

Anita RYWIŃSKA, Marcelina PATERNOGA, Ludwika TOMASZEWSKA-HETMAN, Krzysztof CYBULSKI, Magdalena RAKICKA, Piotr JUSZCZYK, Waldemar RYMOWICZ

e-mail: anita.rywinska@up.wroc.pl

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław

Wpływ wybranych źródeł azotu na przebieg procesu biosyntezy erytrytoli przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania wykorzystaniem glicerolu w procesach mikrobiologicznych. Szczególnie dużo uwagi poświęcono biosyntezie użytecznych przemysłowo związków, takich jak: 1,3-propanodiol [Kośmider i Czaczyk 2009], dihydroksyaceton [Claret i in., 1994], kwas cytrynowy [Papanikolaou i in., 2002; Rywińska i in., 2008], bursztynowy [Lee i in., 2001], propionowy [Kośmider i Czaczyk 2009], dokozaheksaenowy [Chi i in., 2007], wodór i etanol [Ito i in., 2005], SCO [Papanikolaou i in., 2008], a także erytrytol [Rymowicz i in., 2009].

Ze względów ekonomicznych, w procesie przemysłowym używa się wyłącznie wyselekcjonowanych szczepów osmofilnych drożdży [Jeya i in., 2009]. Ostatnie badania autorów tego opracowania wskazują, że na szczególną uwagę zasługują drożdże *Yarrowia lipolytica*, m.in. ze względu na fakt, iż posiadają zdolność do wytwarzania erytrytoli z glicerolu – surowca będącego niepożądanym produktem ubocznym w przemyśle petrochemicznym [Rywińska i in., 2013]. Rosnące zainteresowanie konsumentów bezpiecznymi i niskokalorycznymi substytutami cukru, takimi jak erytrytol, powoduje, że aktualne są badania mające na celu doskonalenie procesu jego produkcji, tym bardziej, że związek ten jako jedyny polioli jest produkowany komercyjnie tylko w procesie biotechnologicznym [O'Donnell i Kearsley, 2012].

Celem pracy była ocena wpływu źródła azotu na aktywność enzymów zaangażowanych w proces biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*.

Materiały i metody

Mikroorganizm. W badaniach wykorzystano szczepy drożdży *Yarrowia lipolytica*: Wratislavia K1, CCY 29-26-5, A-15, A-10, AUV'1. Szczep Wratislavia K1 jest mutantem octanowym (oct') [Rywińska i in., 2012], AUV'1 został otrzymany w szczepie dzikim *Y. lipolytica* ATCC 8661 w wyniku działania promieniowania UV, A-15, A-10 to szczepy dzikie pochodzące z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, natomiast CCY 29-26-5 to szczep naturalny z Czeskiej Kolekcji Drożdży (Czechoslovak Collection of Yeasts). Wszystkie szczepy przechowywano na skosach YM, w temperaturze 4° C.

Podłoże. Jako substratu używano w pracy glicerolu technicznego (czystego) pochodzącego z POCh, Gliwice o czystości 98% (v/w).

Podłoże inokulacyjne miało skład [g·dm⁻³]: glicerol – 50,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; bactopecton – 5,0; woda destylowana do 1 dm³. Podłoże do doboru stężenia NaCl o pH 3,0 zawierało [g·dm⁻³]: glicerol kosmetyczny – 100; (NH₄)₂SO₄ – 2,5; MgSO₄ · 7H₂O – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; ekstrakt drożdżowy – 1,0; CaCO₃ – 3; NaCl – 0 – 100; woda destylowana do 1 dm³. Podłoże do badania wpływu źródła azotu na nadprodukcję erytrytoli, przy optymalnym dla danego szczepu stężeniu NaCl, miało skład j/w, przy czym jako źródło azotu stosowano zamiennie [g·dm⁻³]: (NH₄)₂SO₄ – 2,5; NH₄Cl – 2,03; ekstrakt drożdżowy – 5,31; namok kukurydziany – 7,08; pepton – 3,52; trypton – 3,94. Podłoże produkcyjne w hodowlach bioreaktorowych miało skład [g·dm⁻³]: glicerol kosmetyczny – 150,0; źródło azotu – zamiennie: (NH₄)₂SO₄ – 2,5; NH₄Cl – 2,03; ekstrakt drożdżowy – 5,31; pepton 3,52; MgSO₄ · 7H₂O – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; ekstrakt drożdżowy – 1,0; NaCl – 32,5; woda wodociągowa – do 1 dm³.

