

Piotr JUSZCZYK, Waldemar RYMOWICZ, Piotr LISZKA

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

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

## Produkcja biomasy *Pichia pastoris* z surowców odpadowych z produkcji biodiesla

### Wstęp

Niedobór żywności i paszy, zwłaszcza w krajach trzeciego świata, zmusza społeczeństwa do poszukiwania alternatywnych źródeł białka, które mogą zastąpić bardzo powszechną, ale drogą śrutę sojową czy mączkę rybną [Anupama i Ravindra, 2000]. Najbardziej obiecującą metodą pozyskiwania wartościowego białka jest metoda biologiczna z użyciem drobnoustrojów i z wykorzystaniem lokalnie dostępnych i tanich substratów odpadowych [Puniya i in., 1995]. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie zagospodarowaniem produktów ubocznych i odpadowych powstających podczas produkcji biopaliw. Biodiesel jest alternatywnym olejem napędowym, którego stosowanie jest korzystne dla środowiska naturalnego, ze względu na jego biodegradowalność, nietoksyczność i niski poziom emisji spalin. Biodiesel produkowany jest z surowców odnawialnych – olejów roślinnych i zwierzęcych, w reakcji transestryfikacji tłuszczu z alkoholem, w której, w zależności od rodzaju użytego alkoholu, powstają estry metylowe lub etylowe wyższych kwasów tłuszczowych (FAME). W czasie produkcji biodiesla oprócz estrów metylowych lub etylowych otrzymywane są produkty odpadowe. Głównym produktem odpadowym jest tzw. frakcja glicerynowa, która zawiera do 50% glicerolu. Resztę tej frakcji stanowią kwasy tłuszczowe, estry, mydła, lecytyny, białka i peptydy (w tym o właściwościach żelujących), barwniki naturalne (chlorofil, antocyjany) oraz witaminy rozpuszczalne w wodzie [Thompson i He, 2006; Vogt, 2004]. W 2011 roku, zgodnie z raportem [Europejska Rada ds. Biodiesla, 2011] wyprodukowano 22 mln ton tego ekologicznego paliwa. Szacuje się, że przy produkcji 10 kg biodiesla powstaje około 1 kg gliceryny. Tak więc, dzisiaj w Europie do zagospodarowania pozostaje około dwóch milionów ton gliceryny odpadowej. Wzrost produkcji i zużycie biopaliw w najbliższych latach będzie stymulowane przede wszystkim przez takie czynniki jak: zmniejszanie się rezerw ropy naftowej, wzrost zużycia energii oraz troska o środowisko naturalne. We wrześniu 2011 roku, ceny odpadowej gliceryny w Europie kształtowały się w zakresie 200–260 euro/tonę, podczas gdy cena produktu oczyszczonego, wynosiła 480–530 euro/tonę [ICIS, 2011]. Duże koncerny przemysłowe doskonaląc proces produkcji biodiesla, otrzymując glicerynę o coraz wyższej czystości, z drugiej zaś strony drobnoproducenci (w tym rolnicy) przekazują glicerynę nieodpłatnie. Jednak gliceryna o wysokiej czystości jest bardzo ważnym surowcem przemysłowym stosowanym w produkcji żywności, leków, kosmetyków i wyrobów tytoniowych, podczas gdy gliceryna odpadowa ma niewielką wartość i ograniczone wykorzystanie. W procesie produkcji biodiesla powstają także inne odpady, takie jak *degumming* oraz woda popłuczynowa. Dodatkowo frakcja glicerynowa może zawierać także metanol, który stosowany jest w nadmiarze w procesie transestryfikacji [Lammers i in., 2008]. Metanol jak również produkty jego przemiany – aldehyd mrówkowy i kwas mrówkowy, są związkami toksycznymi dla większości organizmów, dlatego też jego poziom musi być ściśle kontrolowany [Mohamed i in., 2007].

