

Piotr JUSZCZYK, Magdalena RAKICKA, Anita RYWIŃSKA, Waldemar RYMOWICZ

e-mail: piotr.juszczuk@wnoz.up.wroc.pl

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

Ciągła biosynteza erytrytoli przez *Yarrowia lipolytica* w bioreaktorze membranowym

Wstęp

Erytrytol na skalę przemysłową produkowany jest z glukozy metodą biologiczną. Do biosyntezy tego alkoholu wielowodorotlenowego wykorzystuje się wiele osmofilnych gatunków grzybów i drożdży, takich jak: *Moniliella pollinis*, *Trichosporoinoides megachilensis*, *Trichosporon variabilis* [Kim i in., 1997], *Trichosporon sp.* [Park i in., 1998], *Torula sp.* [Kim i in., 2000], *Candida magnoliae* [Ryu i in., 2000] czy *Moniliella sp.* [Lin i in., 2001]. Mikroorganizmem wykorzystywanym w produkcji przemysłowej tego związku jest szczep *Trichosporoinoides megachilensis* SN-G42 (dawniej *Aureobasidium sp.* SN-G42) [Sawada i in., 2009], a substratem w tej biosyntezie jest glukoza lub sacharoza, których stężenie w podłożu dochodzi nawet do 400 g/L [Aoki i in., 1993; Moon i in., 2010]. Do biosyntezy erytrytoli próbowano zastosować także glicerol jako źródło węgla, ale produkcja erytrytoli z tego surowca nie była zadowalająca [Jeya i in., 2009]. Glicerol jako źródło węgla i energii został natomiast z powodzeniem wykorzystany do jednoczesnej biosyntezy erytrytoli i kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Interesujący okazał się fakt, że drożdże tego gatunku oprócz kwasu cytrynowego, produkowały także znaczne ilości erytrytoli, 80 g/L [Rywińska i in., 2008]. Dalsze badania pokazały, że w hodowli okresowej zasilanej, w warunkach niskiego pH (około 3,0), drożdże tego gatunku produkowały około 170 g/L erytrytoli i niewielkie ilości produktów ubocznych takich jak mannitol, kwas cytrynowy i kwas α -ketoglutarynowy [Rymowicz i in., 2009]. Hodowle okresowe nie pozwalają na pełne wykorzystanie potencjału produkcyjnego nierosnących komórek mikroorganizmów. Hodowla ciągła w bioreaktorze membranowym, w której zachodzi ciągła recykulacja komórek, pozwala na lepsze wykorzystanie ich potencjału produkcyjnego. Reaktory membranowe były z powodzeniem wykorzystywane w procesach beztlenowych takich jak biosynteza etanolu [Escobar i in., 2001] czy kwasu mlekowego [Vick-Roy i in., 1983], a także w procesach tlenowych, m.in. do biosyntezy kwasu cytrynowego [Rymowicz i Rywińska, 2003]. Dużym zainteresowaniem cieszy się także użycie systemów membranowych w oczyszczaniu ścieków, gdzie bioreaktor taki uzyskuje przewagę nad konwencjonalnym procesem z użyciem osadu czynnego [Melin i in., 2006]. Zalety stosowania tych systemów to przede wszystkim wysoka koncentracja biomasy i zwiększenie wydajności produkcji danego metabolitu. Urządzenia zajmują mniejszą przestrzeń i stwarzają możliwość lepszej kontroli procesu. Główne wady takich systemów to stosunkowo wysokie koszty instalacji, konieczność częstego monitorowania stanu membrany i jej udrażniania, ograniczenia pH, temperatury, ciśnienia oraz wrażliwość membran na niektóre substancje chemiczne [Melin i in., 2006]. Zasadniczym problemem, który utrudnia powszechną komercjalizację bioreaktorów membranowych w procesach biotechnologicznych jest fakt, że wydajność filtracji nieuchronnie maleje z upływem czasu przez, tzw. *fouling* membrany, czyli odkładanie się substancji na jej powierzchni i/lub w porach, co znacznie ogranicza jej przepuszczalność. Wiąże się to ze wzrostem oporu hydraulicznego, co objawia się obniżeniem strumienia permeatu [Lee i in., 2001].

Celem niniejszej pracy jest ocena dynamiki i wydajności procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez szczep drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w reaktorze membranowym z recykulacją komórek, w warunkach zróżnicowanego składu podłoża zasilającego.

