to obtain SCO. By selecting appropriate substrates, it was possible to obtain oil with the desired yield, composition, and high oxidative stability. The oleaginous yeast biomass was then utilized as an additive in analog products, and its potential for use in fat-rich vegan food products to increase protein, fiber, and dry matter content was demonstrated.

It should be noted that, based on current literature, there is no extraction method that is 100% effective in obtaining oils from microbial biomass (Uğur et al., 2024). Additionally, Karamerou et al. (2021) used techno-economic modeling to determine the minimum possible cost of a microbial palm oil substitute. They identified three key areas of research that could lead to the commercialization of SCO. One of these factors was the development of a new product design that uses whole cells instead of extracted oil. In line with these findings, we proposed a new food product—a plant-based analog of Camembert-type cheese with the addition of oleaginous yeast biomass. This concept exemplifies a solution in food technology that aligns with the principles of the circular economy.

CRediT authorship contribution statement

Katarzyna Wierzchowska: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Marek Roszko:** Methodology, Investigation. **Dorota Derewiaka:** Methodology, Investigation. **Karolina Szulc:** Methodology, Investigation. **Bartłomiej Zieniuk:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **Dorota Nowak:** Supervision, Resources, Methodology, Investigation. **Agata Fabiszewska:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis.

Compliance with Ethics requirements

This article does not contain any studies with human and animal subjects.

Funding

The study was financially supported by sources of the Ministry of Education and Science within funds of the Institute of Food Sciences of Warsaw University of Life Sciences (WULS), for scientific research.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The data generated during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Bao, W., Li, Z., Wang, X., Gao, R., Zhou, X., Cheng, S., Men, Y., & Zheng, L. (2021). Approaches to improve the lipid synthesis of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*: A

