



Wykorzystanie porafinacyjnych kwasów tłuszczowych do biosyntezy kwasu szczawiowego przez *Aspergillus niger* w warunkach obniżonego pH

Izabela Musiał, Waldemar Rymowicz, Dorota Lenart,
Danuta Witkowska

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza,
Wrocław

The use of post-refining fatty acids for oxalic acid production by *Aspergillus niger* at low pH

Summary

Post-refining fatty acids were used as a substrate for oxalic acid production by various strains of *Aspergillus niger*. All of the tested fungi strains were able to utilize fatty acids as energy and carbon source. A final oxalic acid concentration in the medium containing of 30 gdm⁻³ fatty acids ranged from 23,4 to 44 gdm⁻³, depending on the strain used. *A. niger* XP was found to be most suitable for oxalic acid production from fatty acids. The highest production of oxalic acid (68,0 gdm⁻³), the oxalate yield (1,33 gg⁻¹) and the overall oxalate productivity (8,5 gdm⁻³d⁻¹) were obtained when the fermentation medium contained 50 gdm⁻³ of fatty acids and the pH 4 was maintained from the beginning of the fermentation process.

Adres do korespondencji

Izabela Musiał,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Norwida 25/27,
50-375 Wrocław;
e-mail:
izmus@ozi.ar.wroc.pl

Key words:

oxalic acid, *Aspergillus niger*, post-refining fatty acids, production.

1. Wstęp

Na świecie w skali przemysłowej kwas szczawiowy (OA) produkowany jest metodami chemicznymi, które oparte są najczęściej na ogrzewaniu mrówczanu sodu w temperaturze około

400°C, a powstające tlenki poddawane są działaniu kwasu siarkowego oraz poprzez utlenianie polisacharydów (głównie celulozy) za pomocą kwasu azotowego (1). Wadą tych metod jest wprowadzanie do środowiska naturalnego dużych ilości toksycznych odpadów, zaletą – stosunkowo niska cena produkcji. Chińska firma Shanxi Province Yuanping Chemicals Co. Ltd., znaczący producent kwasu szczawiowego na świecie, w latach 2000-2001 zwiększyła produkcję tego kwasu z 80 do 120 tys. ton rocznie (2).

Produkcja kwasu szczawiowego jest możliwa także na drodze mikrobiologicznej biosyntezy z udziałem różnych mikroorganizmów. Najlepszym producentem tego kwasu są grzyby strzępkowe z gatunku *Aspergillus niger*, które w zależności od zastosowanego źródła węgla, wytwarzają w podłożu produkcyjnym od 4 do 7% kwasu szczawiowego (3-5). Inne mikroorganizmy takie jak *Poria placenta*, *Sclerotinia sclerotiorum* czy *Penicillium bilaii* wytwarzają do 0,2% kwasu szczawiowego (6-8).

Literatura dotycząca zagadnień związanych z procesem biosyntezy kwasu szczawiowego przez *A. niger* jest nieliczna i obejmuje kilkanaście pozycji literaturowych, w których pokazane są różne aspekty biosyntezy tego kwasu, także jako niepożądanego produktu ubocznego w procesie fermentacji cytrynowej, czy przy produkcji glukozamylazy (9-12).

Grzyby strzępkowe *A. niger* produkują różne kwasy organiczne takie jak kwas glukonowy, cytrynowy czy szczawiowy. Ich nadprodukcja jest ściśle uzależniona od składu podłoża produkcyjnego i od warunków prowadzenia procesu. Produkcja kwasu szczawiowego z różnych cukrów przez *A. niger* zachodzi w podłożu o pH 6-7, zawierającym odpowiednie ilości azotu i fosforu (13). W środowisku kwaśnym (w pH < 3) produkowany jest przez te mikroorganizmy głównie kwas cytrynowy. W naszych wcześniejszych badaniach wykazano, że w pH obniżonym do 4 wyselekcjonowane szczepy *A. niger* produkują duże ilości kwasu szczawiowego z substratów tłuszczowych (5,14,15). Produkcją dużych ilości taniego kwasu szczawiowego na drodze biologicznej, zainteresowany jest głównie przemysł biohydrometalurgiczny, gdzie kwas ten wykorzystywany jest w procesach wybielenia gliniek kaolinowych (16,17) czy do usuwania żelaza z piasku kwarcowego, co umożliwi wykorzystanie kwarcu do celów optycznych (18). Kwas szczawiowy z powodzeniem stosuje się także w procesach bioługowania rud manganowych (19,20) i ubogich niklowych rud laterytowych (21).

W większości prac, poświęconych biosyntezie kwasu szczawiowego, surowcem do jego produkcji były cukry takie jak sacharoza, glukoza, laktoza oraz surowce odpadowe z przemysłu spożywczego i z rolnictwa zawierające różne cukry, takie jak melasa buraczana, serwatka czy słodkie ziemniaki (22-25). W procesach biosyntezy kwasu szczawiowego przez *A. niger*, w których stosowano sacharozę, produkowane były w dużych ilościach także produkty uboczne takie jak kwas glukonowy i cytrynowy. W procesach prowadzonych w podłożach zawierających laktozę, produktem ubocznym był tylko kwas cytrynowy. Spośród procesów prowadzonych na różnych cukrach, proces produkcji kwasu szczawiowego z laktozy przez szczep *A. niger* 1120 w pH powyżej 6, charakteryzował się najwyższą ilością wyprodukowanego kwasu ($37-41 \text{ gdm}^{-3}$) (3,25). Ponadto, proces ten charakteryzował się również najwyższą wydajnością kwasu szczawiowego ($0,4-0,51 \text{ gg}^{-1}$).

W naszych wcześniejszych badaniach wykazano, że również surowce lipidowe, takie jak surowy olej rzepakowy oraz kwasy tłuszczowe mogą być z powodzeniem wykorzystane w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego przez *A. niger* (5,14,15). W procesach na oleju rzepakowym, wyselekcjonowane szczepy produkcyjne, umożliwiały w ciągu 7-dobowych hodowli wgłębnych, produkcję wysokich ilości kwasu szczawiowego dochodzących do 68 gdm^{-3} oraz niewielkich ilości ubocznego kwasu cytrynowego, poniżej $2,5 \text{ gdm}^{-3}$. Ponadto, produktywność i wydajność kwasu szczawiowego z substratów tłuszczowych była znacznie wyższa w porównaniu do procesów prowadzonych w podłożach z dodatkiem sacharydów i udziałem innych szczepów produkcyjnych *A. niger*.

W procesie rafinacji olejów roślinnych oraz przy produkcji biopaliw (produkcja estrów etylowych i metylowych wyższych kwasów tłuszczowych), produktem ubocznym są kwasy tłuszczowe. Wraz z rozwojem produkcji biopaliw w Polsce, będzie wzrastać także ilość dostępnych kwasów tłuszczowych, które można wykorzystać do celów biotechnologicznych, takich jak biosynteza kwasu szczawiowego przez *A. niger*. Wykorzystanie kwasów tłuszczowych, jako taniego i odnawialnego źródła węgla i energii w takim procesie biosyntezy jest zagadnieniem nowym i mało poznanym.

Celem pracy jest ocena dynamiki i wydajności procesu biosyntezy kwasu szczawiowego z kwasów tłuszczowych przez różne szczepy *A. niger* w hodowlach wgłębnych w warunkach obniżonego pH.