Warunki prowadzenia hodowli. Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Niemcy) w 300 cm³ kolbach Erlenmayera zawierających 100 cm³ podłoża inokulacyjnego w temperaturze 29,5°C przez 3 dni, przy szybkości obrotów 140 rpm. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano 200 cm³ hodowli inokulacyjnej.

Hodowle produkcyjne wstrząsane prowadzono na wstrząsarce jw. w 300 cm³ kolbach stożkowych zawierających 30 cm³ podłoża produkcyjnego, przez 7 dni. Hodowle szczepiono 1 cm³ hodowli inokulacyjnej. Próby do analiz pobierano po zakończeniu hodowli. Procedura zakończenia hodowli obejmowała pomiar pH, dodanie 1 cm³ HCl (1:1) oraz uzupełnienie hodowli wodą do objętości równej 30 cm³.

Hodowle produkcyjne bioreaktorowe prowadzono w 5 dm³ bioreaktorze Biostat B Plus (Sartorius, Niemcy) przy objętości roboczej równej 2 dm³, w temperaturze 30°C, przy prędkości obrotów mieszadeł (o regulowanej wysokości) 800 rpm i szybkości przepływu powietrza 0,6 vvm. W czasie procesu pH 3,0 (optymalne dla procesu produkcji erytrytoli) było utrzymywane na stałym poziomie przez automatyczne dozowanie 20% roztworu NaOH. Próby do oznaczeń pobierano 2 razy dziennie, próby do oznaczeń enzymatycznych pobierano po około 24 i 72 h.

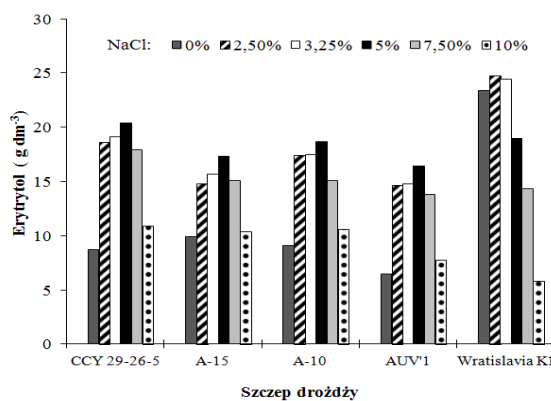
Metody analityczne. Biomasa, stężenie glicerolu, erytrytoli oraz produktów ubocznych oznaczano zgodnie z metodyką opisaną w pracy Rywińskiej i in. [2012]. Oznaczenia aktywności kinazy glicerolu (GK), dehydrogenazy 3-fosfoglicerolu (GPDH), transketolazy (TK) oraz reduktazy erytrozy (ER) wykonano zgodnie z metodyką opisaną w pracy Tomaszewskiej i in., [2014].

Wyniki i dyskusja

Wpływ stężenia NaCl, w zakresie 0÷10%, na biosyntezę erytrytoli z glicerolu kosmetycznego przez różne szczepy drożdży *Y. lipolytica* zbadano w 7 dobowych hodowlach wstrząsanych (Rys. 1).

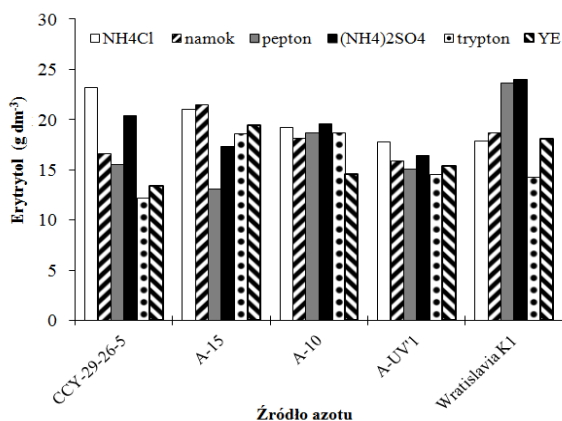
Spośród badanych szczepów najwięcej erytrytoli produkowały cztery z nich przy stężeniu soli wynoszącym 5%, natomiast szczep drożdży Wratislavia K1 najwięcej tego związku (24,8 g·dm⁻³) produkował przy stężeniu NaCl niższym o połowę.