- review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, Article 111386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111386>
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(4), 219–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
- Bégin, V., Christophe, G., Fontanille, P., & Larroche, C. (2016). Microbial lipids are a potential source of food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.002>
- Bellou, S., Makri, A., Triantaphyllidou, I. E., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2014). Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology*, 160(4), 807–817. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074302-0>
- Beopoulos, A., & Nicaud, J. M. (2012). Yeast: A new oil producer? *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 19(1), 22–28. <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0426>
- Braga, A., Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Ferreira, E. C., & Belo, I. (2016). Quantitative image analysis as a tool for *Yarrowia lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media. *Journal of Biotechnology*, 217, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2015.10.023>
- Bryś, J., Flores Inés, F. V., Górka, A., Wirkowska-Wojdyla, M., Ostrowska-Ligeza, E., & Bryś, A. (2017). Use of GC and PDSC methods to characterize human milk fat substitutes obtained from lard and milk thistle oil mixtures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130, 319–327. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6452-8>
- Carsanba, E., Papanikolaou, S., Fickers, P., & Erten, H. (2020). Lipids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose in batch cultures. *Microorganisms*, 8(7), 1054. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071054>
- Ciemniewska-Zytikiewicz, H., Ratusz, K., Bryś, J., Reder, M., & Koczko, P. (2014). Determination of the oxidative stability of hazelnut oils by PDSC and Rancimat methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 118, 875–881. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3861-9>
- Commission Implementing Regulation (EU) 2024/2044 of 29 July 2024 amending Implementing Regulation (EU) 2017/2470 as regards the specifications and the conditions of use of the novel food *Yarrowia lipolytica* yeast biomass. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32024R2044>
- European Commission (EC). (2023). Commission regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing regulation (EC) No 1881/2006. *Official Journal of the European Union*, L119, 103–157. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>
- Fabiszewska, A., Pakulska, A., Zieniuk, B., Wierzchowska, K., Jasińska, K., Małajowicz, J., & Nowak, D. (2023). Unconventional extraction methods of oleaginous yeast cell pretreatment and disruption. *Applied Sciences*, 13(24), Article 13135. <https://doi.org/10.3390/app132413135>
- Fabiszewska, A., Wierzchowska, K., Nowak, D., Wołoszynowska, M., & Zieniuk, B. (2022). Brine and post-frying oil management in the fish processing industry—a concept based on oleaginous yeast culture. *Processes*, 10(2), 294. <https://doi.org/10.3390/pr10020294>
- Gao, Z., Ma, Y., Liu, Y., & Wang, Q. (2022). Waste cooking oil used as carbon source for microbial lipid production: Promoter or inhibitor. *Environmental Research*, 203, Article 111881. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111881>
- Ghazani, S. M., García-Llatas, G., & Marangoni, A. G. (2014). Micronutrient content of cold-pressed, hot-pressed, solvent extracted and RBD canola oil: Implications for nutrition and quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(4), 380–387. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300288>
- Ghazani, S. M., & Marangoni, A. G. (2022). Microbial lipids for foods. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 593–607. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.014>
- Grafton, R. Q., Daugbjerg, C., & Qureshi, M. E. (2015). Towards food security by 2050. *Food Security*, 7, 179–183. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0445-x>
- Hassoun, A., Ait-Kaddour, A., Abu-Mahfouz, A. M., Rathod, N. B., Bader, F., Barba, F. J., ... Regenstein, J. (2023). The fourth industrial revolution in the food industry—Part I: Industry 4.0 technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(23), 6547–6563. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2034735>
- Jach, M. E., & Malm, A. (2022). *Yarrowia lipolytica* as an alternative and valuable source of nutritional and bioactive compounds for humans. *Molecules*, 27(7), 2300. <https://doi.org/10.3390/molecules27072300>
- Juszczak, P., Tomaszewska, L., Kita, A., & Rymowicz, W. (2013). Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresource Technology*, 137, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.010>
- Kamath, R., Basak, S., & Gokhale, J. (2022). Recent trends in the development of healthy and functional cheese analogues—a review. *LWT*, 155, Article 112991. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112991>
- Kamzolova, S. V., Lunina, J. N., Samoilenko, V. A., & Morgunov, I. G. (2022). Effect of nitrogen concentration on the biosynthesis of citric acid, protein, and lipids in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biomolecules*, 12(10), 1421. <https://doi.org/10.3390/biom12101421>
- Karamerou, E. E., Parsons, S., McManus, M. C., & Chuck, C. J. (2021). Using techno-economic modelling to determine the minimum cost possible for a microbial palm oil substitute. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01911-3>
- Kmieciak, D., Fedko, M., Rudzińska, M., Siger, A., Gramza-Michałowska, A., & Kobus-Cisowska, J. (2020). Thermo-oxidation of phytosterol molecules in rapeseed oil during heating: The impact of unsaturation level of the oil. *Foods*, 10(1), 50. <https://doi.org/10.3390/foods10010050>
