

จุลินทรีย์ไขมันสูงและวิธีการสังเคราะห์น้ำมัน Oleaginous Microorganisms and Oil Synthesis Pathway

ยาสมิ เลาสกุล
Yasmi Louhasakul

หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000 ประเทศไทย
Biology program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Muang, Yala 95000. Thailand
Corresponding Author, E-mail: yasmi.lo@yru.ac.th
(Received: Aug 26, 2019; Revised: Jan 22, 2020; Accepted: May 13, 2020)

บทคัดย่อ

ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มสูงขึ้นส่งผลให้มีการแสวงหาและพัฒนาพลังงานใหม่ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล จุลินทรีย์ไขมันสูง ได้แก่ แบคทีเรียไขมันสูง ยีสต์ไขมันสูง ราไขมันสูงและสาหร่ายไขมันสูง ซึ่งสามารถผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จึงเป็นแหล่งน้ำมันทดแทนที่น่าสนใจเนื่องด้วยไขมันที่ผลิต โดยจุลินทรีย์ไขมันสูงมีคุณสมบัติที่เทียบเท่าน้ำมันพืช แต่จุลินทรีย์ไขมันสูงเจริญรวดเร็ว อัตราการผลิตสูง ใช้พื้นที่เพาะเลี้ยงน้อย และเพิ่มปริมาณการผลิตง่าย นอกจากนี้วิธีการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูงประกอบด้วยวิถีดีโนโว (*de novo*) และเอกส์โนโว (*ex novo*) จึงทำให้จุลินทรีย์ไขมันสูงสามารถใช้แหล่งอาหารได้กว้างขวางทั้งพวกน้ำตาลชนิดต่างๆ น้ำมันหรือไขมันจากพืชและสัตว์ รวมถึงวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เวย์ กากน้ำตาล สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จุลินทรีย์ไขมันสูงจึงเป็นแหล่งน้ำมันทดแทนที่มีศักยภาพ

คำสำคัญ : จุลินทรีย์ไขมันสูง แหล่งน้ำมันทดแทน วิธีการสะสมไขมัน

Abstract

A rising in energy demand has driven to search and develop a new alternative oil source, especially which could replace diesel oil. Oleaginous microorganisms including bacteria, yeasts, fungi and microalgae that can accumulate lipid excess of 20% of their biomass weight are interesting alternative oil source because their lipids are similar properties to those of plant oils but they present many advantages over plant oils such as fast-growing, higher production rate, less area requirement and easier scale-up. In addition, since there are 2 pathways for their lipid synthesis; *de novo* and *ex novo*, they can assimilate a wide variety of substrates such as various types of sugar, oils or fats from plants and animals as well as many residues from agriculture and agro-industries such as whey, molasses, polysaccharide compounds, etc. Therefore, oleaginous microorganisms would be potential renewable oil source.

Keywords: Oleaginous microorganisms, Renewable oil source, Lipid synthesis pathway

บทนำ

วิกฤติการณ์ด้านราคาน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมที่ปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อภาคเศรษฐกิจโดยรวมและเป็นอุปสรรคต่อการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศในปัจจุบันและอนาคต โดยการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นั้น ส่งผลให้ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มสูงขึ้นเป็นลำดับ ดังนั้นจึงต้องเร่งพัฒนาพลังงานทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม โดยเฉพาะพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล จึงมีการแสวงหาและพัฒนาพลังงานใหม่ที่มีความยั่งยืน เป็นพลังงานที่มีในท้องถิ่นนั้น ๆ เพื่อทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม น้ำมันพืชและแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากพืช จึงเป็นตัวเลือกในอันดับแรกๆ ที่ถูกนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมแต่กลับประสบ

ปัญหาสำคัญ นั่นคือการผลิตพืชเกษตรแต่เดิมผลิตเพื่อใช้บริโภคเป็นอาหาร ทั้งเพื่อเป็นอาหารของคนโดยตรงหรือนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์และเป็นวัตถุดิบเพื่อป้อนอุตสาหกรรมเกษตรต่าง ๆ แต่ปัจจุบันพื้นที่ทำการเกษตรกลับถูกนำไปปลูกพืชพลังงานเพิ่มขึ้น เนื่องจากกระแสความต้องการนำพืชพลังงานมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพมีมากขึ้น ส่งผลให้ทั่วโลกต่างหวาดวิตกเกี่ยวกับวิกฤตการณ์ด้านอาหารที่กำลังเกิดขึ้นและกลายเป็นหัวข้อสำคัญซึ่งถกเถียงกัน (Louhasakul, 2012, p. 1) ต่อมาจึงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบใหม่ ๆ ในการใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งจุลินทรีย์ไขมันสูงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับพลังงานทดแทน เนื่องจากการเจริญที่รวดเร็ว การใช้พื้นที่เพาะเลี้ยงน้อยและความสามารถในการผลิตน้ำมัน ซึ่งมีคุณสมบัติที่เทียบเท่าน้ำมันพืช อีกทั้งยังสามารถใช้แหล่งอาหารได้กว้างขวาง รวมถึงการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เวย์ กากน้ำตาล เปลือกส้ม กากตะกอนน้ำเสีย เป็นต้น (Zhu, *et al.*, 2008, pp. 7881-7882) ดังนั้นบทความปริทัศน์นี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับจุลินทรีย์ไขมันสูงและวิธีการสังเคราะห์และสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูง เพื่อเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยต่อไป