Jednak wydajność produkcji erytrytoli w tych warunkach w przypadku szczepu Wratislavia K1 była najwyższa (0,31 g·g⁻¹) przy stężeniu soli wynoszącym 3,25% (dane nieprezentowane).



Rys. 1. Wpływ stężenia chlorku sodu na produkcję erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica*

Wpływ źródła azotu na zdolność szczepów do produkcji erytrytoli oceniono przy optymalnym dla danego szczepu stężeniu NaCl: 3,25% dla *Wratislavia K1* oraz 5% dla pozostałych drożdży. Testowano sześć źródeł azotu: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, namok kukurydziany, pepton, trypton oraz ekstrakt drożdżowy. Stężenie azotu we wszystkich podłożach było takie samo i wynosiło $0,53 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Celem eksperymentu był wybór szczepu o wysokiej i jednocześnie zróżnicowanej w zależności od źródła azotu zdolności do produkcji erytrytoli. Niezależnie od zastosowanego źródła azotu wszystkie szczepy produkowały erytrytol, w ilości od $12,2$ do $24,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Rys. 2).



Rys. 2. Wpływ źródła azotu na biosyntezę erytrytoli przy optymalnym dla danego szczepu stężeniu NaCl

Najmniejsze zróżnicowanie ilości produktu stwierdzono w hodowlach, w których wykorzystano NH_4Cl , natomiast największe z peptonem. W hodowlach z udziałem szczepów AUV1 oraz A-10 ilość produktu była zbliżona i mieściła się w granicach od $14,6$ do $19,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Szczepy CYY 29-26-5 oraz *Wratislavia K1* wykazywały największe zróżnicowanie w produkcji erytrytoli, najmniejszą ilość erytrytoli uzyskano w podłożu z tryptonem – odpowiednio $12,2$ i $14,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, natomiast największą w podłożu z NH_4Cl , $23,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $24,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ – odpowiednio dla szczepu CYY 29-26-5 oraz *Wratislavia K1*.

Ze względu na większe zdolności produkcyjne oraz wyższą wydajność produkcji erytrytoli do dalszych badań wybrano szczep *Wratislavia K1*, dla którego w hodowlach bioreaktorowych zbadano przebieg procesu okresowej biosyntezy erytrytoli z glicerolu w podłożach zawierających różne źródła azotu. Testowano po dwa źródła azotu organicznego – pepton i ekstrakt drożdżowy oraz nieorganicznego – chlorek amonu i siarczan amonu. Podobnie jak w przypadku hodowli wstrząsanych, stężenie azotu we wszystkich podłożach wynosiło $0,53 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, natomiast chlorku sodu $32,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wszystkie procesy hodowlane prowadzono do całkowitego wyczerpania źródła węgla, a wyniki zestawiono w tab. 1.

W procesach, w których zastosowano organiczne źródła azotu, uzyskano wyższe stężenie erytrytoli, $96,3$ i $88 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, niż w hodowlach z nieorganicznym źródłem tego pierwiastka. W podobnym eksperymencie, jednak przy niższym stężeniu chlorku sodu wynoszącym $2,5\%$, szczep *Wratislavia K1* w zależności od zastosowanego źródła azotu (przy stężeniu $0,53 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) produkował od $77,9$ do $85 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ erytrytoli [Tomaszewska i in., 2014]. Selektywność procesu produkcji erytrytoli była bardzo wysoka, od $95,3$ do $99,8\%$, co oznacza, że sumaryczny udział produktów ubocznych (w tym kwasów organicznych takich jak cytrynowy, pirogronowy i α -ketoglutarynowy) nie przekraczał $4,7\%$.