Materiały i metody

Mikroorganizm

W badaniach wykorzystywano mutant octanowego (oct⁻), drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 o gładkim fenotypie kolonii. Szczep ten pochodził z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosach agaru YM pod warstwą parafiny w temperaturze +4°C i przeszczepiano okresowo.

Substrat

W badaniach stosowano glicerynę odpadową pochodzącą z produkcji estrów metylowych (rafineria LOTOS S.A., Polska) zawierającą 780 g/L glicerolu i 73 g/L NaCl.

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne prowadzono w 250 ml kolbach stożkowych zawierających 30 ml podłoża inokulacyjnego (g/L: gliceryna odpadowa – 100; NH₄Cl – 3; KH₂PO₄ – 0,2; MgSO₄ x 7H₂O – 1; YE – 1; woda wodociągowa 1 L), na wstrząsarce rotacyjnej przez 24 godziny przy obrotach 150 rpm, w temperaturze 30°C. Do zaszczerpienia podłoża wzrostowego w bioreaktorze używano 100 ml zawiesiny komórek drożdży namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

Hodowlę ciągłą w bioreaktorze membranowym prowadzono z użyciem wolnych komórek, które były w sposób ciągły zawracane do bioreaktora poprzez zewnętrzny, spiralny moduł membranowy firmy Bioengineering, z płaską membraną z polisulfonu o średnicy 45 mm i porowatości 0,45 μ m, w warunkach zróżnicowanego składu podłoża zasilającego. Stosowano trzy podłoża o składzie (g/L): A – gliceryna – 200; NH₄Cl – 0,2; YE – 0,5; B – gliceryna – 200; NaCl – 10; YE – 0,5; NH₄Cl – 0,2; C – gliceryna – 200; NaCl – 10; YE – 0,5; NH₄Cl – 0,2; CuSO₄ – 0,005; MnSO₄ – 0,020. Wszystkie podłoża sporządzano w wodzie wodociągowej. Hodowle prowadzono w 3,5 – litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III (New Brunswick, USA) o objętości roboczej 1,3 litra, przy szybkości przepływu powietrza 0,2 vvm, szybkości obrotowej mieszadła 600 rpm, w temperaturze 30°C. W czasie procesu pH 3,0 utrzymywano automatycznie za pomocą 15% roztworu NaOH. Po 48 godzinach hodowli okresowej prowadzonej w podłożu (g/L): gliceryna – 220; NH₄Cl – 3; KH₂PO₄ – 0,2; MgSO₄x7H₂O – 1; YE – 1; rozpoczęto proces ciągły, wprowadzając do bioreaktora kolejno podłoża produkcyjne A, B, C. Podłożo do bioreaktora wprowadzano z szybkością około 16 ml/min. Szybkość rozcieńczania (D) wynosiła w takich warunkach $D = 0,012 \text{ h}^{-1}$. Każde podłożo było wymieniane po około 180 godzinach hodowli ciągłej tj. 2,2 krotna wymiana zbiornika.

Pomiar ogólnej liczby komórek i liczby komórek pączkujących. W próbach pobieranych w trakcie hodowli ciągłej (z częstotliwością określoną w tab. 1) oznaczano ogólną liczbę komórek (N) oraz liczbę komórek pączkujących (N_p). Oznaczenia wykonano w komorze Thoma. Każdorazowo liczono około 800 obiektów, w trzech preparatach mikrobiologicznych. Liczbę komórek pączkujących odnoszono do ogólnej liczby komórek. Wyniki podano w procentach.

Metody analityczne

Biomasę oznaczano metodą wagową. Stężenie glicerolu, erytrytoli, mannitolu, kwasu cytrynowego oraz kwasu α -ketoglutarynowego oznaczano metodą HPLC na kolumnie HyperRez XP carbohydrate H⁺ (Dionex,

UltiMate 3000 Series) połączonej z detektorami UV ($\lambda = 210$ nm) i IR, w temperaturze 65°C , przy szybkości przepływu fazy ciekłej (25 mL kwasu trifluorooctowego; TFA) przez kolumnę równej $0,6$ cm³·min⁻¹.