- Kowalski, B., Ratusz, K., Kowalska, D., & Bekas, W. (2004). Determination of the oxidative stability of vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(3), 165–169. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300915>
- Lopes, M., Miranda, S. M., & Belo, I. (2020). Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production—a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(24), 2583–2616. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1704602>
- Nattagh-Eshstivani, E., Barghchi, H., Pahlavani, N., Barati, M., Amiri, Y., Fadel, A., Khosravi, M., Talebi, S., Arzhang, P., Ziaei, R., & Ghavami, A. (2022). Biological and pharmacological effects and nutritional impact of phytosterols: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 299–322. <https://doi.org/10.1002/ptr.7312>
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031–1051. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>
- Papanikolaou, S., Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Nicaud, J. M., & Aggelis, G. (2009). Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(12), 1221–1232. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900055>
- Piasecka, I., Górka, A., Ostrowska-Ligeza, E., & Kalisz, S. (2021). The study of thermal properties of blackberry, chokeberry and raspberry seeds and oils. *Applied Sciences*, 11(16), 7704. <https://doi.org/10.3390/app11677704>
- PN-EN ISO: 5509. (2001). *Oil and vegetable and animal fats. preparation of methyl ester of fatty acids. polish committee for standardization*, Warsaw, Poland.
- PN-ISO 5498. (1996). *Agri-food products. Determination of crude fiber. Method General*.
- Pomraning, K. R., Wei, S., Karagiosis, S. A., Kim, Y. M., Dohnalkova, A. C., Arey, B. W., ... Baker, S. E. (2015). Comprehensive metabolomic, lipidomic and microscopic profiling of *Yarrowia lipolytica* during lipid accumulation identifies targets for increased lipogenesis. *PLoS One*, 10(4), Article e0123188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123188>
- Rafiq, S., Bhat, M. I., Sofi, S. A., Muzzafar, K., Majid, D., Dar, B. N., & Makroo, H. A. (2023). Bioconversion of agri-food waste and by-products into microbial lipids: Mechanism, cultivation strategies and potential in food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 139, Article 104118. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.015>
- Ratledge, C. (1987). Lipid biotechnology: A wonderland for the microbial physiologist. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(12), 1647–1656. <https://doi.org/10.1007/BF02542498>
- Ratledge, C. (2010). Single cell oils for the 21st century. In *Single cell oils* (pp. 3–26). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-73-8.50005-0>
- Ratledge, C., & Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, 20(7), 155–160. <https://doi.org/10.1002/lite.200800044>
- Raut, G., Jagtap, S., Kumar, V. R., & RaviKumar, A. (2022). Enhancing lipid content of oleaginous *Yarrowia lipolytica* biomass grown on waste cooking oil and its conversion to biodiesel by statistical optimization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02610-1>
- Rodrigues, M. L. (2018). The multifunctional fungal ergosterol. *mBio*, 9(5), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.01755-18>
- Rosko, M. L., Juszczak, K., Szczepańska, M., Świder, O., & Szymczyk, K. (2020). Background levels of polycyclic aromatic hydrocarbons and legacy organochlorine pesticides in wheat sampled in 2017 and 2018 in Poland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8097-5>
- Rosko, M., Kamińska, M., Szymczyk, K., & Jędrzejczak, R. (2018). Dietary risk evaluation for 28 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea preparations made of teas available on the Polish retail market. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53(1), 25–34. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1369323>
- Ruiz-Herrera, J., & Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178, 477–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0478-3>
- Sujith Kumar, M. S., Mawlong, I., & Singh, D. (2017). Phytosterol recovery from oilseeds: Recent advances. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), Article e12466. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12466>
- Symoniuk, E., Ratusz, K., & Krygier, K. (2016). Comparison of the oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil by pressure differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. *J. Food Sci. Technol.*, 53, 3986–3995. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2398-2>
- Szabo, R., & Štofaníková, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters*, 206(1), 45–50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb10984.x>
- Tiwari, A., Singh, G., Choudhri, G., Motiwale, M., Joshi, N., Sharma, V., Tutone, M., & Singour, P. K. (2022). Deciphering the potential of pre and pro-vitamin D of mushrooms against mpro and Plpro proteases of COVID-19: An in silico approach. *Molecules*, 27(17), 5620. <https://doi.org/10.3390/molecules27175620>
- Uğur, S., Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. (2024). Nutritional and medicinal properties of microbial oil. *Applied Sciences*, 14(10), 4232. <https://doi.org/10.3390/app14104232>
- Union, E. (2009). Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. *Official Journal of the European Union L*, 141, 5.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center. FoodData Central. Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/>
- Valoppi, F., Agustin, M., Abik, F., Morais de Carvalho, D., Sithole, J., Bhattarai, M., ... Mikkonen, K. S. (2021). Insight on current advances in food science and technology for feeding the world population. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, Article 626227. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.626227>