W prezentowanej pracy najwyższą wydajność produkcji erytrytoli, $0,63 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, uzyskano w podłożu z peptonem, natomiast szybkość objętościowa była zdecydowanie najwyższa, $1,17 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, w hodowli z ekstraktem drożdżowym. W pracy Tomaszewskiej i in., [2014] zarówno wydajność, jak i szybkość objętościowa produkcji erytrytoli była najwyższa w hodowli z ekstraktem drożdżowym. Hattori i Suzuki [1974] badali wpływ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , polipeptonu oraz ekstraktu drożdżowego na biosyntezę erytrytoli z n-alkanów.

Tab.1 Porównanie parametrów procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* *Wratislavia K1* w podłożach zawierających różne źródła azotu

Parametr \ Źródło azotu	Organiczne		Nieorganiczne	
	pepton	ekstrakt drożdżowy	siarczan amonu	chlorek amonu
Zużycie glicerolu [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	153,9	152,8	150,8	149,4
Czas trwania procesu [h]	126	75	96	99
Biomasa [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	9,8	18,6	14,4	13,6
Erytrytol [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	96,3	88,0	78,7	84,7
Wydajność produkcji erytrytoli; Y [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]	0,63	0,58	0,52	0,57
Szybkość objętościowa produkcji erytrytoli; Q [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$]	0,76	1,17	0,82	0,86
Szybkość właściwa produkcji erytrytoli; q [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	0,078	0,063	0,057	0,063
Selektywność procesu produkcji; S [%]	98,5	99,8	95,3	97,7
NaCl; [%]	3,25	3,25	3,25	3,25
Początkowe ciśnienie osmotyczne w hodowli [MPa]	7,50	7,65	7,41	7,33
Ciśnienie osmotyczne w hodowli po 24 h [MPa]	6,80	7,08	7,15	7,26
Ciśnienie osmotyczne w hodowli po 72 h [MPa]	4,97	5,03	6,25	5,52
Końcowe ciśnienie osmotyczne w hodowli [MPa]	4,41	4,83	4,86	4,76

przez *Candida zeylanoides* i również najlepsze rezultaty uzyskali w procesie, w którym zastosowano ekstrakt drożdżowy.

W pracy Savergave i in. [2011] wśród 11 testowanych organicznych źródeł azotu najwyższe stężenie erytrytoli także uzyskano w podłożu z ekstraktem drożdżowym. Burschapers i in. [2002] uznali ekstrakt drożdżowy za najlepsze źródło azotu w procesie biosyntezy erytrytoli przez *Moniliella tomentosa* var *pollinis*. W porównaniu z mocznikiem, namokiem kukurydzianym i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, proces z ekstraktem drożdżowym cechował się najwyższym stężeniem biomasy, najwyższą wydajnością produkcji erytrytoli oraz brakiem problemów z pienieniem. W procesie prowadzonym przy udziale szczepu *Wratislavia K1* najwyższe stężenie biomasy otrzymano również w podłożu z ekstraktem drożdżowym (Tab. 1). Podobne wyniki otrzymali w swojej pracy Jeya i in. [2009]. Wśród wielu testowanych organicznych źródeł azotu najwyższym stężeniem biomasy ($13,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz najwyższą szybkością objętościową produkcji erytrytoli ($1,49 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) cechowała się hodowla z ekstraktem drożdżowym. W podłożu z peptonem, podobnie jak w niniejszej pracy, Autorzy uzyskali najniższą szybkością objętościową produkcji erytrytoli ($0,56 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) oraz najniższe stężenie biomasy ($6,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Z drugiej strony w badaniach Koh i in. [2000] stwierdzono, że rodzaj zastosowanego źródła azotu wpływa jedynie na poziom biomasy drożdży *Candida magnoliae* M26, natomiast nie powoduje istotnych zmian w produkcji erytrytoli.

W próbach biomasy pobieranych z hodowli w około 24 h (faza wzrostu komórek) oraz w około 72 h (faza stacjonarna) oznaczono zawartość białka oraz wewnątrzkomórkową aktywność enzymów odpowiedzialnych za asymilację glicerolu, czyli GK oraz GPDH, a także enzymów szlaku penozofosforanowego, TK i ER (Tab. 2).