จุลินทรีย์ไขมันสูง

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีการสะสมของน้ำมันหรือไขมันในเซลล์สูงเรียกว่า จุลินทรีย์ไขมันสูง (Oleaginous microorganisms) หรือน้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single cell oils) ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าว ได้แก่ แบคทีเรียไขมันสูง ยีสต์ไขมันสูง ราไขมันสูงและสาหร่ายไขมันสูง (ตารางที่ 1) โดยพบว่าจุลินทรีย์ไขมันสูงสามารถผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งร้อยละ 90 ขององค์ประกอบไขมันเป็นไตรกลีเซอไรด์ (Triacylglyceride) (Wynn & Ratledge, 2005, p.123) ที่เหลือเป็นกรดไขมันอิสระชนิดต่างๆ หรือน้ำมันที่เป็นกลางได้แก่ ไดเอซิลกลีเซอไรด์ (Diacylglyceride) โมโนเอซิลกลีเซอไรด์ (Monoacylglyceride) และสเตอรอลเอสเทอร์ (Steryl ester) เป็นต้น รวมทั้งสเตอรอล (Sterol) และลิพิดมีขั้ว (Polar lipid) เช่น ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) สปีงโกลิพิด (Spingolipid) และไกลโคลิพิด (Glycolipid) เป็นต้น โดยในการสะสมไขมันในตำแหน่งต่างๆ ภายในเซลล์จะขึ้นอยู่กับฟังก์ชันที่จำเพาะของเซลล์ ตัวอย่างเช่น ลิพิดบอดี ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (Triacylglyceride) กับสเตอรอลเอสเทอร์ (Steryl ester) และรายล้อมด้วยโมเลกุลของฟอสโฟลิพิด จะสามารถพบในไซโตพลาสซึม และอยู่ในรูปของแหล่งพลังงานสำรอง (Ryckebosch, *et al.*, 2013, p. 1508) เอซิลกลีเซอไรด์ เช่น ไดเอซิลกลีเซอไรด์ (Diacylglyceride) โมโนเอซิลกลีเซอไรด์ (Monoacylglyceride) ทำหน้าที่เป็นสารอินเทอร์มีเดียตในการสังเคราะห์และการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอไรด์ กรดไขมันเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอไรด์ของเอนไซม์ไลเปส (Balasubramanian, *et al.*, 2013, p. 936) เป็นต้น

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำมันในเซลล์จุลินทรีย์ไขมันสูงชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ)	อ้างอิง
แบคทีเรีย		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	Kalscheuer <i>et al.</i> (2006, p.2529)
<i>Gordonia sp.</i>	96.0	Gouda <i>et al.</i> (2008, p.1703)
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	Subramaniam <i>et al.</i> (2010, p.1271)
<i>Bacillus subtilis</i>	39.8	Zhang <i>et al.</i> (2014, p.152)
<i>Rhodococcus opacus</i>	33.3	Kumar <i>et al.</i> (2015, p.1630)
<i>Rhodococcus opacus</i>	54.3	Goswami <i>et al.</i> (2017, p.400)
ยีสต์		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	47.07-68	Louhasakul & Cheirsilp (2013, p.110)
<i>Debaryomyces etchellsii</i>	28.1	Arous <i>et al.</i> (2016, p.899)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	>33	Louhasakul <i>et al.</i> (2016, p.417)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	53.8	Uprety <i>et al.</i> (2017, p.117)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	37.7	Huang <i>et al.</i> (2018, p.395)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	37.2	Abeln <i>et al.</i> (2019, p. 1)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ)	อ้างอิง
รา		
<i>Aspergillus tubingensis</i>	39.5-79.9	Cheirsilp & Kitcha (2015, p.73)
<i>Aspergillus awamori</i>	32.2-35.4	Subhash & Mohan (2015,p.215)
<i>Mortierella (Umbelopsis) isabellina</i>	61.1-83.3	Gardeli et al. (2017, p.1461)
<i>Mortierella circinelloides</i>	47.3-56.7	Szczesna-Antczak et al. (2018, p.110)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	3.60-46.2	Al-Hawash et al. (2018, p.1)
<i>Mortierella</i> sp.	32.0	Yao et al. (2019,p.80)
สาหร่าย		
<i>Nannochloropsis</i> sp.	44.7	Thawechai et al. (2016, p.139)
<i>Chlorella</i> sp.	20-43	Cheirsilp et al. (2017, p.2889)
<i>Tribonema minus</i>	34.2	Zhou et al. (2017,p.250)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	56.8	Srinuanpan et al. (2018, p.507)
<i>Botryococcus braunii</i>	47.2-50.2	Gim & Kim (2019, p.49)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	46.0-56.3	Gim & Kim (2019, p.49)