Drożdże uzdolnione do wzrostu w podłożu z metanolem – drożdże metylotroficzne – wykorzystujące go jako wyłączone źródło węgla i energii, reprezentują gatunki należące do rodzaju *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* i *Torulopsis*. Drożdże metylotroficzne posiadają wspólny, dwuetapowy szlak przemiany metanolu w komórkach opisany bardzo szczegółowo w pracach [Zhang i in., 2000; Ren i in., 2003]. Na początku lat siedemdziesiątych XX wieku wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem drożdży metylotroficznycy do produkcji SCP (*Single-Cell-Protein*) [Cereghino i Cregg, 2000; Jungo, 2007]. Przemysłowa produkcja SCP z wykorzystaniem szczepu *Pichia pastoris* po raz pierwszy reali-

zowana była przez *Philips Petroleum Company*. Przez optymalizację podłoża, warunków wzrostu i technik prowadzenia hodowli osiągnięto przyrost biomasy przewyższający 130 g/L suchej masy komórkowej. W tej samej dekadzie nastąpił kryzys energetyczny powodując wzrost ceny metanolu przy jednoczesnym spadku ceny ziaren soi. Produkcja SCP z wykorzystaniem metanolu stała się ekonomicznie nieopłacalna i mało atrakcyjna [Cereghino i Cregg, 2000; Cregg i in., 2000; Jungo, 2007].

Ponowne zainteresowanie drożdżami metylotroficznymi związane jest z pojawiającą się w niedalekiej perspektywie możliwością bezpośredniego zagospodarowania dużych ilości odpadów z produkcji biodiesla zawierających toksyczny metanol.

Celem pracy była ocena przydatności *degummingu*, frakcji glicerynowej i jej komponentów (gliceryny, kwasów tłuszczowych i metanolu) do produkcji biomasy drożdży *Pichia pastoris* w warunkach obniżonego odczynu środowiska hodowlanego.

### Materiały i metody

#### Mikroorganizm

W badaniach wykorzystano szczep drożdży *Pichia pastoris* ATCC 28485. Szczep przechowywano na skosach agarowych YM w temperaturze +4°C.

#### Substrat

W badaniach wykorzystano frakcję glicerynową powstałą przy produkcji estrów etylowych (*Stacja Doświadczalna Uniwersytetu Wrocławskiego*) i estrów metylowych (*BioDiesel Vienna GmbH*), glicerynę odpadową o czystości 50% (w/w), kwasy tłuszczowe, *degumming* oraz metanol. W hodowlach kontrolnych jako źródło węgla i energii zastosowano glicerynę kosmetyczną (*POCH*).

#### Podłoża hodowlane

Zdolność drożdży do wzrostu na metanolu, w zakresie 0–4,0 g/L badano w podłożu YNB (*Difco*) na wstrząsarce rotacyjnej typu G-10 (*New Brunswick Co.*) przy 160 rpm, w temperaturze 30°C, w pH 3,5–4,5 przez 72 godziny. Hodowle produkcji biomasy prowadzono w bioreaktorze AK-3 o pojemności całkowitej 3,5 litra, zawierającym 1100 ml podłoża produkcyjnego o składzie [g/L]: gliceryna kosmetyczna / odpadowa/ frakcja glicerynowa/ kwasy tłuszczowe/ *degumming* – 30; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 5,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,4; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,14; woda wodociągowa 1000 mL; pH 3,5; 4,0; 4,5. Metanol jako źródło węgla stosowano w ilości 5 i 15 g/L.

#### Metody analityczne

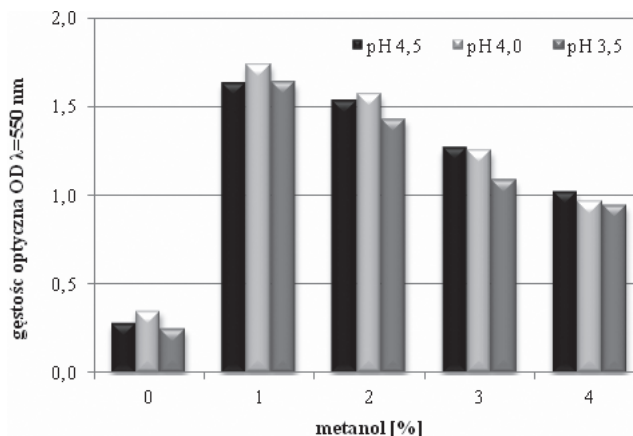
Wzrost drożdży oceniano poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali  $\lambda = 550$  nm na spektrofotometrze (*Shimadzu*). Biomase i tłuszcz resztkowy oznaczono metodą wagową. Glicerol i metanol oznaczono metodą HPLC na kolumnie typu *Aminex HPX 87H* połączonej z detektorem RI w temperaturze pokojowej. Szybkość fazy ciekłej 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wynosiła 0,6 mL/min. Białko oznaczono metodą biuretową wg *Stewart*.