- Vasaki, M., Sithan, M., Ravindran, G., Paramasivan, B., Ekambaram, G., & Karri, R. R. (2022). Biodiesel production from lignocellulosic biomass using *Yarrowia lipolytica*. *Energy Conversion and Management X*, 13, Article 100167. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2021.100167>
- Wierzchowska, K., Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: A value-added product with nutritional benefits. *European Food Research and Technology*, 249(10), 2675–2688. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04322-w>
- Wierzchowska, K., Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. *Applied Sciences*, 12(24), Article 12877. <https://doi.org/10.3390/app122412877>
- Wierzchowska, K., Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 1–23. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01516-9>
- Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. *Applied Sciences*, 11(24), Article 11819. <https://doi.org/10.3390/app112411819>

Warszawa, 24.08.2024

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. Waste and Biomass Valorization, 1-23, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji publikacji, dokonaniu przeglądu dostępnej literatury, przygotowaniu i analizie danych, wizualizacji danych, napisaniu publikacji, edycji publikacji, pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Katarzyna Wierzchowska

Warszawa, 23.09.2024r.

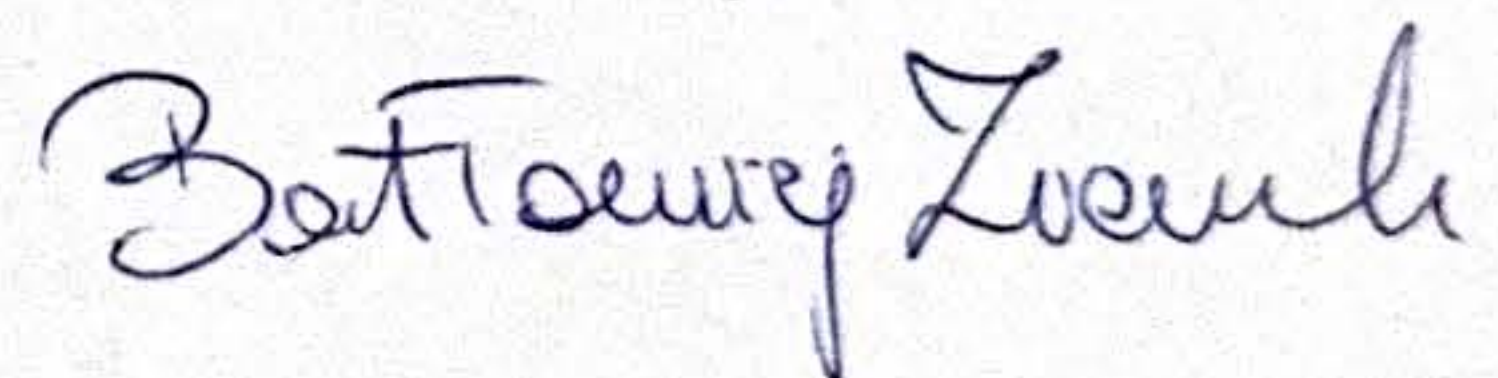
dr inż. Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. Waste and Biomass Valorization 1-23, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na napisaniu fragmentu publikacji, wizualizacji części danych, recenzji publikacji oraz jej edycji.

Podpis



Warszawa, 4.09.2024

dr hab. inż. Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2021). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. Waste and Biomass Valorization 1-23, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji maszynopisu artykułu, jego edycji, zapewnieniu zasobów do realizacji prac doświadczalnych i nadzorze nad realizacją postawionych założeń.

Podpis

Agata Fabiszewska

Warszawa, 24.08.2024

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Applied Sciences, 11(24), 11819, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, przygotowaniu danych do dalszych analiz, analizie danych, wizualizacji danych, analizie formalnej, napisaniu publikacji, edycji publikacji, pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Katarzyna Wierzchowska

Warszawa, 23.08.2024

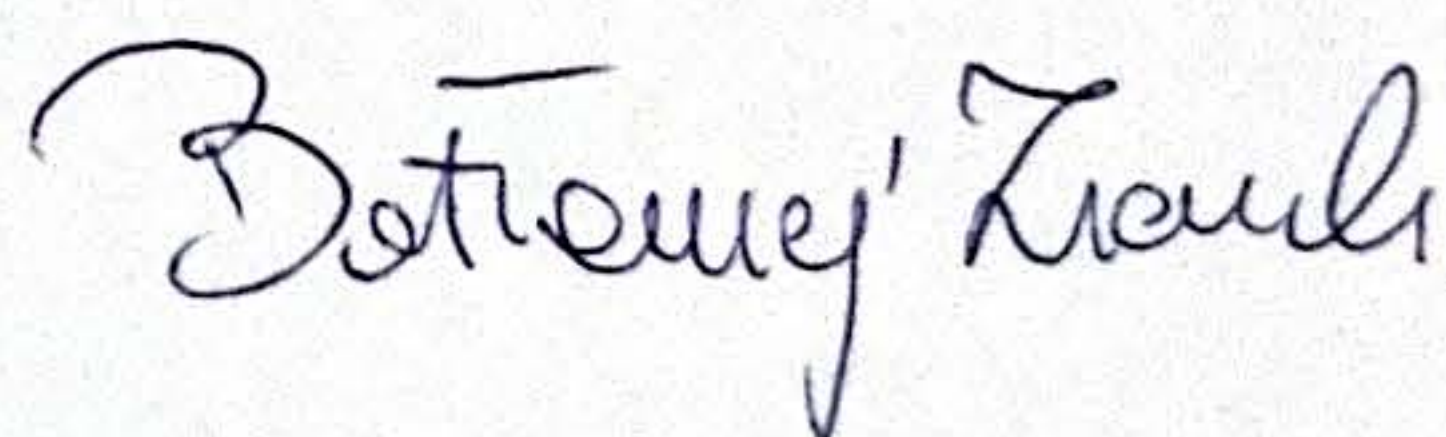
dr inż. Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Applied Sciences, 11(24), 11819, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, recenzji publikacji oraz jej edycji.