แบคทีเรียที่เรียกว่าแบคทีเรียไขมันสูงมีเพียงไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้น ซึ่งได้แก่ *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp., *Gordonia* sp., *Arthrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium*, *Streptomyces* และ *Nocardia* สามารถสะสมไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์โดยมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์และซีดีเอสเทอร์ (Wax ester) เพียงเล็กน้อย และไตรกลีเซอไรด์ที่ได้มีองค์ประกอบกรดไขมันหลักคือกรดโอเลอิก (C18:1) กรดปาล์มติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18:0) (Cho & Park, 2018, pp.504-505) ในบรรดาสายพันธุ์แบคทีเรียไขมันสูงพบว่า *Rhodococcus opacus* มีการการสะสมไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ได้มากกว่า ร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Alvarez, et al., 1996, p.377) จากรายงานของ Kumar et al. (2015, p. 1630) พบว่าแบคทีเรีย *R. opacus* สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้ร้อยละ 14.2-33.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ Goswami et al. (2017, p.400) พบว่าแบคทีเรีย *R. opacus* สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้ร้อยละ 54.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่มีกรดปาล์มติกและกรดสเตียริกเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ก็สามารถสะสมไขมันได้สูงเช่นกันเป็นร้อยละ 39.8 (Zhang, et al., 2014, p. 152)

ยีสต์ไขมันสูงและราไขมันสูงสามารถสะสมไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลนิก เป็นต้น โดยยีสต์ไขมันสูงสามารถสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และอาจมีการสะสมไขมันได้ถึงร้อยละ 40-70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งขึ้นกับสภาวะการเพาะเลี้ยง ขณะที่ยีสต์บางชนิด เช่น ยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*) และยีสต์อาหาร (*Candida utilis*) สามารถสะสมไขมันได้น้อยกว่าร้อยละ 5-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Limtong, 2006, p. 551) จากรายงานของ Hassan et al. (1996, p.355) พบว่า ยีสต์ *Cryptococcus curvatus* สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และไขมันที่ได้ส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์มากกว่าร้อยละ 80-90 ขององค์ประกอบไขมันทั้งหมด และประกอบด้วยกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 16 และ 18 เป็นส่วนใหญ่ โดยเป็นกรดโอเลอิกมากกว่าร้อยละ 44-49 และมีกรดสเตียริกน้อยกว่าร้อยละ 12-15 ขององค์ประกอบกรดไขมันทั้งหมด สำหรับยีสต์ *Yarrowia lipolytica* สามารถสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงบนกลีเซอรอลอุตสาหกรรม และเมื่อเลี้ยงบนไขมันสัตว์จากอุตสาหกรรมที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว พบว่ายีสต์ *Y. lipolytica* สามารถสะสมไขมันที่ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ร้อยละ 55 และกรดไขมันอิสระร้อยละ 35 ขององค์ประกอบไขมันทั้งหมด โดยมีกรดสเตียริกปริมาณร้อยละ 80 เป็นองค์ประกอบ (Papanikolaou, et al., 2001, pp. 218-220) สำหรับราไขมันสูงสามารถสะสมไขมันได้มากกว่าร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง บางสายพันธุ์ของราไขมันสูงเป็นพวกสร้างเส้นใย เช่น *Mucor rouxii*, *Mortierella apina* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น การผลิตไขมันทางการค้าจากราเป็นการผลิตไขมันที่มีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) เช่น กรดแกมมาลิโนเลนิก ไดโฮโม

ของกรดแกมมาลิโนเลนิก กรดอะราซิโดนิก กรดโดโคซะเฮกซาโนอิกและกรดอีโคซะเพนทาโนอิก (Papanikolaou & Aggelis, 2011, p. 1032) ซึ่งการผลิตกรดไขมันดังกล่าวขึ้นกับอายุของเส้นใย (Subramaniam, *et al.*, 2010, p. 1276) จากการศึกษาของ Fakas และคณะ (2009, p.6118) พบว่าไขมันที่สกัดได้จากเส้นใยอ่อนมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และปริมาณกรดไขมันดังกล่าวจะลดลงเมื่อเซลล์แก่ขึ้น การผลิตไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูงส่วนใหญ่พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสามารถเพิ่มการสะสมไขมัน สำหรับราไขมันสูงไม่พบอิทธิพลของสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไขมันที่เป็นกลาง ฟอสโฟลิปิดและไกลโคลิปิด เป็นต้น (Rasheva, *et al.*, 1997, p. 217) อย่างไรก็ตามมีอัตราการเจริญน้อยกว่ายีสต์ นั่นคือต้องใช้เวลานานในการเจริญสร้างเซลล์ อีกทั้งการสร้างโมซีเลียมของราทำให้อาหารเลี้ยงมีความหนืด ซึ่งมีผลต่ออัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (Čertík, *et al.*, 1996, p. 357) ขณะที่ยีสต์สามารถสะสมไขมันได้สูง มีอัตราการเจริญสูงและสามารถเลี้ยงในอาหารต้นทุนต่ำ นอกจากนี้การเจริญในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีของยีสต์ทำให้ลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและไวรัส (Zhu, *et al.*, 2008, p. 7881)