#### Objaśnienie użytych oznaczeń

$X$  – biomasa [g/L],  
 $Y_C$  – wydajność całkowita biomasy [g biomasy / g początkowego stężenia gliceryny w podłożu],  
 $Q_X$  – szybkość produkcji biomasy, [g/Lh].

## Omówienie i dyskusja wyników

W pierwszej części pracy oceniano wpływ stężenia metanolu (0–4%) i *pH* środowiska hodowlanego (3,5–4,5) na tempo wzrostu drożdży *P. pastoris* ATCC 28485. Otrzymane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie wzrostu drożdży, w zależności od stężenia metanolu i *pH* środowiska (Rys. 1).



Rys. 1. Wpływ stężenia metanolu i *pH* na wzrost drożdży *Pichia pastoris*

Wraz ze wzrostem stężenia metanolu w podłożu (od 1 do 4%), dynamika wzrostu drożdży *P. pastoris* uległa znacznemu obniżeniu. Najwyższy wzrost ( $OD = 1,8$ ) obserwowano przy *pH* 4,0 i 1% metanolu w podłożu. Przy tym samym stężeniu źródła węgla, ale w *pH* 3,5 i 4,5 wzrost drożdży był niższy i wynosił około 0,2 OD. Znaczne obniżenie gęstości optycznej do wartości około 1 OD nastąpiło w środowisku o zawartości metanolu 4%, bez względu na *pH* środowiska, ale gęstość optyczna była wyższa aniżeli w hodowli kontrolnej o około 0,6 OD. Podobne zależności wykazali [Duff i Murray, 1988], którzy maksymalny plon biomasy drożdży *P. pastoris* uzyskali w hodowli z 2% metanolu w podłożu. Jednak badania z zastosowaniem „dzikiego” szczepu drożdży *P. pastoris* [Mohamed i in., 2007] pokazały, że drożdże te osiągnęły maksymalny plon biomasy w podłożu ze znacznie większym stężeniem metanolu, równym 6% (gęstość optyczna 5,0 OD przy długości fali  $\lambda = 600$  nm). Wytlumaczeniem tak dużej różnicy w produkcji biomasy może być fakt, że wśród szczepów *P. pastoris* wyróżnia się dwa typy, które różnią się kinetyką utylizacji metanolu –  $Mut^+$  szybko metabolizuje metanol i  $Mut^s$  wolno metabolizuje metanol [Satora i Wiśniewski, 2011].

W tab. 1 pokazano charakterystykę procesu produkcji biomasy drożdży *P. pastoris* ATCC 28485 z wykorzystaniem gliceryny kosmetycznej, gliceryny odpadowej, nieczyszczonej frakcji glicerynowej metylowej i etylowej oraz mieszaniny glicerolu odpadowego i metanolu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że drożdże *P. pastoris* ATCC 28485 nie utylizują jako źródła węgla kwasów tłuszczowych, *degumingu* oraz metanolu (w stężeniu 15 g/L) (dane nieprezentowane).

Parametry charakteryzujące proces produkcji biomasy drożdży *P. pastoris* uzyskane w hodowlach węglanych wykazywały duże zróżnicowanie w zależności od zastosowanego substratu jak i *pH* środowiska. Największą produkcję biomasy (19,4 g/L) uzyskano w podłożu o *pH* 4,0 zawierającym jak substrat glicerynę odpadową i metanol. W środowisku o *pH* 3,5 stężenie biomasy drożdży uległo nieznacznemu obniżeniu do 17,1 g/L. Zaobserwowano, iż w podłożach z gliceryną kosmetyczną i gliceryną odpadową, wzrost *pH* środowiska z 3 do 4,5 spowodował znaczny przyrost plonu biomasy. W przypadku hodowli realizowanych z udziałem glicerynowej frakcji etylowej i metylowej oznaczony poziom biomasy był najniższy i wynosił 2,8–9,6 g/L. Zdolność drożdży *Pichia pastoris* do utylizacji glicerolu przy różnym *pH* środowiska potwierdzają badania [Chiruvolu i in., 1999] podczas których w podłożu o *pH* 5 otrzymano 96,7 g/L biomasy drożdży. Maksymalny poziom biomasy osiągnięty w badaniach własnych jest porównywalny ze stężeniem biomasy uzyskanym z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101 w hodowlach okresowych z wykorzystaniem oleju słonecznikowego, pal-