Podpis



Warszawa, 19.09.2024

dr hab. inż. Dorota Nowak
dorota_nowak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Applied Sciences, 11(24), 11819, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki badań, przeprowadzeniu części prac eksperymentalnych, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

19.09.2024

D. Nowak

Warszawa, 4.09.2024

dr hab. inż. Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. Applied Sciences, 11(24), 11819, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki badań, przeprowadzeniu i nadzorze nad realizacją części doświadczeń, analizie formalnej, recenzji maszynopisu artykułu, jego edycji i zapewnieniu zasobów do realizacji prac doświadczalnych.

Podpis

Agata Fabiszewska

Warszawa, 24.08.2024

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells?. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, analizie formalnej, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, przygotowaniu danych do dalszych analiz, analizie danych, wizualizacji danych, napisaniu publikacji, edycji publikacji, pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Katarzyna Wierzchowska

Warszawa, 2.09.2024

mgr inż. Aleksandra Kozik (z domu Musiałek)

Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells?. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie formalnej, opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części eksperymentów oraz wizualizacji danych.

Aleksandra Kozik

Podpis

Warszawa, 23.08.2024 r.

dr inż. Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells?. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji publikacji oraz jej edycji i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

Bartłomiej Zieniuk

Warszawa, 02.09.2024

Mgr inż. Karina Jasińska
karina_jasinska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells?. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

Karina Jasińska

Warszawa, 19.09.2024

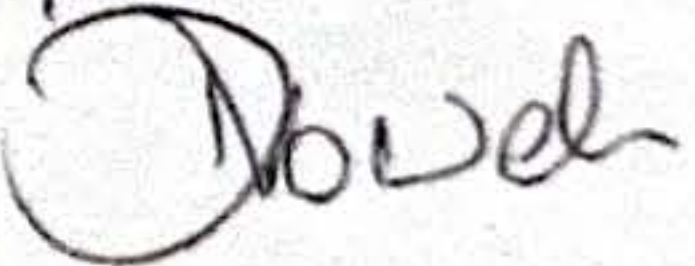
dr hab. inż. Dorota Nowak
dorota_nowak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells?. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu wybranych badań.

Podpis

19.09.2024


Warszawa, 4.09.2024

dr hab. inż. Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Musiałek, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2022). Is there any possibility to use ultrasounds, high-pressure homogenization or pulsed electric field in single cell oil release from oleaginous yeast cells?. In Biology and Life Sciences Forum (Vol. 18, No. 1, p. 56), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, analizie formalnej, opracowaniu części metodyki pracy, recenzji maszynopisu artykułu oraz jego edycji, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

Agata Fabiszewska

Warszawa, 24 09 2024

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, przygotowaniu danych do dalszych analiz, analizie danych, wizualizacji danych, analizie formalnej, napisaniu publikacji, edycji publikacji, pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Katarzyna Wierzchowska

Warszawa, 13.09.2024 r.

mgr inż. Anna Pakulska
anna_pakulska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu części badań.

Podpis

Anna Pakulska

Warszawa, 209 2024

dr hab. Dorota Derewiaka, prof. SGGW
dorota_derewiaka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. *Applied Sciences*, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki i przeprowadzeniu części badań.

Podpis

Warszawa, 06.09.2024

mgr Iga Piasecka
iga_piasecka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkół Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki badawczej.