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizmy

W badaniach wykorzystywano następujące szczepy *A. niger*: dwa mutanty UV 13/33 i 13/32 pochodzące z Akademii Rolniczej w Lublinie; sześć mutantów UV CH11/21, IBR6/2, SBJ, SBP, MB i XP pochodzących z Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu; jeden szczep dzikiego typu F12 pochodzący z Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Szczepy przechowywano na skosach ziemniaczanych w temperaturze 4°C .

2.2. Podłoża hodowlane

Podłoże inokulacyjne zawierało (gdm^{-3}): porafinacyjne kwasy tłuszczowe [produkt odpadowy przemysłu tłuszczowego zawierający (% w/w) wolne kwasy tłuszczowe: 9,4 $\text{C}_{16:0}$, 3,3 $\text{C}_{18:0}$, 48,1 $\text{C}_{18:1}$, 31,2 $\text{C}_{18:2}$, 5,3 $\text{C}_{18:3}$, 0,8 $\text{C}_{20:1}$, 0,8 $\text{C}_{22:1}$], glukozę lub sacharozę – 30; KH_2PO_4 – 2,5; NH_4NO_3 – 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; metanol 15; wodę wodociągową 1 dm^3 . Podłoże do

produkcji kwasu szczawiowego zawierało (gdm^{-3}): porafinacyjne kwasy tłuszczowe od 30 do 50, glukozę lub sacharozę 150; KH_2PO_4 – 0,25; NH_4NO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; wodę wodociągową 1 dm^3 .

2.3. Techniki hodowlane

Podłoże inokulacyjne szczepiono zawiesiną zarodników sporządzoną w 0,9% NaCl zawierającym 0,1% Tween 80, tak, aby w 1 cm^3 podłoża było 10^6 zarodników.

Hodowle inokulacyjne prowadzono przez 3 doby w 300 cm^3 kolbach stożkowych zawierających 50 cm^3 podłoża inokulacyjnego na wstrząsarce typu G-10 firmy New Brunswick, w temperaturze 30°C i przy szybkości mieszania 160 rpm. Tak przygotowanym inokulum szczepiono podłoża produkcyjne w bioreaktorze. Hodowle produkcyjne prowadzono przez 7 dni w 5-litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III firmy New Brunswick zawierającym $2,5 \text{ dm}^3$ podłoża produkcyjnego, przy szybkości mieszania 500 rpm, szybkości napowietrzania 1 vvm i pH 4,0 utrzymywanym automatycznie za pomocą 40% KOH.

2.4. Metody analityczne

Biomasę oznaczano wagowo. Porafinacyjne kwasy tłuszczowe oznaczano wagowo, w tym celu 10 cm^3 zawiesiny komórek poddawano dwukrotnej ekstrakcji eterem naftowym, wirowano (5 minut, 4000 rpm) i frakcję eterową zawierającą kwasy tłuszczowe przenoszono do naczynek wagowych. Po odparowaniu eteru naftowego w temperaturze 50°C , naczynka dosuszano w wagosuszarce w temperaturze 105°C . Kwasy organiczne (kwas szczawiowy, cytrynowy, glukonowy) oznaczano techniką HPLC na kolumnie Aminex HPX87H połączonej z detektorem UV przy długości fali 210 nm. Cukry (sacharoza, glukoza, fruktoza) oznaczano techniką HPLC na tej samej kolumnie połączonej z detektorem RI. Szybkość przepływu fazy ciekłej ($20 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$) przez kolumnę wynosiła $0,6 \text{ cm}^3\text{min}^{-1}$. Oznaczenia prowadzono w temperaturze pokojowej.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Skryning szczepów *A. niger*

Dobór szczepu z gatunku *A. niger* do produkcji kwasu szczawiowego przeprowadzono w 7-dobowych hodowlach wglębnych, w podłożu o pH 4,0 zawierającym 3% (w/v) porafinacyjnych kwasów tłuszczowych. Wszystkie badane szczepy *A. niger* były

uzdolnione do produkcji kwasu szczawiowego z kwasów tłuszczowych (tab.). W zależności od użytego szczepu *A. niger*, procesy biosyntezy różniły się dynamiką produkcji i wydajnością kwasu szczawiowego oraz czystością fermentacji. Ilość ubocznego kwasu cytrynowego była w zakresie od 0 do 11,3 gdm⁻³. Szczepy 13/33, 13/32 oraz XP nie produkowały kwasu cytrynowego, natomiast w hodowlach z udziałem szczepów CH11/21 i IBR6/2 ilość tego kwasu wynosiła około 11,0 gdm⁻³. Mutanty te zostały wyselekcjonowane przez Elimera (26) jako najlepsze szczepy produkcyjne do biosyntezy kwasu cytrynowego z tłuszczów roślinnych. Zawartość kwasu szczawiowego w płynie pohodowlanym wynosiła od 23,2 gdm⁻³ w hodowli ze szczepem 13/22 do 44,0 gdm⁻³ w hodowli ze szczepem XP. Szczepy te produkowały również najwyższe ilości tego kwasu z surowego oleju rzepakowego (5,14,15).

Tabela

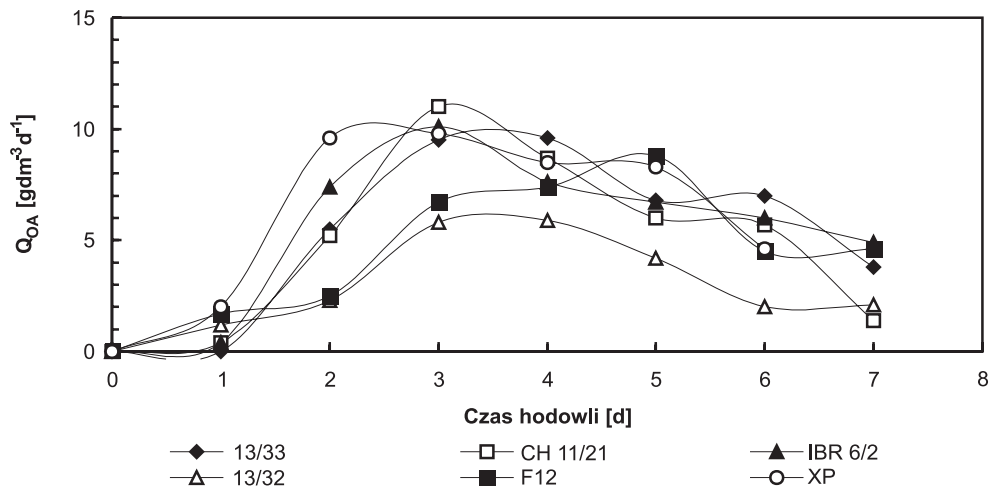
Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu szczawiowego przez różne szczepy *A. niger* w hodowlach wglębnych w podłożu zawierającym 30 gdm⁻³ porafinacyjnych kwasów tłuszczowych

Szczepy	X [gdm ⁻³]	OA [gdm ⁻³]	CA [gdm ⁻³]	OA/(OA+CA)	Q _{OA} [gdm ⁻³ d ⁻¹]	q _{OA} [gg ⁻¹ d ⁻¹]	Y _{P/S} [gg ⁻¹]
13/33	17,2	42,2	0,0	1	6,0	0,35	1,43
CH 11/21	14,7	37,5	11,3	0,77	5,3	0,36	1,28
IBR 6/2	8,2	43,0	10,6	0,80	6,1	0,74	1,45
13/32	14,6	23,2	0,0	1	3,3	0,23	0,79
F12	19,0	35,0	0,5	0,98	5,0	0,26	1,25
XP	8,0	44,0	0,0	1	7,3	0,92	1,74