Objaśnienia użytych oznaczeń

- Y_{ERY} – wydajność produkcji erytrytoli
[g wytworzonego erytrytoli/g zużytego substratu],
 Q_{ERY} – szybkość produkcji erytrytoli [g/Lh],
 q_{ERY} – szybkość właściwa produkcji erytrytoli [g/gh].

Omówienie wyników

Przeprowadzono 600-godzinny proces ciągłej biosyntezy erytrytoli z glicerolu odpadowego w reaktorze membranowym, podczas którego przetestowano trzy warianty podłoża zasilającego: podłoże A zawierające glicerynę odpadową, chlorek amonu i ekstrakt drożdżowy. Podłoże B zawierało dodatkowo chlorek sodu. Ostatnie testowane podłoże zasilające C, to podłoże identyczne z wariantem B, wzbogacone dodatkowo w jony miedzi i manganu. Przebieg procesu ciągłego przedstawiono na rys. 1. Proces ciągły rozpoczęto po 50 godzinach hodowli okreso-

wej, kiedy stężenie biomasy i erytrytoli wynosiło odpowiednio $15,0$ i 40 g/L. Podłoże A było dozowane w sposób ciągły przez około 180 godzin. W tych warunkach stężenie biomasy utrzymywało się od około 120 -godziny procesu na stałym poziomie wynoszącym 22 g/L, a stężenie erytrytoli stabilizowało się na poziomie około 88 g/L (Rys. 1A). Kolejne wprowadzane podłoże zasilające pozwalało zwiększyć stężenie erytrytoli w permeacie wynoszącym około 103 g/L, które jednak w kolejnych godzinach hodowli obniżało się do $59,2$ g/L w 450 godzinie hodowli. W tych warunkach zaobserwowano także nieznaczne obniżenie stężenia biomasy do poziomu $17,7$ g/L. Podłoże C było dozowane od 430 godziny procesu aż do jego zakończenia. W tym czasie produkcja erytrytoli obniżała się od stężenia wynoszącego $62,3$ g/L w 500 godzinie hodowli do 50 g/L w momencie jej zakończenia. W tym czasie stężenie biomasy stopniowo wzrastało do 23 g/L.

Skład dozowanego podłoża miał istotny wpływ na zawartość produktów ubocznych takich jak: mannitol, kwas cytrynowy i kwas α -ketoglutaryny. Zmiany stężenia produktów ubocznych w czasie trwania procesu przedstawiono na rys. 1C. Mannitol produkowany był już od drugiej doby hodowli aż do zakończenia procesu. Podczas dozowania podłoża A jego stężenie wzrastało od $4,6$ do $5,6$ g/L. Największe ilości kwasu cytrynowego, w przedziale od $1,3$ do $3,8$ g/L, stwierdzono w pierwszym etapie procesu hodowlanego (podłoże A). Natomiast zmiana podłoża zasilającego na B oraz C spowodowała obniżenie stężenia tego metabolitu do około 1 g/L. Stężenie kolejnego produktu ubocznego, kwasu α -ketoglutarynowego, w momencie rozpoczęcia hodowli ciągłej wynosiło $3,4$ g/L, a w trakcie dozowania kolejnych podłoży zaobserwowano obniżenie jego stężenia do około $1,3$ g/L, które utrzymywało się aż do końca hodowli.

Skład podłoża zasilającego miał także wpływ na dynamikę produkcji erytrytoli z glicerolu odpadowego co obrazuje rys. 1B. Od około 100 h procesu hodowlanego wartości produktywności erytrytoli (Q_{ERY}) oraz szybkości właściwej produkcji erytrytoli (q_{ERY}) utrzymywały się na podobnym poziomie wynoszącym odpowiednio $1,12$ g/Lh i $0,05$ g/gh. Podczas dozowania podłoża B odnotowano najwyższą wartość Q_{ERY} równą $1,3$ g/Lh, przy podobnej szybkości właściwej produkcji. Najniższe wartości obu parametrów odnotowano podczas dozowania podłoża C. Wydajność produkcji erytrytoli (Y_{ERY}) w zależności od stosowanego podłoża wynosiła od $0,27$ do $0,51$ g/g przy czym najwyższą wartość tego parametru odnotowano podczas dozowania podłoża B, co obrazuje rys. 1B.

W trakcie procesu ciągłego monitorowano ilość komórek pączkujących (Tab. 1).