สาหร่ายไขมันขนาดเล็ก เป็นสายพันธุ์สาหร่ายที่เรียกว่า Miniature sunlight-driven biochemical factories ซึ่งสามารถผลิตน้ำมันและไฮโดรคาร์บอนจำนวนมากจากการสังเคราะห์แสงและใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าสามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้ตั้งแต่ร้อยละ 1- 70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จุลสาหร่าย (Microalgae) สามารถเจริญและสะสมไขมันได้ในสภาวะที่ใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (Autotrophic) สภาวะที่ใช้อินทรีย์สาร เป็นแหล่งคาร์บอน (Heterotrophic) และสภาวะที่ใช้ทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และอินทรีย์สารเป็นแหล่งคาร์บอน (Mixotrophic) โดยการสะสมไขมันไม่ขึ้นกับการเจริญของเซลล์ (Non-growth associate) ซึ่งจากรายงานการศึกษาของ Chiu *et al.* (2009, p.835) พบว่า การสะสมไขมันในระยะแรกของการเจริญ (Log phase) ระยะก่อนการเจริญคงที่ (Early stationary phase) และระยะการเจริญคงที่ (Stationary phase) ของสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* ให้ปริมาณไขมันร้อยละ 30.8, 39.7 และ 50.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Subramaniam, *et al.*, 2010, p. 1273) อย่างไรก็ตามสาหร่ายต้องการพื้นที่มากในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังใช้เวลานานในการเจริญ (Meng, *et al.*, 2009, p. 1)

วิธีการสังเคราะห์และสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูง

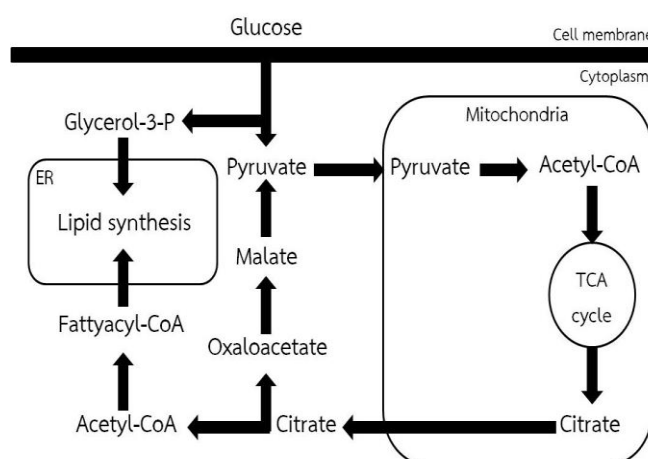
วิธีการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูงประกอบด้วย 2 วิธี คือ วิธีดีโนโว (*de novo*) เป็นวิธีการสังเคราะห์ไขมันที่ขึ้นอยู่กับสภาวะของสารตั้งต้นของกรดไขมัน เช่น อะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) และ มาโลนิลโคเอ (Malonyl-CoA) รวมทั้งสารที่ใกล้เคียงกันในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันที่เก็บภายในเซลล์ (วิถี Kennedy) และวิถีเอกส์โนโว (*ex novo*) เป็นวิธีการนำกรดไขมัน น้ำมันและไตรกลีเซอไรด์จากอาหารเลี้ยงมาเก็บสะสมในรูปเดิม โดยการสะสมไขมันในยีสต์ไขมันสูงและราไขมันสูงเริ่มต้นขึ้นเมื่อปริมาณไนโตรเจนจำกัดหรือเมื่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด ในขณะที่ยังคงมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปพอมีผลให้เกิดการนำเข้าคาร์บอนสู่เซลล์และเปลี่ยนเป็นไขมันโดยตรง โดยอาศัยเอนไซม์ที่จำเพาะที่จุลินทรีย์ไขมันสูงสร้างขึ้น ทั้งนี้เพราะเชื้อไม่สามารถสังเคราะห์สารอื่นที่ไม่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิก เนื่องจากสารอาหารหมด การที่เซลล์ยังคงนำแหล่งคาร์บอนเข้าสู่เซลล์และเปลี่ยนเป็นไขมันต่อไป ทำให้เห็นได้ว่าภายในเซลล์มีเม็ดไขมัน (Lipid droplet) ในขณะที่เซลล์สังเคราะห์ไขมัน กระบวนการอื่น ๆ ของเซลล์จะเกิดช้าลง (Ratledge & Wynn, 2002, pp.13-15; Beopoulos *et al.*, 2009, pp. 693-694) โดยการสะสมไขมันพบเป็นระบบกะที่มี 2 ระยะ ระยะแรก (Growth stage) ประกอบด้วยการเจริญที่มีสารอาหารทั้งหมดที่จำเป็นอย่างสมดุล จากนั้นเกิดระยะที่ 2 คือ ระยะแพตเทนนิง (Fattening stage) หรือระยะลิโปเจนิค (Lipogenic stage) ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างไขมัน หลังจากที่ได้รับสารอาหารอื่นหมด ยกเว้นคาร์บอนและออกซิเจน (Limtong, 2006, p. 552)

สับสเตรตสำหรับการผลิตไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูง โดยวิธีดีโนโว (*de novo*) ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่าง ๆ (กลูโคส ไซโลส และฟรุคโตส) แลคโตส ซูโครส วัสดุเศษเหลือที่ประกอบด้วยกลูโคส เวย์ กากน้ำตาล สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ (แป้งและเพคติน) เป็นต้น ส่วนสับสเตรตสำหรับการผลิตไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูง โดยวิถีเอกส์โนโว (*ex novo*) ได้แก่ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันหรือไขมันจากพืชและสัตว์ (Papanikolaou & Aggelis, 2011, p. 1032)

ปริมาณสารสัมพันธ์ของกลูโคส รวมทั้งน้ำตาลอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกัน เช่น แลคโตส ฟรุคโตส เป็นต้น พบว่าน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม (ประมาณ 0.56 โมล) เปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) 1.1 โมล สำหรับน้ำตาลไซโลส 100 กรัม (ประมาณ 0.66 โมล) เมื่อผ่านปฏิกิริยาของฟอสโฟคีโตเลสจะได้อะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) 1.2 โมล ขณะที่วิถีเพนโทส

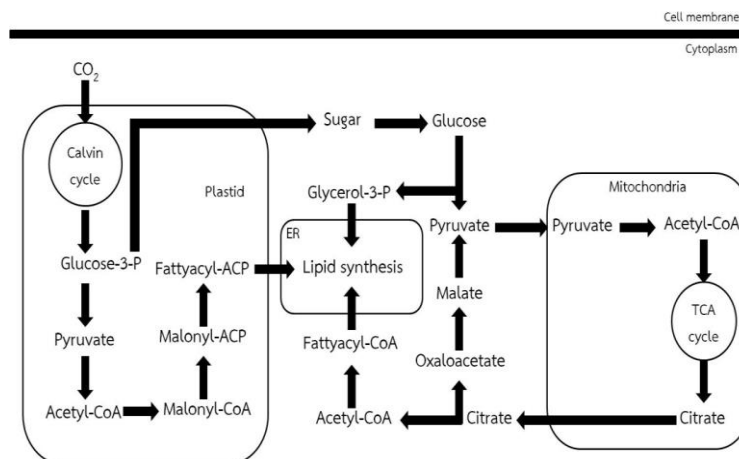
ฟอสเฟตไดอะซีติลโคเอ 1.0 โมล หากอะซีติลโคเอทั้งหมดเปลี่ยนเป็นไขมัน ตามทฤษฎีจะได้รับการสังเคราะห์ไขมันสูงสุดต่อการใช้กลูโคสเท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัม และการสังเคราะห์ไขมันสูงสุดต่อการใช้โซโลสเท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัม สำหรับกลีเซอรอล จะได้รับการสังเคราะห์ไขมันสูงสุดต่อการใช้กลีเซอรอลเท่ากับ 0.30 กรัมต่อกรัม (Papanikolaou & Aggelis, 2011, pp. 1032-1033)

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับชีวเคมีของการสะสมไขมันในยีสต์และราเส้นใย พบว่าการสะสมไขมันเกิดจากการที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารหมดและกลูโคสถูกนำเข้าสู่เซลล์ต่อไป ในขณะที่เอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน Tricarboxylic acid cycle (TCA, Krebs cycle) ภายในไมโทคอนเดรียมีกิจกรรมช้าหรือหยุดลง เนื่องจากมีอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (Adenosine monophosphate; AMP) ภายในเซลล์น้อยลง ทำให้มีการสะสมซิเตรต ซึ่งจะถูกลำเลียงไปยังไซโทซอลและเปลี่ยนเป็นอะซีติลโคเอ (acetyl-CoA) โดยเอนไซม์ซิเตรตไลเอส (ATP citrate lyase; ACL) ที่อาศัย ATP เอนไซม์ชนิดนี้ไม่พบในยีสต์และราที่ไม่สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ไขมันสูง (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ในการสะสมไขมันยังเชื่อว่าควบคุมโดยเอนไซม์มาลิก (Malic enzyme) ซึ่งเป็นแหล่งของนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยการสังเคราะห์กรดไขมัน C18 ทุกๆ 1 โมล ต้องใช้ NADPH ทั้งหมด 16 โมล (Limtong, 2006, p. 553) เช่นเดียวกันกับการสะสมไขมันในแบคทีเรีย ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อสารอาหารหรือแหล่งไนโตรเจนในอาหารหมด (Shields-Menard, *et al.*, 2018, pp. 456-457) ส่วนการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่าวิถีดีโนโว (*de novo*) ของการสังเคราะห์กรดไขมันเกิดขึ้นเช่นเดียวกันกับยีสต์และราเส้นใยเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงหรือจำกัดการให้แสง (Mühlroth, *et al.*, 2013, pp. 4674-4675)