Podpis

Iga Piasecka

Warszawa, 23.08.2024 r.

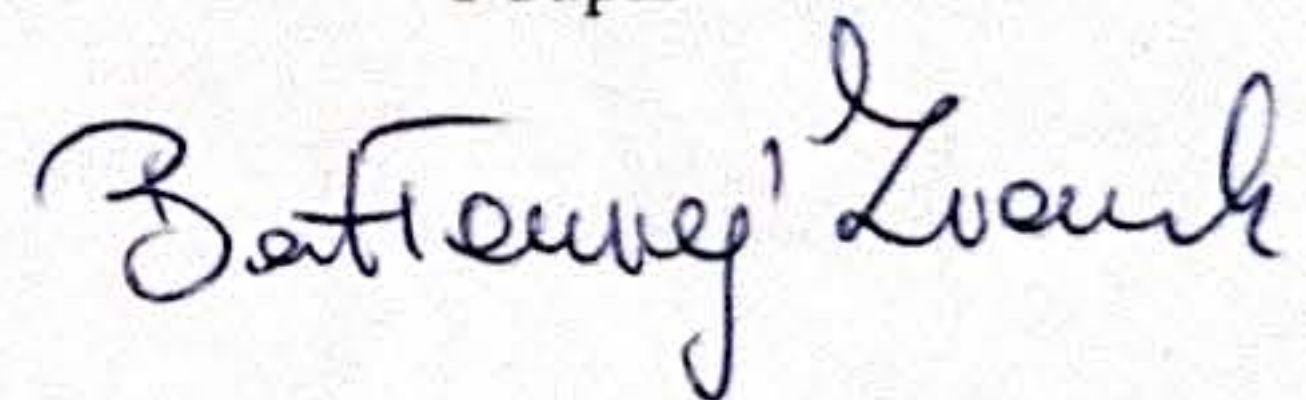
dr inż. Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, recenzji publikacji oraz jej edycji.

Podpis



Warszawa, 28.08.2024

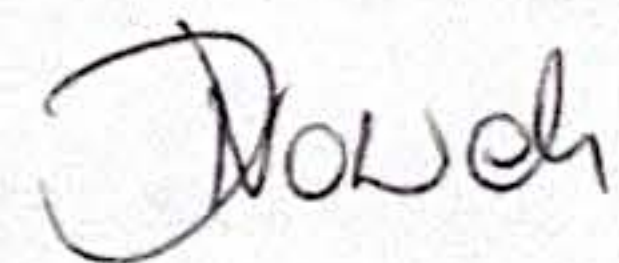
dr hab. inż. Dorota Nowak
dorota_nowak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. *Applied Sciences*, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części prac eksperymentalnych, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis



Warszawa, 4.09.2024

dr hab. inż. Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Pakulska, A., Derewiaka, D., Piasecka, I., Zieniuk, B., Nowak, D., & Fabiszewska, A. (2022). Concept of batch and fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* as a valuable source of sterols with simultaneous valorization of molasses and post-frying rapeseed oil. Applied Sciences, 12(24), 12877, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części prac badawczych, analizie formalnej, recenzji maszynopisu artykułu oraz jego edycji, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

Agata Fabiszewska

Warszawa, 24.08.2024

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, przygotowaniu danych do dalszych analiz, analizie danych, wizualizacji danych, analizie formalnej, napisaniu publikacji, edycji publikacji, pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Katarzyna Wierzchowska

Warszawa, 9.09.2024

dr hab. Dorota Derewiaka, prof. SGGW
dorota_derewiaka@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki i przeprowadzeniu części badań.



Podpis

Warszawa, 23.09.2024 r.