Tab. 1. Wpływ składu podłoża zasilającego na ilość komórek pączkujących *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w reaktorze membranowym

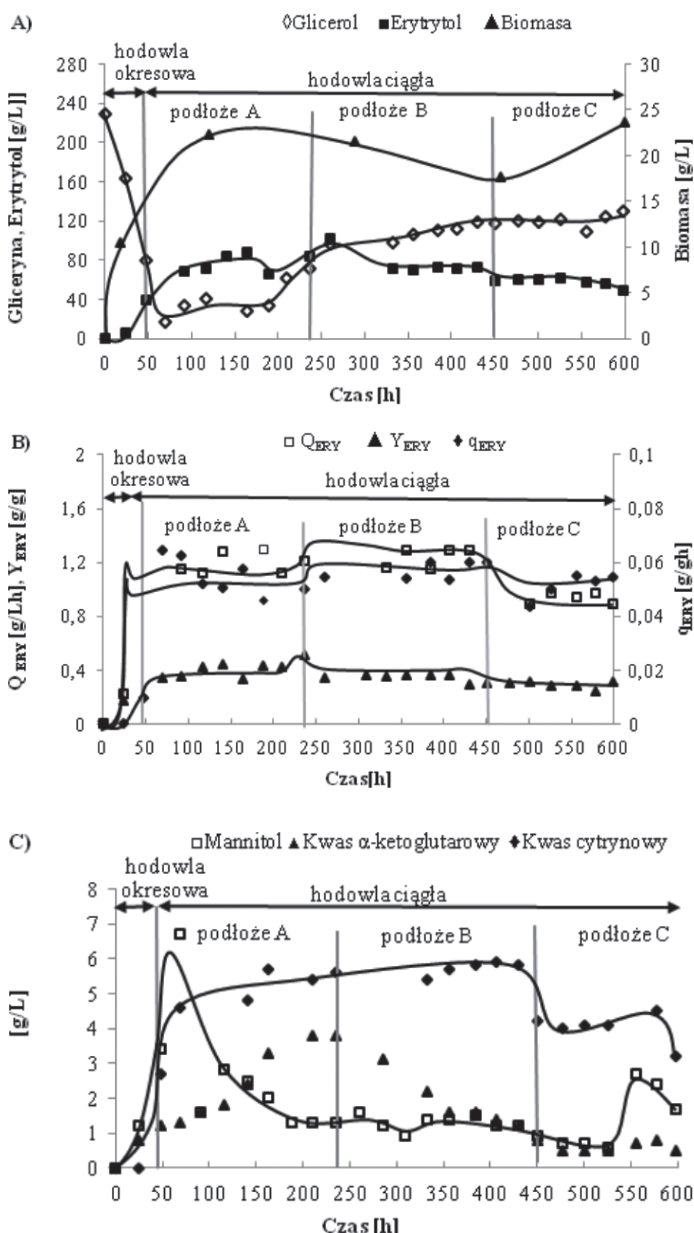
Podłoże zasilające	Czas hodowli [h]	Komórki pączkujące [%]
Podłoże A	120	26,5
Podłoże B	320	11,7
Podłoże C	600	1,3

Najwyższa ilość takich komórek była podczas dozowania podłoża A i B, od $11,7$ - $26,5\%$. Pod koniec procesu biosyntezy erytrytoli (podłoże C) ilość komórek pączkujących była niska i wynosiła około $1,3\%$, co koreluje także z obniżeniem tempa produkcji erytrytoli w tym okresie.

Dyskusja wyników

Proces biosyntezy erytrytoli z glukozy przez różne szczepy drożdży był prowadzony głównie w hodowlach okresowych i okresowych z zasilaniem, gdzie stężenie erytrytoli było w zakresie od 18 do 243 g/L [Moon i in., 2010]. Brak jest informacji w fachowej literaturze dotyczących wykorzystania procesów ciągłych w tej biosyntezie, w tym procesie ciągłego z recykulacją komórek.