X – biomasa; OA – kwas szczawiowy; CA – kwas cytrynowy; Q_{OA} – szybkość objętościowa produkcji kwasu szczawiowego; q_{OA} – szybkość właściwa produkcji kwasu szczawiowego; Y_{P/S} – wydajność kwasu szczawiowego (g kwasu szczawiowego/g zutilizowanego substratu)

Pośród badanych szczepów *A. niger*, szczep XP charakteryzował się najwyższą objętościową i właściwą szybkością produkcji kwasu szczawiowego (7,3 gdm⁻³d⁻¹, 0,92 gg⁻¹d⁻¹) oraz produkował kwas szczawiowy z najwyższą wydajnością (1,74 gg⁻¹). W naszych badaniach wydajność kwasu szczawiowego z kwasów tłuszczowych była bardzo wysoka w porównaniu do wartości cytowanych w literaturze. Wydajność kwasu szczawiowego na sacharozie nie przekraczała 0,19 gg⁻¹ (24), a w podłożach z laktozą była w zakresie od 0,4 do 0,51 gg⁻¹ (4,13,25).

Na rysunku 1 pokazano zmiany szybkości objętościowej produkcji kwasu szczawiowego w czasie procesu biosyntezy dla wszystkich badanych szczepów obliczaną metodą różnicową pomiędzy kolejnymi dobami. Dynamika produkcji kwasu szczawiowego zmieniała się w czasie 7-dobowej hodowli. Szczepy CH 11/21, 13/33, IBR 6/2 i 13/32 wykazywały najwyższą produktywność kwasu szczawiowego, od 5,9 do 11,0 gdm⁻³d⁻¹, w 3 dobie hodowli. Natomiast szczep F12 maksymalną wartość tego



Rys. 1. Zmiany szybkości objętościowej produkcji kwasu szczawiowego podczas hodowli wglębnych różnych szczepów *A. niger* w podłożu zawierającym 30 gdm^{-3} porafinacyjnych kwasów tłuszczowych.

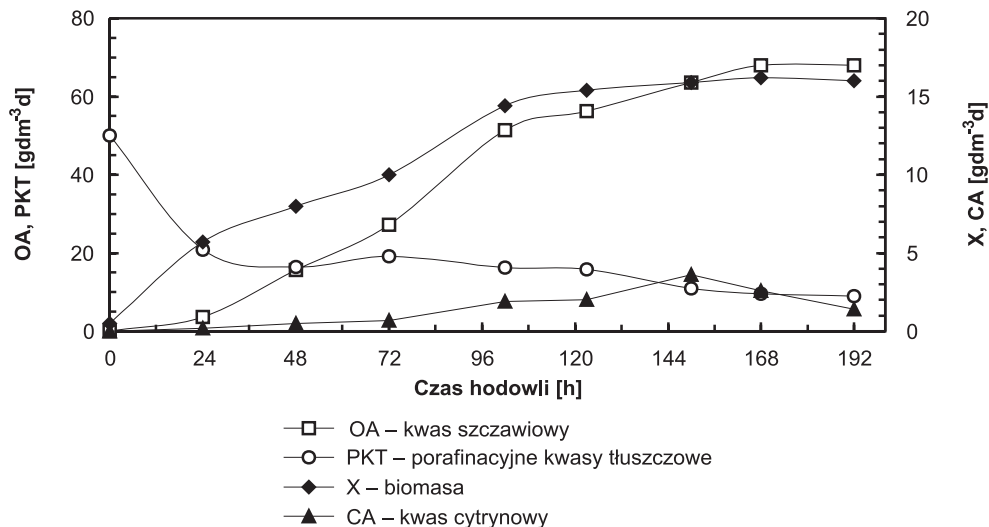
parametru ($8,8 \text{ gdm}^{-3}\text{d}^{-1}$) osiągał w piątej dobie hodowli. Wysoką i stabilną dynamikę produkcji kwasu szczawiowego stwierdzono w hodowli z udziałem szczepu XP, która utrzymywała się na poziomie od $8,3$ do $9,9 \text{ gdm}^{-3}\text{d}^{-1}$ od drugiej do piątej doby. W badaniach Bohlmann i wsp. (3), szybkość produkcji kwasu szczawiowego z laktozy wynosiła około $6,5 \text{ gdm}^{-3}\text{d}^{-1}$.

Do dalszych badań wybrano szczep XP, który był najlepszym producentem kwasu szczawiowego z kwasów tłuszczowych.

3.2. Biosynteza kwasu szczawiowego przez szczep *A. niger* XP z różnych źródeł węgla

Proces biosyntezy kwasu szczawiowego przeprowadzono w podłożu zawierającym zwiększoną ilość kwasów tłuszczowych do 5% (w/v). Dla porównania przeprowadzono również dwie hodowle w podłożach zawierających 15% sacharozy lub glukozy.