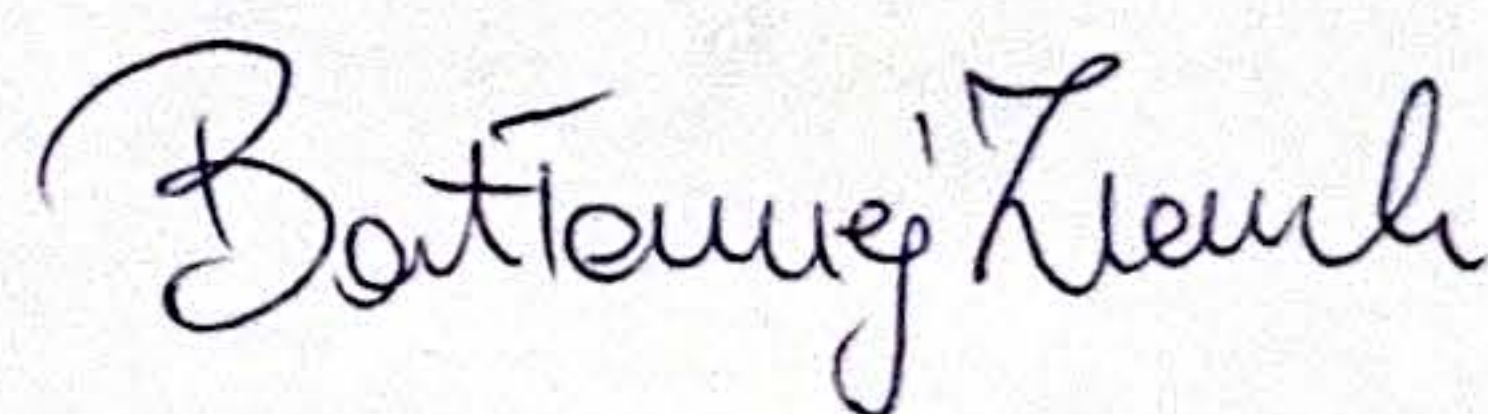
dr inż. Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688., mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, recenzji publikacji oraz jej edycji.

Podpis



Warszawa, 28.08.2024

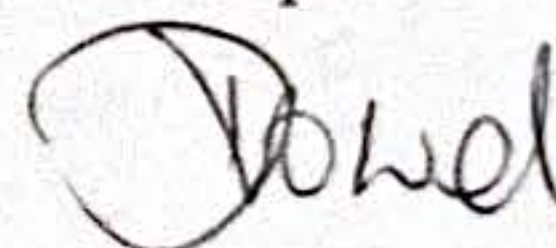
dr hab. inż. Dorota Nowak
dorota_nowak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis



Warszawa, 4.09.2024

dr hab. inż. Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Whey and post-frying oil as substrates in the process of microbial lipids obtaining: a value-added product with nutritional benefits. European Food Research and Technology, 249(10), 2675-2688, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, analizie formalnej, recenzji maszynopisu artykułu oraz jego edycji, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

Agata Fabiszewska

Warszawa, 28.01.2025

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska
katarzyna_wierzchowska1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Derewiaka, D., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2023). Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, przygotowaniu danych do dalszych analiz, analizie danych, wizualizacji danych, analizie formalnej, napisaniu publikacji, edycji publikacji, pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Katarzyna Wierzchowska

Warszawa, _____

dr hab. inż. Marek Roszko
marek.roszko@ibprs.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań.

Podpis

DYREKTOR

dr hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS-PIB

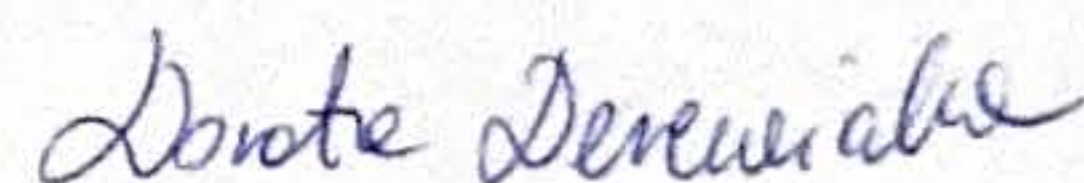
Warszawa, 9.09.2024

dr hab. Dorota Derewiaka, prof. SGGW
dorota_derewiaka@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki i przeprowadzeniu części badań.