W niniejszej pracy przebadano trzy rodzaje podłoża zasilającego i ich wpływ na dynamikę i wydajność procesu biosyntezy erytrytoli z odpadowego glicerolu. Najwyższe stężenie erytrytoli w permeacie (103 g/L)



Rys. 1. Wpływ rodzaju podłoża zasilającego na produkcję erytrytoli (A), szybkości produkcji i wydajność erytrytoli (B) oraz na produkcję produktów ubocznych (C) w procesie ciągłej biosyntezy erytrytoli z glicerolu w reaktorze membranowym z recykulacją komórek *Y. lipolytica* Wratislavia K1. $D = 0,012$ h⁻¹

uzyskano, gdy podłoże zasilające zawierało: glicerol, chlorek amonu, ekstrakt drożdżowy i chlorek sodu, który znacząco zwiększał ciśnienie osmotyczne podłoża (dane nieprezentowane). Według pracy [Kim i in., 2000] wzrost ciśnienia osmotycznego ma pozytywny wpływ na zwiększenie dynamiki i wydajności procesu biosyntezy erytrytoli z glukozy. W niniejszej pracy zasilanie podłoża bogatego w NaCl pozwalało uzyskać także najwyższą wartość szybkości objętościowej produkcji erytrytoli (1,3 g/Lh), która była zbliżona do uzyskanej przez [Koh i in., 2003] dla drożdży *C. magnoliae*. Z kolei w innych badaniach odnotowano znacznie wyższą produktywność erytrytoli (2,26 g/Lh) w hodowli z udziałem *Torula sp.* [Oh i in., 2001] oraz 2,0 g/Lh w hodowli szczepu *Aureobasidium sp.* SN-G42 [Sawada i in., 2009]. Najwyższą jak dotąd wydajność produkcji erytrytoli z glukozy (0,63 g/g) stwierdzono w hodowli z udziałem szczepu *Moniliella sp.* 440 N61188-12 [Lin i in., 2010]. W niniejszej pracy w przypadku dozowania podłoża B uzyskano wydajność erytrytoli na poziomie 0,51 g/g. W czasie procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia K1, produkowane były także produkty uboczne, głównie mannitol, kwas cytrynowy i α -ketoglutazarowy.

W procesach na glukozie powstają także produkty uboczne między innymi glicerol i rybitol [Moon i in., 2010]. W pracy [Lee i in., 2000] stwierdzono zwiększoną produkcję erytrytoli przez *Torula sp.* w warunkach obecności w hodowli jonów Mn^{2+} i Cu^{2+} . Jony te wywołują pozytywny synergistyczny efekt: kationy manganu powodują zwiększenie przepuszczalności ściany komórkowej drożdży, a kationy miedzi zwiększają aktywność enzymów odpowiedzialnych za nadprodukcję erytrytoli. W niniejszej pracy nie potwierdzono korzystnego wpływu tych jonów na produkcję erytrytoli, a stężenie tego związku w filtracie było najniższe i wynosiło 50 g/L na końcu hodowli. Obniżenie dynamiki procesu mogło być związane z zbyt dużą akumulacją tych pierwiastków w komórkach drożdży podczas procesu ciągłego, zwłaszcza miedzi, która w większych stężeniach działa niekorzystnie na proces biosyntezy erytrytoli. Według [Rymowicz i Rywińska, 2003] idealny mikroorganizm do ciągłej produkcji metabolitu w reaktorze membranowym musi utrzymywać maksymalną szybkość jego tworzenia, bez wzrostu komórek, w długotrwałym procesie. Bardzo ciężko jest osiągnąć taki stan, gdyż podczas ciągłej produkcji w warunkach limitacji azotowej w komórkach zachodzą zmiany. Innym problemem pozostaje fakt, że komórki w miarę upływu czasu są mniejsze i słabiej odżywione. Ze względu na ciągłą cyrkulację komórek przez filtr membranowy dochodzi do zjawiska tzw. zmęczenia komórek, które może doprowadzić do obniżenia tempa produkcji danego związku.

Początkowo wysoka ilość komórek pączkujących, zgodnie z oczekiwaniem obniżała się w trakcie procesu, do 1,3% na końcu hodowli. Porównywalną ilość komórek pączkujących obserwowali [Rymowicz i Rywińska, 2003] podczas ciągłej produkcji kwasu cytrynowego w reaktorze membranowym od 1,5 do 2,8% w zależności od składu podłoża. Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że populacja komórek drożdży była jednorodna pod względem kształtu, nie obserwowano obecności form wydłużonych (dane nieprezentowane).

Podsumowanie i wnioski

Wstępne badania nad ciągłą biosyntezą erytrytoli z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w reaktorze membranowym pozwalają na stwierdzenie, że skład podłoża zasilającego miał istotny wpływ na szybkość produkcji, wydajność erytrytoli oraz stabilność całego procesu.