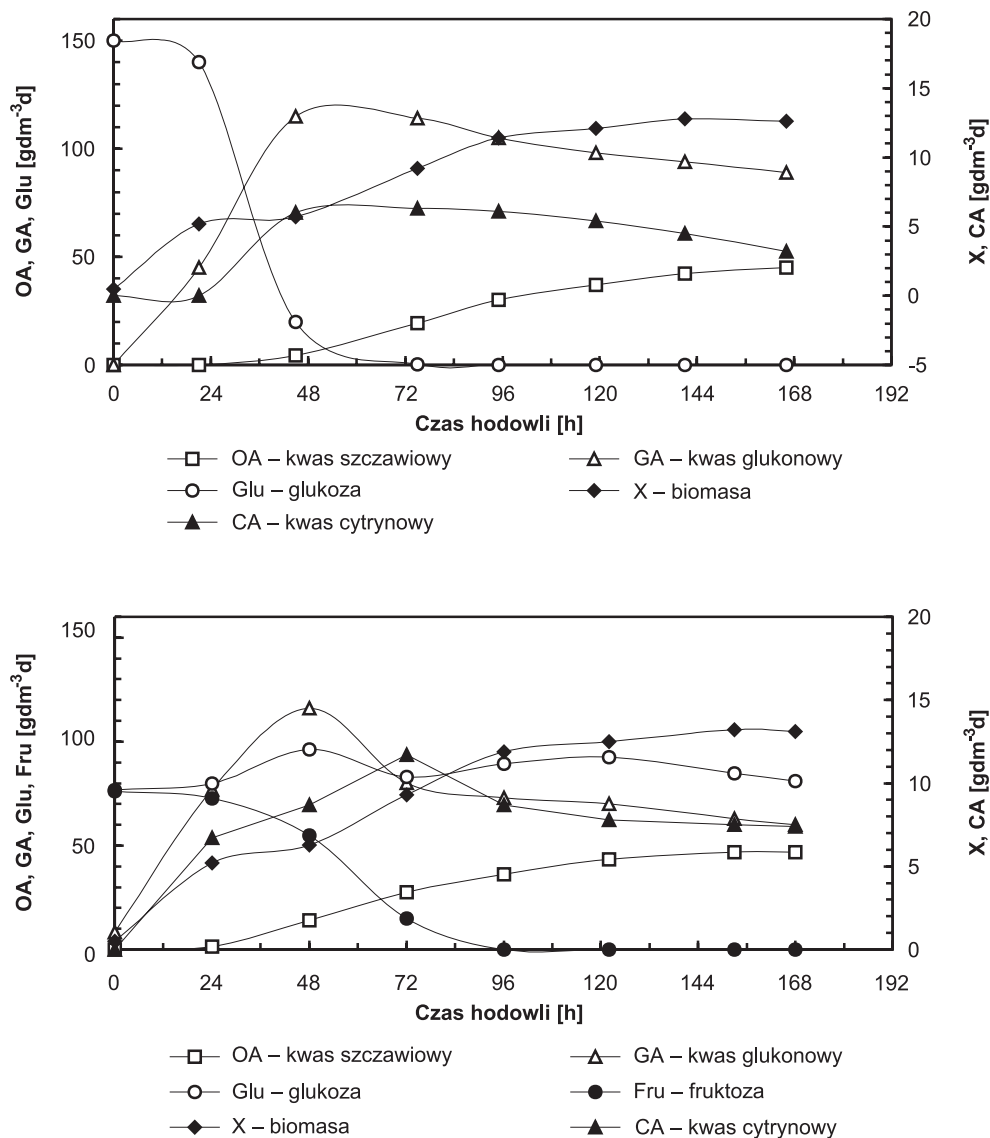
Na rysunku 2 przedstawiono dynamikę procesu biosyntezy kwasu szczawiowego przez szczep XP w 8-dobowej hodowli wglębnej. Najwyższą ilość kwasu szczawiowego ($68,0 \text{ gdm}^{-3}$) uzyskano w siódmej dobie hodowli. Stężenie kwasu cytrynowego wzrastało do poziomu $3,6 \text{ gdm}^{-3}$ w szóstej dobie hodowli, a następnie obniżało się do wartości $1,4 \text{ gdm}^{-3}$ na końcu procesu. Średnie wartości objętościowej szybkości produkcji oraz wydajności kwasu szczawiowego, wynosiły odpowiednio; $8,5 \text{ gdm}^{-3}\text{d}^{-1}$ i $1,33 \text{ gg}^{-1}$. Wartości te były porównywalne z wynikami uzyskanymi w procesie prowadzonym w pH 4-5, w którym jako substrat stosowano olej rzepakowy (5).



Rys. 2. Przebieg procesu biosyntezy kwasu szczawiowego w hodowli węgłnej przez szczep *A. niger* XP w podłożu zawierającym 50 gdm⁻³ porafinacyjnych kwasów tłuszczowych.

Dla porównania, do produkcji kwasu szczawiowego przez szczep XP, w podłożu produkcyjnym stosowano glukozę i sacharozę w pH obniżonym do 4. Na rysunku 3 przedstawiono przebieg tych procesów. W podłożu zawierającym sacharozę już po pierwszej dobie hodowli, sacharoza została rozłożona przez enzym invertazę produkowaną przez *A. niger* do cukrów prostych, do glukozy i fruktozy. W obu hodowlach przez pierwsze dwie doby, szczep *A. niger* XP produkował głównie kwas glukonowy i kwas cytrynowy, których stężenia wynosiły odpowiednio: w podłożu z glukozą, 115,0 i 6,0 gdm⁻³, a w podłożu z sacharozą, 116,0 i 8,0 gdm⁻³. W kolejnych dobach hodowli znacznie obniżała się ilość kwasu glukonowego, w hodowli z glukozą do 89,0 gdm⁻³, a w hodowli z sacharozą do 60,0 gdm⁻³. Stwierdzono także niewielkie obniżenie ilości kwasu cytrynowego. Kwas szczawiowy produkowany był od 2 doby hodowli, a jego końcowe stężenie w obu procesach było podobne i wynosiło około 46,0 gdm⁻³. Podobny przebieg biosyntezy kwasu szczawiowego przez *A. niger* w podłożach z sacharozą uzyskali Strasser i wsp. (24) oraz Cameselle i wsp. (4). Stężenie kwasu glukonowego w końcowym okresie tych hodowli było wyższe niż kwasu szczawiowego. Ponadto, w swoich badaniach stwierdzili oni, że w ciągu bardzo krótkiego czasu sacharoza została zhydrolizowana do glukozy i fruktozy, a badane przez nich szczepy *A. niger* w pierwszej kolejności utylizowały glukozę, a dopiero później fruktozę. W naszych badaniach szczep XP w pierwszej kolejności asymilował fruktozę, a następnie glukozę (rys. 3B).

Szczep *A. niger* XP, wykazujący wysokie zdolności do utylizacji tłuszczów, sprawdził się także w hodowlach zawierających cukry prowadzonych w warunkach obniżonego pH do 4. Objętościowa szybkość produkcji kwasu szczawiowego w proce-



Rys. 3. Przebieg procesu biosyntezy kwasu szczawiowego w hodowli wglębnej przez szczep *A. niger* XP w podłożu zawierającym: (A) 150 gdm⁻³ glukozy i (B) 150 gdm⁻³ sacharozy.

sach z glukozą i sacharozą była wysoka, i wynosiła odpowiednio: 6,4 i 6,7 gdm⁻³d⁻¹. Wartości tego parametru są porównywalne z wartościami uzyskanymi przez innych autorów w procesach prowadzonych w podłożach z sacharozą w pH 6-7 (3). Stosowany przez nich szczep *A. niger* 1120 w pH 5 produkował 2-krotnie mniej kwasu szczawiowego, aniżeli w pH 6. W naszych badaniach wydajność kwasu szczawiowe-

go z sacharozy i glukozy, w porównaniu do procesów prowadzonych w podłożach z kwasami tłuszczowymi, była bardzo niska i wynosiła odpowiednio 0,7 i 0,3 gg⁻¹.

Uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie wniosku, że produkty odpadowe takie jak porafinacyjne kwasy tłuszczowe są dobrym substratem do produkcji kwasu szczawiowego przez wyselekcjonowane szczepy *A. niger* w warunkach obniżonego pH do 4. Dalsze doskonalenie procesu biosyntezy kwasu szczawiowego przez najlepszy dla takiego środowiska szczep XP, pozwoli opracować alternatywną metodę produkcji tego kwasu na drodze mikrobiologicznej.

Badania realizowane w ramach projektu badawczego nr 2PO6T 11326 finansowanego przez KBN w latach 2004-2006.