Podpis

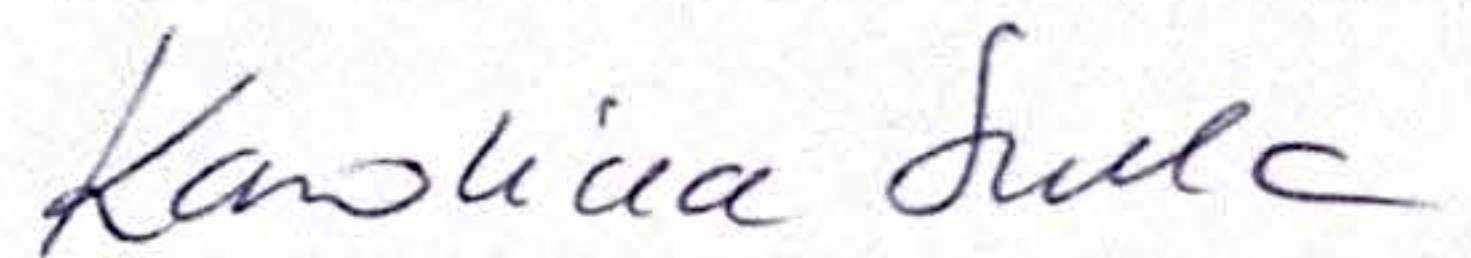
Warszawa, 09.09.2024

dr hab. inż. Karolina Szulc
karolina_szulc1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań.



Podpis

Warszawa, 23.09.2024

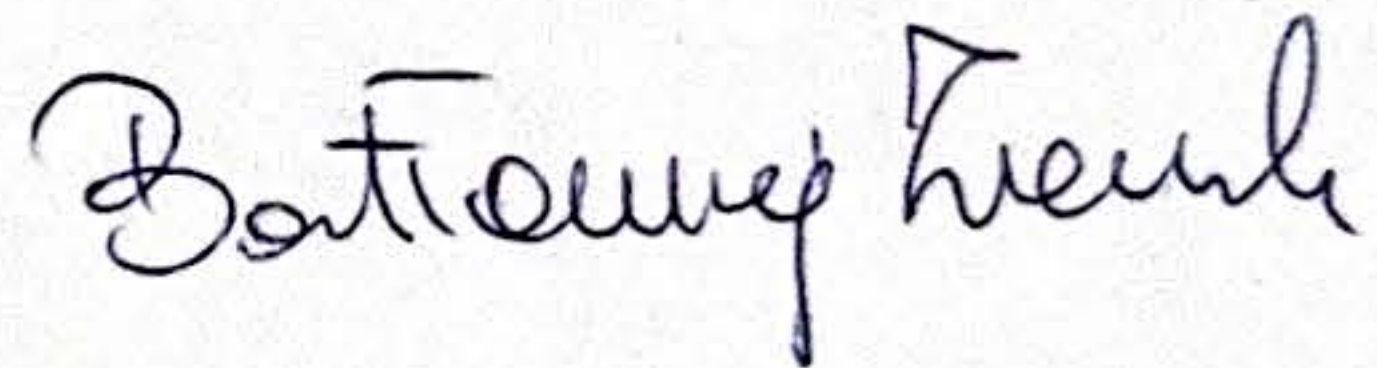
dr inż. Bartłomiej Zieniuk
bartlomiej_zieniuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, recenzji publikacji oraz jej edycji.

Podpis



Warszawa, 19.08.2024

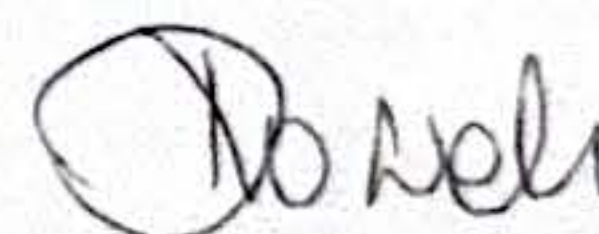
dr hab. inż. Dorota Nowak
dorota_nowak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis



Warszawa, 28.01.2025

dr hab. inż. Agata Fabiszewska
agata_fabiszewska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Wierzchowska, K.*, Roszko, M., Derewiaka, D., Szulc, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A. (2024). Yeast lipids as a sustainable source of nutrients in dairy products analogs. Food Bioscience, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu części metodyki, przeprowadzeniu części badań, analizie formalnej, recenzji maszynopisu artykułu oraz jego edycji, zapewnieniu zasobów i nadzorze nad realizacją eksperymentów.

Podpis

Agata Fabiszewska