GK to enzym przekształcający glicerol do glicerolo-3-fosforanu, który jest przekształcany przez GPDH do fosfodihydroksyacetonu. Aktywność obu enzymów mieściła się w zakresie od $0,003$ do $0,026 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka. Aktywność GK, w hodowlach z peptonem, siarczanem i chlorkiem amonu, była niższa w fazie wzrostu o około 50% niż w fazie stacjonarnej. Poziom aktywności GPDH w fazie wzrostu był bardzo niski, co było zapewne związane z niskim stężeniem substratu dla tego enzymu, czyli glicerolo-3-fosforanu, na tym etapie hodowli.

Nieco inną zależność dla obu enzymów stwierdzono w hodowli z ekstraktem drożdżowym, w której aktywności obu enzymów były wyższe w fazie wzrostu niż w fazie stacjonarnej. Przebieg tej hodowli był nieco odmienny od pozostałych (dane nie prezentowane). - drożdże w tym procesie najszybciej osiągnęły fazę stacjonarną. Ponadto, w momencie pobierania prób do oznaczeń enzymatycznych, zarówno stężenie biomasy jak i erytrytolu było najwyższe w porównaniu do innych hodowli, a jak wykazano w przypadku drożdży *Candida mycoderma* [Eisenthal i in., 1974] oraz *Hansenula polymorpha* [de Koning i in., 1987] wysokie stężenie erytrytolu działa hamująco na GK.

Tab. 2. Aktywność właściwa kinazy glicerolu (GK), dehydrogenazy 3-fosfoglicerolu (GPDH), transketolazy (TK) oraz reduktazy erytrozy (ER) w komórkach drożdży *Y. lipolytica* Wratistawia K1 podczas biosyntezy erytrytolu w obecności różnych źródeł azotu

Źródło azotu	Faza wzrostu	Aktywność [$U \cdot mg^{-1}$ białka]			
		GK	GPDH	TK	ER
pepton	wzrost	0,011	0,008	0,030	0,055
	stacjonarna	0,023	0,026	0,041	0,086
YE	wzrost	0,018	0,020	0,083	0,119
	stacjonarna	0,012	0,016	0,029	0,077
$(NH_4)_2SO_4$	wzrost	0,011	0,006	0,065	0,151
	stacjonarna	0,021	0,018	0,049	0,147
NH_4Cl	wzrost	0,010	0,003	0,081	0,011
	stacjonarna	0,019	0,020	0,059	0,104

TK jest tiaminozależnym enzymem fazy nieoksydacyjnej szlaku pentozofosforanowego uczestniczącym we wzajemnych przekształceniach fosforanowych pochodnych cukrów, natomiast ER przekształca erytrozę (powstającą z erytozo-4-fosforanu) do erytrytolu. Nie stwierdzono istnienia wyraźnej zależności pomiędzy aktywnością TK i ER, a ilością produkowanego erytrytolu. Natomiast warto zauważyć, że tylko w hodowli z peptonem, w której uzyskano najwyższe stężenie końcowe erytrytolu, aktywność obu enzymów tego szlaku w fazie produkcji była wyższa niż w fazie wzrostu, co świadczy o dobrej aktywności produkcyjnej szczepu w tych warunkach. W pozostałych wariantach hodowlanych (za wyjątkiem aktywności ER w procesie z chlorkiem amonu) aktywność tych enzymów obniżała się w trakcie trwania procesu. Niższa aktywność ER w fazie stacjonarnej mogła być związana z obniżaniem się ciśnienia osmotycznego w hodowlach, co potwierdzają wyniki badań Park i in. [2011], którzy wykazali, że aktywność ER wzrastała w sposób niemal liniowy wraz ze wzrostem ciśnienia osmotycznego. Interesujący jest również fakt, iż najwyższe aktywności TK i ER oznaczono w hodowlach z siarczanem amonu, pomimo iż parametry produkcji erytrytolu w tej hodowli nie były najwyższe. Być może było to związane z wysokim ciśnieniem osmotycznym panującym w tych warunkach (Tab. 1).

Wnioski

Nie stwierdzono znaczącego wpływu źródła azotu na aktywność właściwą GK oraz GPDH, natomiast wysokie stężenie oraz wydajność produkcji erytrytolu korelowały z najwyższą aktywnością tych enzymów w hodowli z peptonem.