Literatura

1. Pernet J. C., (1991), *Oxalic acid*, in: *Encyclopedia of Chemical Technology*, Eds. Kirk R. E., Othmer D. F., 9, 661-674, New York: Interscience Publisher Inc.
2. <http://yuanpinchem.com/english/oa.htm>
3. Bohlmann J. T., Cameselle C., Nunez M. J., Lema J. M., (1998), *Bioprocess Eng.*, 19, 337-342.
4. Cameselle C., Bohlmann J. T., Nunez M. J., Lema J. M., (1998), *Bioprocess Eng.*, 19, 247-252.
5. Rymowicz W., Lenart D., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25, 12, 955-957.
6. Cunningham J. E., Kuiack C., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1451-1458.
7. Marciano P., Margo P., Favaron F., (1989), *FEMS Microbiol. Lett.*, 61, 57-60.
8. Ritschkoff A. C., Ratto M., Buchert J., Vikari L., (1995), *J. Biotechnol.*, 40, 179-186.
9. Leangon S., Maddox I. S., Brooks J. D., (1999), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15(4), 493-495.
10. Pedersen H., Christensen B., Hjort C., Nielsen J., (2000), *Metab. Eng.*, 2, 34-41.
11. Ruijter G. J. G., van de Vondervoort P. J. I., Visser J., (1999), *Microbiol.*, 145, 2569-2576.
12. Mandal S. K., Banerjee P. C., (2005), *Process Biochem.*, 40, 1605-1610.
13. Santoro R., Cameselle C., Rodriguez-Couto S., Sanroman A., (1999), *Bioprocess Eng.*, 20, 1-5.
14. Rymowicz W., Lenart D., (2004), *Electr. J. Pol. Agricult. Univ., Series Biotechnology*, 7, 2, art.01.
15. Rymowicz W., Lenart D., (2004), *Electr. J. Pol. Agricult. Univ., Series Biotechnology*, 7, 2, art.03.
16. de Mesquita L. M. S., Rodrigues T., Gomes S. S., (1996), *Minerals Eng.*, 9, 965-971.
17. Rymowicz W., Lenart D., Musiał I., Myjkowski A., (2003), *Ceramika*, 76, 98-104.
18. Veglio F., Passariello B., Barbaro M., Plescia P., Marabini M. A., (1998), *Int. J. Mineral Process*, 54, 183-200.
19. Veglio F., Beolchini F., Gasbarro A., Toro L. S., Abbruzzese C., (1997), *Int. J. Mineral Process*, 50, 255-273.
20. Bahlin G. E., Noble G. E., Lampshire L. D. Eisele A. J., (1992), *Hydrometallurgy*, 29, 131-144.
21. Sukla B. L., Panchanadikar V., (1993), *Hydrometallurgy*, 32, 373-379.
22. Guru M., Bilgesu A. Y., Pamuk V., (2001), *Bioresource Technol.*, 77, 81-86.
23. Leangon S., Maddox I. S., Brooks J. D., (1999), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 493-495.
24. Strasser H., Burgstaller W., Schinner F., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 119, 365-370.
25. Santoro R., Cameselle C., Rodriguez-Couto S., Sanroman A., (1999), *Bioprocess Eng.*, 20, 1-5.
26. Elimer E., (1998), *Food Technol. Biotechnol.*, 36, 189-192.



Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Waldemar Rymowicz, Piotr Juszczak, Anita Rywińska, Barbara Żarowska, Izabela Musiał

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Wrocław

Citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast

Summary

The present study describes an alternative way of raw glycerol (the main by-product of bio-diesel production units) valorization with the formation of remarkable amounts of citric acid. The results of the experiments indicated that raw glycerol was an adequate substrate for citric acid production by *Y. lipolytica*. The highest citric acid concentration of 144,5 gdm⁻³ was achieved during fed-batch culture with *Y. lipolytica* 1.31 yeast strain. The yield of citric acid was 0,72 gg⁻¹.

Key words:

Yarrowia lipolytica, citric acid, glycerol, submerged culture.

1. Wstęp

Grzyby strzępkowe *Aspergillus niger* oraz drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica* są obecnie najlepszymi producentami kwasu cytrynowego (CA) (1-4). Prace nad drożdżową fermentacją cytrynową, zapoczątkowane w latach 60. ubiegłego wieku, dotyczyły głównie procesów, w których wykorzystywano węglowodory alifatyczne jako substraty w tej biosyntezie (5,6). Dopiero pod koniec lat 70., zaczęły ukazywać się prace, w których wykorzystywano glukozę jako źródło węgla i energii (7,8). Przedmiotem wnikliwych badań były zagadnienia związane: z wyjaśnieniem

Adres do korespondencji

Waldemar Rymowicz,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Norwida 25,
50-375 Wrocław;
e-mail:
rymowicz@ozi.ar.wroc.pl

mechanizmu nadprodukcji kwasu cytrynowego, wymaganiami pokarmowymi użytych szczepów drożdży, aktywnością podstawowych enzymów cyklu Krebsa odpowiedzialnych za wydzielanie kwasu do środowiska oraz oceną dynamiki procesu biosyntezy cytrynianu w hodowlach periodycznych, półciągłych i ciągłych z użyciem wolnych i unieruchomionych komórek (2,4,7,8). Niestety, naturalne szczepy drożdży z gatunku *Y. lipolytica* są zdolne utylizować tylko nieliczne cukry (glukoza, fruktoza). To praktycznie wyklucza możliwość stosowania w biosyntezie kwasu cytrynowego tradycyjnych surowców węglowodanowych m.in. sacharozy lub melasy. Dopiero szczepy uzyskane na drodze inżynierii genetycznej, posiadające gen inwertazy, były uzdolnione do biosyntezy kwasu cytrynowego z czystej sacharozy lub sacharozy zawartej w melasie buraczanej (9-11). Zastosowanie skojarzonych kultur drożdży, w których jeden szczep posiadał aktywność inwertazy, również umożliwiło zastosowanie sacharozy w takim procesie biosyntezy (12,13). Wyselekcjonowane mutanty *Y. lipolytica* uzdolnione były także do intensywnej produkcji tego kwasu w podłożach zawierających oleje roślinne oraz etanol (3,14,15).

W procesie produkcji biopaliw (biodiesla), produkcji estrów metylowych lub etylowych wyższych kwasów tłuszczowych, produktem odpadowym jest frakcja glicerynowa, która zawiera do 50% glicerolu, resztę tej frakcji stanowią kwasy tłuszczowe, estry i mydła. Według prognoz, w najbliższych latach w Polsce produkowane będą biopaliwa, a odpadowa frakcja glicerynowa stanowić będzie od 10 do 20% zużytego rzepaku (16). Zagospodarowanie takiej ilości odpadów będzie nastęrczać wiele trudności. Otrzymywanie gliceryny bezwodnej lub kosmetycznej w procesie destylacji próżniowej jest energochłonne i kosztowne. Przetwarzanie gliceryny odpadowej w użyteczne produkty w procesach biotechnologicznych, znajduje się dopiero w fazie badań laboratoryjnych. Zastosowanie odpadowego glicerolu do produkcji kwasu cytrynowego przez drożdże *Y. lipolytica* jest zagadnieniem nowym i mało poznanym. Jedynie w badaniach Papanikolaou i wsp. (1) zastosowano odpadowy glicerol do produkcji kwasu cytrynowego przez wyselekcjonowany do takiego środowiska szczep *Y. lipolytica* LGAM S(7)1. Badania te były jednak przeprowadzone tylko w hodowlach wstrząsanych, w których otrzymywano do 35 gdm⁻³ kwasu cytrynowego. Glicerol jest natomiast powszechnie stosowany jako źródło węgla w procesie biosyntezy propano-1,3-diolu przez bakterie *Clostridium butyricum* (17-19).

Celem tej pracy jest ocena przydatności odpadowego glicerolu, powstałego przy produkcji estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych, do biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica* w hodowlach wgłębnych.