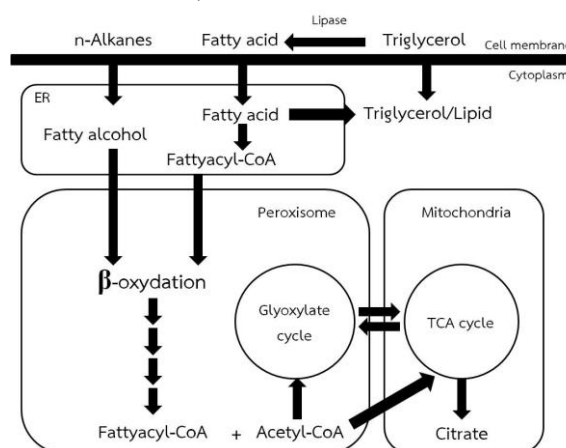
ภาพที่ 1 วิถี *de novo* ในการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Tai & Stephanopoulos (2013, p. 2)

ในสาหร่ายขนาดเล็ก สภาวะที่มีแสงการสังเคราะห์กรดไขมันเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 2) โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์แสงเป็นแหล่งพลังงานและตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน คาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่คลอโรพลาสต์ผ่านวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) และเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์ 3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde 3-phosphate) จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์ 3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde 3-phosphate) ถูกส่งออกไปยังไซโทพลาสซึม เพื่อผลิตไพรูเวต (Pyruvate) ผ่านวัฏจักรไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) (Liang & Jiang, 2013, pp.400-401) ในวัฏจักรไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) เอนไซม์ไพรูเวตไคเนส (Pyruvate kinase; PK) สังเคราะห์ไพรูเวต (Pyruvate) จากฟอสโฟอินอลไพรูเวต (Phosphoenolpyruvate; PEP) จากนั้นไพรูเวต (Pyruvate) ถูกเปลี่ยนอะซีติลโคเอ (Acetyl-CoA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ได้จากปฏิกิริยาสังเคราะห์แสง เป็นมาโลนิลโคเอ (Malonyl-CoA) ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะซีติลโคเอคาร์บอกซีเลส (Acetyl-CoA carboxylase; ACCase) (Hu, *et al.*, 2008, p. 627)



ภาพที่ 2 วิธี *de novo* ในการสะสมไขมันของสาหร่ายไขมันสูงในสภาวะที่มีแสง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Bellou, *et al.* (2014, p. 1479)

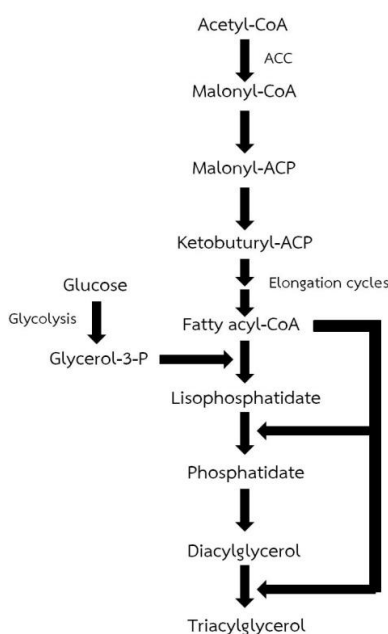
การสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูงแบบวิถีเอกส์โนโว (*ex novo*) จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเซลล์และเพิ่มขึ้นกับปริมาณของไนโตรเจนในอาหาร ซึ่งพบว่าการสะสมไขมันจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างองค์ประกอบอื่นๆ และการใช้แหล่งไนโตรเจนของเซลล์ (Papanikolaou & Aggelis, 2011, p. 1039) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Papanikolaou และคณะ (2007, pp. 431-433) พบว่าเมื่อปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารมีค่าต่ำหรือขาดแคลนจะพบการสะสมไขมันที่สูงขึ้น ในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอน ไขมันหรือน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ย่อยสารดังกล่าว เช่น เอนไซม์ไลเปส และย่อยสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอนหรือไตรกลีเซอไรด์ให้ได้เป็นไฮโดรคาร์บอนสายสั้นๆ หรือกรดไขมัน จากนั้นเซลล์จะนำสารประกอบดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีการนำเข้าแบบอาศัยพลังงาน (Active transport) เพื่อนำไปใช้สำหรับการเจริญหรือเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบของไขมันภายในเซลล์ ซึ่งมีชนิดกรดไขมันที่แตกต่างจากสับสเตรต โดยการเปลี่ยนโมเลกุลของกรดไขมันที่ผ่านการย่อยเป็นเอซิลโคเอสายสั้นๆ (Acyl CoAs) หรืออะซิติลโคเอ (Acetyl CoA) อาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์เอซิลโคเอออกซิเดส (Acyl CoA oxidase) หลายชนิดในกระบวนการของเบต้า-ออกซิเดชัน (β -oxidation) (Papanikolaou & Aggelis, 2011, p.1039) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 วิธี *ex novo* ในการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Fickers, *et al.* (2005, p. 530)

กรดไขมันที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บในรูปไตรกลีเซอไรด์ โดยทั่วไปเมื่อกรดไขมันจากอาหารเข้าสู่เซลล์ในวิถีสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Triacylglycerol biosynthetic pathway) ซึ่งเป็นไปตาม วิธี Kennedy pathway ขั้นตอนแรกใน

การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ เริ่มต้นโดยกรดไขมันถูกเปลี่ยนเป็นเอซิลโคเอ (Acyl CoA) ด้วยโคเอนไซม์โคเอ (Coenzyme CoA) จากนั้นกลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต (Glycerol-3-phosphate) ถูกเปลี่ยนโดยกลีเซอรอล-3-ฟอสเฟตเอซิลทรานส์เฟอเรส (G-3-P acyltransferase) เป็นกรดไลโซฟอสฟาติก (Lysophosphatidic acid) แล้วถูกเอนไซม์ไลโซฟอสฟาติกแอซิด-เอซิลทรานส์เฟอเรส (Lysophosphatidic acid acyltransferase) เปลี่ยนเป็นกรดฟอสฟาติก (Phosphatidic acid) ต่อมา มีการกำจัดหมู่ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ฟอสฟาติกแอซิดฟอสโฟไฮโดรเลส (Phosphatidic acid phosphohydrolase) ได้เป็น ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) ขั้นสุดท้ายไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol) ถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ไดเอซิล-กลีเซอรอลเอซิลทรานส์เฟอเรส (Diacylglycerol acyltransferase) หรือเอนไซม์ฟอสโฟลิพิดไดเอซิลกลีเซอรอลเอซิลทรานส์-เฟอเรส (Phospholipids diacylglycerol acyltransferase) เป็นไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerol) (Beopoulos, *et al.*, 2009, p. 695) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์กรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลในจุลินทรีย์ไขมันสูง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Dorval Courchesne, *et al.* (2009, p. 34)

บทสรุป

จุลินทรีย์ไขมันสูงเป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันในเซลล์ที่มีองค์ประกอบไขมันเป็นไตรกลีเซอไรด์ ร้อยละ 90 ทำให้มีคุณสมบัติที่เทียบเท่าน้ำมันพืช โดยวิธีการสะสมไขมันของจุลินทรีย์ไขมันสูงนั้นประกอบด้วยวิถีดีโนโว (*de novo*) และเอกส์โนโว (*ex novo*) ที่ทำให้จุลินทรีย์ไขมันสูงสามารถใช้แหล่งสับสเตรตได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงทำให้จุลินทรีย์ไขมันสูงมีศักยภาพสำหรับเป็นแหล่งน้ำมันทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมอย่างน้ำมันดีเซล

กิตติกรรมประกาศ

บทความปริทัศน์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความกรุณาให้คำปรึกษาแนะนำจากศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาส เขียรศิลป์ อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 ประเทศไทย



เอกสารอ้างอิง

- Abeln, F., Fan, J., Budarin, V. L., Briers, H., Parsons, S., Allen, M. J., Henk, D. A., Clark, J. & Chuck, C. J. (2019). Lipid production through the single-step microwave hydrolysis of macroalgae using the oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Algal Research*, 38, 101411.
- Al-Hawash, A. B., Li, S., Zhang, X., Zhang, X. & Ma, F. (2018). Productivity of γ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field. *Food Bioscience*, 21, 1-7.
- Alvarez, H. M., Mayer, F., Fabritius, D. & Steinbuchel, A. (1996). Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Archives of Microbiology*, 165, 377-386.
- Arous, F., Frikha, F., Triantaphyllidou, I. -E., Aggelis, G., Nasri, M. & Mechichi, T. (2016). Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *Journal of Cleaner Production*, 133, 899-909.
- Balasubramanian, R. K., Yen Doan, T. T. & Obbard, J. P. (2013). Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 215-216, 929-936.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F. & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476-1493.
- Beopoulos, A., Chardot, T. & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91, 692-696.
- Čertík, M., Andráši, P. & Šajbidor, J. (1996). Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ -linolenic acid extracted from fungi. *Journal of the American Chemical Society*, 73, 357-365.
- Cheirsilp, B. & Kitcha, S. (2015). Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. *Industrial Crops and Products*, 66, 73-80.
- Cheirsilp, B., Tippayut, J., Romprom, P. & Prasertsan, P. (2017). Phytoremediation of Secondary Effluent from Palm Oil Mill by Using Oleaginous Microalgae for Integrated Lipid Production and Pollutant Removal. *Waste and Biomass Valorization*, 8(8), 2889-2897.
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Tsai, M. T., Ong, S. C., Chen, C. H. & Lin, S. C. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nanocoropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, 100, 833-838.
- Cho, H. U. & Park, J. M. (2018). Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresource Technology*, 256, 502-508.
- Dorval Courchesne, N.M., Parisien, A., Wang, B., & Lan, C.Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141(1-2), 31-41.
- Fakas, S., Marki, A., Mavromati, M., Tselepi, M and Aggelis, G. 2009. Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid stage fermentation. *Bioresource Technology*, 100, 6118-6120.
- Fickers, P., Benetti, P. -H., Wache, Y., Marty, A., Mauerberger, S., Smit, M. S. & Nicaud, J. -M. (2005). Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential application. *FEMS Yeast Research*, 5, 527-543.
- Gardeli, C., Athenaki, M., Xenopoulos, E., Mallouchos, A., Koutinas, A. A., Aggelis, G. & Papanikolaou, S. (2017). Lipid production and characterization by *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* cultivated on lignocellulosic sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 1461-1477.