Wykazano, że zastosowane źródło azotu ma znaczący wpływ na aktywność TK oraz ER, natomiast nie wykazano istnienia wyraźnej zależności pomiędzy aktywnością tych enzymów a końcowym stężeniem erytrytolu.

Najwyższą wartość aktywności właściwej TK otrzymano w fazie wzrostu w procesie z ekstraktem drożdżowym oraz chlorkiem amonu, w których szybkość objętościowa produkcji erytrytolu była najwyższa. Najwyższą wartość ER oznaczono w hodowli z siarczanem amonu, w której parametry produkcji erytrytolu były najniższe. Różne aktywności ER i TK wskazują na współdziałanie tych enzymów w procesie biosyntezy erytrytolu z glicerolu przez badane drożdże.

LITERATURA

- Burschapers J., Schustolla D., Schugerl K., Roper H., De Troostembergh J.C. 2002. Engineering aspects of the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast *Moniliella tomentosa* var *pollinis*. Part I. Batch and fed-batch operation in stirred tank. *Process Biochem.*, **38**, 497-506. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00178-4
- Chi Z., Pyle D., Wen Z., Frear C., Chen S. 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.*, **42** nr 11, 1537-1545. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.08.008
- Claret C., Salmon, J.M., Romieu, C., Bories, A. 1994. Physiology of *Glucanobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41** nr 3, 359-365
- de Koning W., Harder W., Dijkhuizen L. 1987. Glycerol metabolism in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: phosphorylation as the initial step. *Arch. Microbiol.*, **148**, 314-320. DOI: 10.1007/BF00456710
- Eisenthal R., Harrison R., Lloyd W.J. 1974. Specificity of glycerol kinase. *Biochem. J.*, **141**, 305-307. PMID: PMC1168078
- Hattori K., Suzuki T. 1974. Production of erythritol by n-alkane-grown yeasts. *Agricult. Biol. Chem.*, **38** nr 3, 581-586. DOI: 10.1080/00021369.1974.10861205
- Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N. 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.*, **100** nr 3, 260-265. DOI: 10.1263/jbb.100.260
- Jeya M., Lee K.M., Tiwari M.K., Kim J.S., Gunasekaran P., Kim S.Y., Kim I.W., Lee J.K. 2009. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudomonas tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83** nr 2, 225-31. DOI: 10.1007/s00253-009-1871-5
- Kośmider A., Czaczyk K. 2009. Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol.*, **48** nr 4, 277-187
- Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N. 2001. Succinic acid production with reduced by product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon. *Biotechnol. Bioeng.*, **72** nr 1, 41-48. DOI: 10.1002/1097-0290(20010105)72:1<41::AID-BIT6>3.0.CO;2-N
- O'Donnell K., Kearsley M. 2012. *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. Wiley-Blackwell, 215-218
- Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M. 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenerg.*, **32**, 60-71. DOI:10.1016/j.biombioe.2007.06.007
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis A., Marc I. 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 737-744. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x
- Park E.H., Lee H.Y., Ryu Y.W., Seo J.H., Kim M.D. 2011. Role of osmotic and salt stress in the expression of erythrose reductase in *Candida magnoliae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21** nr 10, 1064-1068. DOI: 10.4014/jmb.1105.05029
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M. 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.*, **31**, 377-380. DOI: 10.1007/s10529-008-9884-1
- Rywińska A., Bąk M., Rakicka M., Tomaszewska L., Boruczowski T., Lazar Z., Rymowicz W. 2012. Selekcja UV mutantów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia*, **11** nr 3, 23-38
- Rywińska A., Juszczyk P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W. 2013. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenerg.*, **48**, 148-166. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.11.021
- Tomaszewska L., Rakicka M., Rymowicz W., Rywińska A. 2014. A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Res.*, **14**, 966-976. DOI: 10.1111/1567-1364.12184
- Savergave L.S., Gadre R.V., Vaidya B.K., Narayanan K. 2011. Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from *Candida magnoliae* mutant R23. *Bioche. Eng. J.*, **55**, 92-100. DOI: 10.1016/j.bej.2011.03.009

Badania realizowano w ramach grantu N N312256640 „Metabolizm glicerolu do erytrytolu w komórkach drożdży *Yarrowia lipolytica*” oraz projektu nr POIG.01.01.02-00-074/09 „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych”.