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizmy

W badaniach wykorzystano 10 szczepów drożdży z gatunku *Y. lipolytica*, w tym: 3 szczepy pochodzące z American Type Culture Collection; ATCC 20324, ATCC 20460, ATCC 8661; 2 szczepy z czeskiej kolekcji CCY; CCY-29-40, CCY 29-26-41 oraz 5 szczepów z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej we Wrocławiu; A-101, 1.22, 1.31, K1 i AWG-7. Szczepy drożdży przechowywano w temperaturze 4°C na skosach YM.

2.2. Substrat

Do biosyntezy kwasu cytrynowego wykorzystywano glicerol techniczny oraz glicerol odpadowy z instalacji pilotowej produkcji biopaliwa z oleju rzepakowego (produkcja estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zawartość glicerolu w otrzymanej frakcji glicerynowej wynosiła około 45% (w/w), resztę frakcji stanowiły kwasy tłuszczowe oraz estry etylowe i mydła. Glicerol z frakcji glicerynowej ekstrahowano za pomocą wody. Po rozdzieleniu się fazy tłuszczowej i wodnej, stężenie glicerolu odpadowego w fazie wodnej wynosiło około 250 gdm⁻³.

2.3. Techniki hodowlane

W pierwszym etapie badań, uzdolnienia drożdży z gatunku *Y. lipolytica* do biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu sprawdzano w hodowlach wstrząsanych stosując podłoże z glicerolem technicznym i glicerolem odpadowym. Skład tego podłoża przedstawiono w tabeli 1. Hodowlę prowadzono na wstrząsarce typu G10 firmy New Brunswick, przy obrotach 160 rpm (ilość obrotów min⁻¹), w temperaturze 30°C przez 7 dni. Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach dla każdego szczepu drożdży. Szczepy, które produkowały najwyższe ilości kwasu cytrynowego w hodowlach wstrząsanych, zostały wybrane do dalszych badań, które prowadzono w bioreaktorze z mieszadłem.

Tabela 1

Skład i przeznaczenie podłoży

Nazwa	Skład	Zastosowanie
bulion YMG	glicerol techniczny – 40 g, ekstrakt drożdżowy – 3 g, ekstrakt słodowy 3 g, pepton – 5 g, woda destylowana – 1 dm ³	hodowle inokulacyjne dla procesów prowadzonych w bioreaktorze
agar YM	glukoza – 10 g, ekstrakt drożdżowy – 3 g, ekstrakt słodowy 3 g, pepton – 5 g, agar – 20 g, woda destylowana – 1 dm ³	przechowywanie drożdży na skosach
podłoże SK	glicerol techniczny – 100 g; KH ₂ PO ₄ – 0,2 g; NH ₄ Cl – 1,0 g; MgSO ₄ ×H ₂ O – 1,0 g; ekstrakt drożdżowy – 1,0 g; CaCO ₃ – 16,5 g; woda wodociągowa – 1 dm ³	dobór szczepów drożdży do biosyntezy CA – hodowle na wstrząsarce
podłoże PO	glicerol techniczny lub glicerol odpadowy – 110 g; NH ₄ Cl – 3,0 g; KH ₂ PO ₄ – 0,2 g; MgSO ₄ ×H ₂ O – 1,0 g; ekstrakt drożdżowy – 1,0 g; woda wodociągowa – 1 dm ³	biosynteza CA – hodowle okresowe w bioreaktorze
podłoże PZ	glicerol odpadowy 110 g, glicerol techniczny 90 g; NH ₄ Cl – 3,0 g; KH ₂ PO ₄ – 0,2 g; MgSO ₄ ×H ₂ O – 1,0 g; ekstrakt drożdżowy – 1,0 g; woda wodociągowa – 1 dm ³	biosynteza CA – hodowla okresowa z zasilaniem w bioreaktorze

2.4. Hodowle inokulacyjne

Szczepionkę drożdży namnażano w podłożu inokulacyjnym o składzie podanym w tabeli 1. Hodowlę prowadzono w 250 cm³ kolbach Erlenmayera zawierającym 50 cm³ podłoża inokulacyjnego na wstrząsarce typu G-10 (New Brunswick) przy szybkości obrotowej 160 rpm, w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Tak przygotowanym inokulum szczepiono podłoża produkcyjne. Inokulum stanowiło każdorazowo 5% (v/v) podłoża produkcyjnego.

2.5. Hodowle produkcyjne

Biosyntezę kwasu cytrynowego prowadzono w 3-litrowym bioreaktorze typu Bioflo III (New Brunswick) zawierającym 1,2 dm³ podłoża produkcyjnego, w temperaturze 30°C, przy szybkości przepływu powietrza 0,2 vvm (dm³ powietrza/ dm³ podłoża min), szybkości obrotowej mieszadła 500 rpm. W czasie hodowli pH 5,5 utrzymywano automatycznie za pomocą 30% NaOH.

2.6. Metody analityczne

Biomasę oznaczano wagowo. Kwas cytrynowy oraz glicerol oznaczano techniką HPLC na kolumnie Aminex HPX 87H połączonej z detektorem UV przy długości fali 210 nm oraz z detektorem RI w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu fazy ciekłej, 20 mM H₂SO₄, przez kolumnę wynosiła 0,6 cm³min⁻¹. Kwas

izocytrynowy oznaczano metodą enzymatyczną przy udziale dehydrogenazy izocytrynianowej.

3. Omówienie wyników i dyskusja

3.1 Skryning szczepów *Y. lipolytica* do biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu

W pierwszym etapie badań oceniano zdolność 10 szczepów drożdży, przedstawicieli gatunku *Y. lipolytica*, do wzrostu i biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu technicznego oraz odpadowego w 5-dobowych hodowlach wstrząsanych.

W hodowlach prowadzonych w podłożach zawierających glicerol techniczny, wszystkie szczepy produkowały kwas cytrynowy (tab. 2). Stężenie kwasu na końcu hodowli wynosiło od 6,2 do 22,1 gdm⁻³. Najwięcej kwasu cytrynowego produkowały szczepy ATCC 20460 i CCY 29-26-41, odpowiednio 22,1 i 21,0 gdm⁻³. Wszystkie testowane szczepy drożdży produkowały również kwas izocytrynowy (ICA), którego stężenie w zależności od użytego szczepu *Y. lipolytica* było w zakresie od 0,3 do 4 gdm⁻³. Proces biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu technicznego z udziałem szczepu K1 charakteryzował się najwyższą czystością, a udział kwasu cytrynowego w sumie kwasów cytrynowych wynosił aż 98,5%. Użyte szczepy *Y. lipolytica* produkowały kwas cytrynowy z glicerolu z różną szybkością i wydajnością, które były na niskim poziomie i wynosiły odpowiednio; $Q_{CA} = 0,07-0,13 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$, $Y_{CA} = 0,06-0,20 \text{ gg}^{-1}$.