- Gim, G. H. & Kim, S. W. (2019). Growth factors in oceanic sediment significantly stimulate the biomass and lipid production of two oleaginous microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31(1),49–59.
- Goswami, L., Namboodiri, M. M. T., Kumar, R.V., Pakshirajan, K. & Pugazhenth, G. (2017). Biodiesel production potential of oleaginous *Rhodococcus opacus* grown on biomass gasification wastewater. *Renewable Energy*, 105, 400-406.
- Gouda, M. K., Omar, S. H. & Aouad, L. M. (2008). Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1703-1711.
- Hassan, M., Blanc, P. J., Granger, L. M., Pareilleux, A. & Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 31, 355-361.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. (2008). Microalgae triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621-639.
- Huang, Z. -F., Shen, Y., Luo, H. -J., Liu, J. -N. & Liu, J. (2018). Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresource Technology*, 247, 395-401.
- Kalscheuer, R., Torsten Stolting, T. & Steinbuchel, A. (2006). Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*, 152, 2529-2536.
- Kumar, S., Gupta, N. & Pakshirajan, K. (2015). Simultaneous lipid production and dairy wastewater treatment using *Rhodococcus opacus* in a batch bioreactor for potential biodiesel application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3, 1630-1636.
- Liang, M. -H. & Jiang, J. -G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 395-408.
- Limtong, S. (2549). Yeast: Khuamlaklaileh technology chiwaphab. Bangkok: Kasetsart University.
- Louhasakul, Y. (2012). *Cultivation of oleaginous yeasts in industrial wastes for oil production and its application for biodiesel production*. Master's thesis of Science in Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Louhasakul, Y. & Cheirsilp, B. (2013). Industrial Waste Utilization for Low-Cost Production of Raw Material Oil Through Microbial Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(1), 110–122.
- 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 and Biomass Valorization*, 7(3), 417–426.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34, 1-5.
- Mühlroth, A., Li, K., RØkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M. F., *et al.* (2013). Pathway of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate gene for enhanced production of EPA and DHA in species of *Chromista*. *Mar Drugs*, 11(11), 4662-4697.
- 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, 1031–1051.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Galiotou–Panayotou, M. and Komaitis, M. 2007. Industrial derivative of tallow: A promising renewable substrate for microbial lipid, single–cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 425–435.



- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G. and Marc. I. (2001). 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, 215-224.
- Rasheva, T., Kujumdzieva, A. & Hallet, J. N. (1997). Lipid production by *Monascus purpureus* albino strain. *Journal of Biotechnology*, 56, 217-224.
- Ratlledge, C. and Wynn, J. P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, 1-51.
- Ryckebosch, E., Bermúdez, S. P. C., Termote-Verhalle, R., Bruneel, C., Muylaert, K., Parra-Saldiver, R., *et al.* (2013). Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid components from the biomass of *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1501-1510.
- Shields-Menard, S. A. Amirsadeghi, M., French, W. T. & Boopathy, R. (2018). A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresource Technology*, 259, 451-460.
- Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., Prasertsan, P., Kato, Y. & Asano, Y. (2018). Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: Nutrient starvations and cost-effective harvesting process. *Renewable Energy*, 122, 507-516.
- Subhash, G. V. & Mohan, S. V. (2015). Sustainable biodiesel production through bioconversion of lignocellulosic wastewater by oleaginous fungi. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2, 215-226.
- Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M. & Bajpai, R. (2010). Microbial lipids from renewable resource: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 1271-1287.
- Szczęsna-Antczak, M., Struszczyk-Świta, K., Rzyńska, M., Szeląg, J., Stańczyk Ł. & Antczak, T. (2018). Oil accumulation and in situ trans/esterification by lipolytic fungal biomass. *Bioresource Technology*, 265, 110-118.
- Tai, M. & Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1-9.
- Thawechai, T., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P. & Prasertsan, P. (2016). Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light illumination and carbon dioxide feeding strategies. *Bioresource Technology*, 219, 139-149.
- Upreti, B. K., Dalli, S. S. & Rakshit, S. K. (2017). Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Conversion and Management*, 135, 117-128.
- Wynn, J. & Ratledge, C. (2005). *Oil from microorganism: Bailey's Industrial Oil and Fat Product*. (6th ed), 6, 121-153.
- Yao, Q., Chen, H., Wang, S., Tang, X., Gu, Z., Zhang, H., Chen, W. & Chen, Y. Q. (2019). An efficient strategy for screening polyunsaturated fatty acid-producing oleaginous filamentous fungi from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 158, 80-85.
- Zhang, Q., Li, Y. & Xia, L. (2014). An oleaginous endophyte *Bacillus subtilis* HB1310 isolated from thin-shelled walnut and its utilization of cotton stalk hydrolysate for lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 152.
- Zhou, W., Wang, H., Chen, L., Cheng, W. & Liu, T. (2017). Heterotrophy of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* for potential production of lipid and palmitoleic acid. *Bioresource Technology*, 239, 250-257.
- Zhu, L. Y. Zong, M. H. & Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99, 7881-7885.