Zastosowanie podłoża zawierającego glicerol odpadowy, chlorek amonu, ekstrakt drożdżowy oraz chlorek sodu pozwoliło osiągnąć wysokie stężenie erytrytoli w filtracie, a proces charakteryzował się dobrą dynamiką produkcji erytrytoli i jego wydajnością.

Kontynuacja badań powinna obejmować poprowadzenie długoterminowego procesu ciągłego w takim podłożu, obejmującym, co najmniej 5 wymian zbiornika w stanie ustalonym i pełną charakterystykę stanu fizjologicznego drożdży w takim procesie.

LITERATURA

- Aoki M., Pastore G.M., Park Y.K., 1993. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnology Letters* 15, 383–388. DOI: 10.1007/BF00128281
- Escobar J.M., Rane K.D., Cheryan M., 2001. Ethanol production in a membrane bioreactor: pilot-scale trials in a corn wet mill. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91, 283–296. DOI: 10.1385/ABAB:91-93:1-9:283
- 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 *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(2), 225–231. DOI: 10.1007/s00253-009-1871-5
- Kim S.Y., Lee K.H., Kim J.H., Oh D.K., 1997. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnology Letters* 19(8), 727–729. DOI: 10.1023/A:1018371722456
- Kim K.A., Noh B.S., Lee J.K., Kim S.Y., Park Y.C., Oh D.K., 2000. Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula sp.* *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 69–74.
- Koh E.S., Lee T.H., Lee D.Y., Kim H.J., Ryu Y.W., Seo J.H., 2003. Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. *Biotechnology Letters* 25, 2103–2105. DOI: 10.1023/B:BILE.0000007076.64338.ce
- Lee J., Ahn W.Y., Lee C.H., 2001. Comparison of the filtration characteristics between attached and suspended growth microorganisms in submerged membrane bioreactor. *Water Resource* 35(10), 2435–2445. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00524-8
- Lee J.K., Ha S.J., Kim S.Y., Oh D.K., 2000. Increased erythritol production in *Torula sp.* by Mn^{2+} and Cu^{2+} . *Biotechnology Letters* 22, 983–986. DOI: 10.1023/A:1005672801826
- Lin S.J., Wena C.Y., Wang P.M., Huang J.C., Wei C.L., Chang J.W., Chu W.S., 2010. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella sp.* *Process Biochemistry* 45(6), 973–979. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.03.003
- Melin T., Jefferson B., Bixio D., Thoeve C., de Wilde W., de Koning J., 2006. Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination* 187, 271–282. DOI: 10.1016/j.desal.2005.04.086
- Moon H.J., Jeya M., Kim I.W. 2010. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1017–1025. DOI: 10.1007/s00253-010-2496-4
- Oh D.K., Cho C.H., Lee J.K., Kim S.Y., 2001. Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula sp.* by controlling glucose concentration *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 248–252. DOI: 10.1038/sj.jim.7000122
- Park J., Seo B., Kim J., Park Y., 1998. Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon sp.* *Journal of General Applied Microbiology* 86(6), 577–580. DOI: 10.1016/S0922-338X(99)80010-5
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 31(3), 377–380. DOI: 10.1007/s10529-008-9884-1
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chemical Papers* 62(3), 239–246. DOI: 10.2478/s11696-008-0018-y
- Rymowicz W., Rywińska A., 2003. Ciągła produkcja kwasu cytrynowego z syropu glukozowego przez mutant *Yarrowia lipolytica* w reaktorze membranowym. *Acta Scientiarum Polonorum - Biotechnologia* 2(1-2), 67–74.
- Ryu Y.W., Park C.Y., Park J.B., Kim S.Y., Seo J.H., 2000. Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 100–103. DOI: 10.1038/sj.jim.7000039
- Sawada K., Taki A., Yamakawa T., Seki M., 2009. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42. *Journal of Bioscience and Bioenergy* 108, 385–390. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.05.008
- Vick-Roy T.B., Mandel D.K., Dea D.K., Blanch H.W., Wilke C.R., 1983. The application of cell recycles to continuous fermentative lactic acid production. *Biotechnology Letters* 5, nr 10, 665–679. DOI: 10.1007/BF01386359

Badania były realizowane w ramach projektu PO IG 01.01.02-00-074/09 „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylovych”.