Tabela 2

Wzrost i produkcja kwasu cytrynowego przez różne szczepy *Y. lipolytica* na glicerolu technicznym w 7-dobowych hodowlach wstrząsanych

Szczepy	X [gdm ⁻³]	CA [gdm ⁻³]	ICA [gdm ⁻³]	100 CA/ (CA+ICA) [%]	Q _{CA} [gdm ⁻³ h ⁻¹]	Y _{CA} [gg ⁻¹]
ATCC 20324	4,1	19,8	1,5	93,0	0,12	0,18
ATCC 20460	5,3	22,1	1,4	94,0	0,13	0,20
ATCC 8661	4,9	19,3	1,9	91,0	0,12	0,18
CCY-29-26-40	4,4	6,2	4,0	60,8	0,04	0,06
CCY 29-26-41	4,4	21,0	1,3	94,2	0,13	0,19
A-101	4,8	18,2	2,9	86,3	0,11	0,17
1.22	6,3	6,2	1,1	84,9	0,04	0,06
1.31	5,1	16,0	0,7	95,8	0,10	0,15
K1	4,9	19,5	0,3	98,5	0,12	0,18
AWG-7	4,7	11,0	0,7	94,0	0,07	0,10

X – biomasa, CA – kwas cytrynowy, ICA – kwas izocytrynowy; Q_{CA} – szybkość produkcji kwasu cytrynowego; Y_{CA} – wydajność kwasu cytrynowego (g wytworzonego CA/ g zużytego substratu)

W hodowlach wstrząsanych, w których zastosowano glicerol odpadowy, wszystkie szczepy *Y. lipolytica* produkowały 2-krotnie więcej biomasy ($10,1-14,4 \text{ gdm}^{-3}$) w porównaniu do hodowli z glicerolem technicznym (tab. 3). Frakcja glicerynowa zawiera niewielkie ilości białek i peptydów, które przy ekstrakcji glicerolu wodą są obecne w glicerolu odpadowym. Związki te są dodatkowym źródłem azotu dla drożdży. W hodowlach z glicerolem odpadowym badane szczepy drożdży produkowały również wyższe ilości kwasu cytrynowego od $9,3$ do $40,6 \text{ gdm}^{-3}$ (tab. 3). Najlepsze uzdolnienia kwasotwórcze wykazał szczep ATCC 20324 oraz ATCC 20460, które wytwarzały odpowiednio $40,6$ i $40,3 \text{ gdm}^{-3}$ kwasu cytrynowego. Selektywność fermentacji z udziałem tych szczepów była wysoka i wynosiła około 93%. Szczepy te produkowały odpowiednio: $3,3$ i $2,7 \text{ gdm}^{-3}$ kwasu izocytrynowego. Spośród badanych szczepów drożdży, szczep K1 charakteryzował się najwyższą selektywnością fermentacji 97,8%. Produkował jednak prawie 2-krotnie mniej kwasu cytrynowego ($22,6 \text{ gdm}^{-3}$) aniżeli szczepy z kolekcji ATCC. W hodowlach wstrząsanych uzyskano dobrą dynamikę produkcji kwasu, która dla szczepów ATCC 20324 i ATCC 20460 była rzędu $0,24 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$. W przedstawionych przez Papanikolaou i wsp. (1) badaniach szczep *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 produkował w podłożach zawierających, $80-120 \text{ gdm}^{-3}$ odpadowego glicerolu, do $35 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$ kwasu cytrynowego, z wydajnością rzędu $0,42-0,44 \text{ gg}^{-1}$. Szczep ten produkował również niewielkie ilości ubocznych kwasów takich jak kwas octowy, izocytrynowy i α -ketoglutazarowy.

Tabela 3

Wzrost i produkcja kwasu cytrynowego przez różne szczepy *Y. lipolytica* na glicerolu odpadowym w 7-dobowych hodowlach wstrząsanych

Szczepy	X [gdm ⁻³]	CA [gdm ⁻³]	ICA [gdm ⁻³]	100 CA/ (CA+ICA) [%]	Q _{CA} [gdm ⁻³ h ⁻¹]	Y _{CA} [gg ⁻¹]
ATCC 20324	13,5	40,6	3,3	92,5	0,24	0,37
ATCC 20460	13,8	40,3	2,7	93,7	0,24	0,37
ATCC 8661	13,7	37,3	3,5	91,4	0,22	0,34
CCY-29-26-40	10,6	9,3	3,0	75,6	0,06	0,08
CCY 29-26-41	10,6	35,8	3,1	92,0	0,21	0,33
A-101	13,8	32,8	6,0	84,5	0,2	0,30
1.22	12,9	11,3	1,8	86,3	0,07	0,10
1.31	14,4	18,7	0,9	95,4	0,11	0,17
K1	10,1	22,6	0,5	97,8	0,14	0,21
AWG-7	14,4	9,9	0,6	94,3	0,06	0,09

Oznaczenia jak w tabeli 2

Na podstawie przeprowadzonych hodowli wstrząsanych do dalszego etapu badań wytypowano 4 szczepy: 1.31, K1, ATCC 20460 i AWG-7, które w hodowlach z glicerolem technicznym i odpadowym produkowały kwas cytrynowy z dużą selek-

tywnością (powyżej 93%). Ocenę kinetyczną procesów biosyntezy kwasu cytrynowego przeprowadzono w hodowlach wglębnych w bioreaktorze, które zapewniają lepszą kontrolę najważniejszych parametrów hodowlanych takich jak temperatura, natlenienie czy pH w czasie całego procesu biosyntezy.

3.2. Biosynteza kwasu cytrynowego z glicerolu w hodowlach wglębnych w bioreaktorze

W tabeli 4 pokazano charakterystykę procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu technicznego i odpadowego przez wybrane szczepy *Y. lipolytica*. Stężenie glicerolu w podłożu produkcyjnym wynosiło 110 gdm^{-3} . W hodowlach wglębnych w bioreaktorze uzyskano zwiększenie szybkości produkcji kwasu cytrynowego jak i wydajności procesu, w porównaniu do hodowli prowadzonych na wstrząsarce. W procesach z glicerolem technicznym, najwięcej kwasu nagromadzały szczepy 1.31 i K1, odpowiednio: $59,0$ i $44,6 \text{ gdm}^{-3}$. Ponadto, drożdże te produkowały małe ilości kwasu izocytrynowego, odpowiednio: $5,6$ i $5,2 \text{ gdm}^{-3}$, co miało wpływ na wysoką selektywność procesu fermentacji około 91%. Biosynteza kwasu cytrynowego z glicerolu technicznego z udziałem tych szczepów charakteryzowała się najwyższą objętościową szybkością produkcji ($1,13$ i $0,98 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$) i wydajnością kwasu ($0,54$ i $0,40 \text{ gg}^{-1}$). Wartości tych parametrów były zbliżone do wartości uzyskanych przez innych autorów w hodowlach na glukozy (2,7,20). W badaniach Papanikolaou i wsp. (1), objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu była znacznie niższa i wynosiła $0,15 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$. W hodowlach na glicerolu odpadowym trzy szczepy: ATCC 20460, 1.31 i K1 produkowały ponad 50 gdm^{-3} kwasu. Szczep ATCC 20460 produkował jednak znaczne ilości kwasu izocytrynowego ($15,5 \text{ gdm}^{-3}$), co wpływało na obniżenie selektywności fermentacji do 78%. Spośród badanych szczepów *Y. lipolytica*, szczep 1.31 odznaczał się najwyższą selektywnością fermentacji, około 94%. Wykorzystywane przez Anastassiadis i wsp. (2) szczepy produkcyjne *Candida lipolytica* DSM 3286 oraz *Candida oleophila* ATCC 20177 produkowały kwas cytrynowy z glukozy z selektywnością odpowiednio: 95,5 i 96,5%.

