



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

Waldemar Rymowicz, Piotr Juszczuk, 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 umożliwiała 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 wglębnych.

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

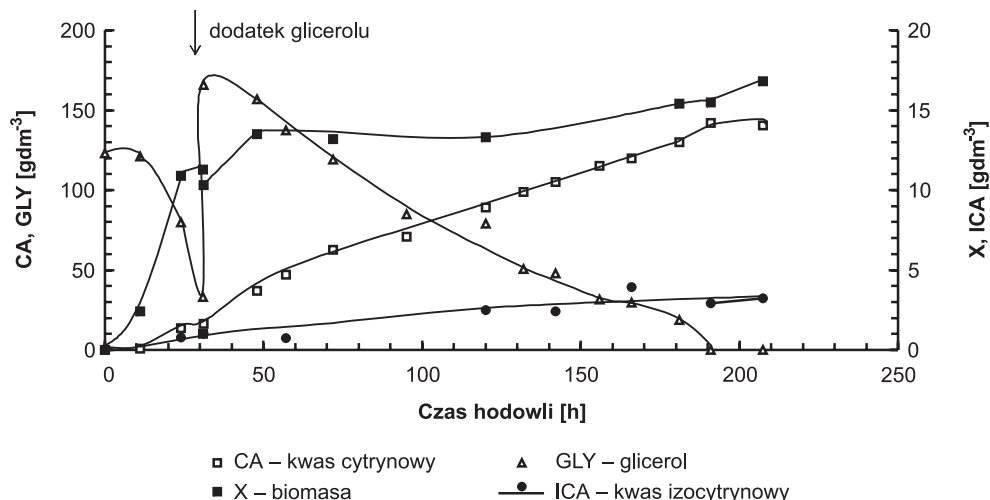
Oznaczenia jak w tabeli 2

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 $15,5 \text{ gdm}^{-3}$, 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 ($0,86 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$). W dalszej części procesu, pomiędzy 100 a 142 h hodowli, szybkość tworzenia kwasu cytrynowego obniżyła się do $0,6 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$. 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 $144,5 \text{ gdm}^{-3}$ kwasu cytrynowego i 4 gdm^{-3} kwasu izocytrynowego, a selektywność fermentacji była powyżej 97%. Wydajność kwasu cytrynowego z glicerolu była wysoka i wynosiła $0,72 \text{ gg}^{-1}$.

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.