Tabela 4

Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez różne szczepy *Y. lipolytica* w hodowlach wglębnych w bioreaktorze

Szczep <i>Y. lipolytica</i>	X [gdm^{-3}]	CA [gdm^{-3}]	ICA [gdm^{-3}]	100 CA/ (CA+ICA) [%]	Q_{CA} [$\text{gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$]	Y_{CA} [gg^{-1}]
1	2	3	4	5	6	7
glicerol techniczny						
ATCC 20460	23,0	28,0	10,6	72,5	0,52	0,34
1.31	14,1	59,0	5,6	91,3	1,13	0,54

1	2	3	4	5	6	7
K1	18,9	44,6	5,2	89,6	0,98	0,40
AWG-7	19,1	40,2	2,2	94,8	0,64	0,38
glicerol odpadowy						
ATCC 20460	21,4	55,0	15,5	78,0	1,12	0,50
1.31	13,8	59,3	4,0	93,7	0,90	0,59
K1	21,3	50,0	5,8	89,6	0,85	0,47
AWG-7	21,6	18,4	2,8	86,8	0,88	0,44

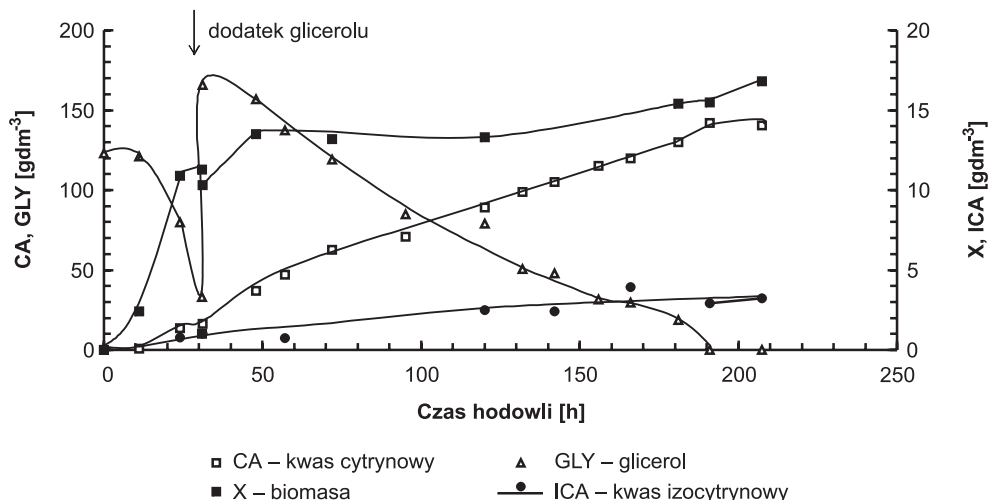
Oznaczenia jak w tabeli 2

Do dalszych badań wybrano szczep 1.31, który w hodowlach na glicerolu technicznym i odpadowym produkował najwyższe ilości kwasu cytrynowego, a proces biosyntezy z udziałem tego szczepu charakteryzował się najwyższą selektywnością.

3.3. Biosynteza kwasu cytrynowego w hodowli periodycznej zasilanej

W ostatnim etapie pracy przeprowadzono produkcję kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* 1.31. Stężenie glicerolu w podłożu produkcyjnym zwiększono do 200 gdm⁻³, co spowodowało zwiększenie stosunku molarnego C:N. Stężenie początkowe glicerolu wynosiło 120 gdm⁻³, a pozostałą ilość glicerolu dodano w 30 h hodowli (rys.). Dodatek glicerolu, spowodował przyrost biomasy komórkowej drożdży z 12 do 15,5 gdm⁻³, co potwierdza obecność pierwiastków biogennych (azotu i fosforu) w takim środowisku. W hodowli periodycznej zasilanej z udziałem szczepu *Y. lipolytica* 1.31, można wyróżnić dwie fazy produkcji kwasu, różniące się szybkością produkcji kwasu cytrynowego. W pierwszym okresie, pomiędzy 31 a 100 h hodowli, stwierdzono najwyższą szybkość produkcji kwasu cytrynowego (0,86 gdm⁻³h⁻¹). W dalszej części procesu, pomiędzy 100 a 142 h hodowli, szybkość tworzenia kwasu cytrynowego obniżyła się do 0,6 gdm⁻³h⁻¹. Podobny przebieg zmian dynamiki produkcji kwasu cytrynowego z glukozy przez różne szczepy *Y. lipolytica*, stwierdzali także inni autorzy (8,21). W wyniku zastosowania procesu ze zwiększonym stężeniem substratu uzyskano 144,5 gdm⁻³ kwasu cytrynowego i 4 gdm⁻³ kwasu izocytrynowego, a selektywność fermentacji była powyżej 97%. Wydajność kwasu cytrynowego z glicerolu była wysoka i wynosiła 0,72 gg⁻¹.

Reasumując można stwierdzić, że odpadowy glicerol jest dobrym substratem do biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica*, umożliwia produkcję dużych ilości kwasu, z wysoką wydajnością. Niezbędne są jednak dalsze badania w celu poprawienia produktywności i wydajności procesu biosyntezy.



Rys. Przebieg procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez drożdże *Y. lipolytica* 1.31 w hodowli periodycznej zasilanej.

Literatura

- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I. J., (2002), *Appl. Microbiol.*, 92, 737-744.
- Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 81-87.
- Arzumanow T. E., Shishkanowa N. V., Finogenowa T. V., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 525-529.
- Kautola H., Rymowicz W., Linko Y.Y., Linko P., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 447-449.
- Akiyama S., Suzuki T., Sumino Y., Nakao Y., Fukuda H., (1972), *Agric. Biol. Chem.*, 36, 339-344.
- Crolla A., Kennedy K.J., (2001), *J. Biotechnol.*, 26, 27-40.
- Antonucci S., Bravi M., Bubbico R., Di Michele A., Verdone N., (2001), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 18, 189-195.
- Enzminger J. D., Asejko J. A., (1986), *Biotechnol. Lett.*, 8, 7-12.
- Kautola H., Rymowicz W., Linko Y. Y., Linko P., (1992), *Sciences Alimen.*, 12, 383-392.
- Mansfeld J., Forster M., Hoffmann T., Schellenberger A., (1995), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 17, 11-17.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., Żarowska B., Nicaud J. M., (1997), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 6, 47, 49-54.
- Żarowska B., Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., (2001), *EJPAU, Series Biotechnology*, 4, 2.
- Pazouki M., Felse P.A., Sinha J., Panda T., (2000), *Bioprocess Eng.*, 22, 353-361.
- Finogenova T. V., Kamzolova S. V., Dedyukhina E. G., Shishkanova N. V., Ilchenko A. P., Morgunov I. G., Chernyavskaya O. G., Sokolov A. P., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 493-500.
- Wojtatowicz M., (1991), *Zesz. Nauk. AR Wroc., rozpr. hab.* 96.
- Fakty i mity o paliwach, (2004), Konferencja naukowo-techniczna, Materiały konferencyjne, Wrocław (17 listopad).
- Biebl H., Marten S., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 15-19.
- Biebl H., Marten S., Hippe H., Decker W.D., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 592-597.
- Petitdemange E., Durr C., Abbad-Andaloussi S., Raval G., (1995), *J. Ind. Microbiol.*, 15, 498-502.
- Rane K.D., Sims K.A., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 646-651.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Kautola H., (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31, 165-174.