Tab. 1. Charakterystyka procesu produkcji drożdży *Pichia pastoris* ATCC 28485 na różnych substratach

<i>pH</i>	<i>X</i> [g/L]	<i>Y<sub>c</sub></i> [g/g]	<i>Q<sub>c</sub></i> [g/Lh]	Białko [%]
Gliceryna kosmetyczna				
3,5	13,2	0,44	1,32	33,5 ± 1,7
4,0	17,1	0,57	1,71	34,4 ± 2,0
4,5	17,8	0,59	1,62	34,6 ± 1,5
Gliceryna odpadowa				
3,5	9,8	0,33	0,89	38,8 ± 0,7
4,0	14,2	0,47	1,42	37,8 ± 1,2
4,5	16,1	0,54	1,46	39,3 ± 1,0
Frakcja glicerynowa metylowa				
3,5	8,4	0,28	1,20	25,6 ± 1,1
4,0	7,9	0,26	0,99	28,4 ± 1,5
Frakcja glicerynowa etylowa				
3,5	9,6	0,32	0,96	30,6 ± 1,9
4,0	2,8	0,09	0,31	35,0 ± 1,0
Gliceryna odpadowa + metanol (5g/L)				
3,5	17,1	0,57	1,90	36,4 ± 1,0
4,0	19,4	0,65	1,94	36,5 ± 1,1

mowego oraz frytury, odpowiednio 23,9; 17,9 i 20,5 g/L [Musiał i in., 2004]. W pracy [Papanikolaou i in., 2007] w procesie okresowym w *pH* 6,0 z użyciem stearyny otrzymano 30,5 g/L biomasy drożdży *Y. lipolytica* ACA-DC 50109. W innych badaniach poziom biomasy *Y. lipolytica* uzyskany z oleju rzepakowego wynosił 28,5 g/L [Musiał i in., 2004], z glicerolu uzyskano 118 g/L biomasy *Cryptococcus curvatus*, w procesie z zawarciem komórek [Meesters i in., 1996]. Natomiast w hodowli ciągłej z udziałem *Kluyveromyces fragilis* na serwatce otrzymano plon biomasy równy 37 g/L, a w pracy [Choi i in., 2002] w procesie na soku z kapusty, z udziałem *Candida utilis* KCCM 11355 i *P. stipitidis* CBS 5776 otrzymano niższe wartości biomasy komórkowej (od 6,2 do 10,4 g/L). W procesach biotechnologicznych ważną rolę odgrywa zoptymalizowany skład podłoża oraz warunki prowadzonej hodowli. Ważnymi parametrami charakteryzującymi proces produkcji biomasy oraz określającymi ekonomiczną atrakcyjność procesu są wydajność biomasy i szybkość produkcji biomasy.

Wydajność procesu jest to paramet, który zasadniczo jest zależny od zastosowanego źródła węgla w podłożu produkcyjnym i osiąga wartości od 0,45 g/g w podłożach z alkoholami i węglowodanami, 1,1 g/g w podłożach z n-parafinami, a nawet 1,24 g/g przy wykorzystaniu substratów tłuszczowych [Boze i in., 1995; Kramarz, 1992]. W dyskutowanej pracy wydajność biomasy wykazywała duże zróżnicowanie w zależności od użytego substratu i *pH* środowiska (Tab. 1). Najwyższą wydajność na poziomie 0,65 g/g i 0,57 g/g, stwierdzono w hodowli drożdży z użyciem gliceryny odpadowej i metanolu w podłożu o *pH* odpowiednio, 4,0 i 3,5. Równie wysoką wartość tego parametru (0,54–0,59 g/g) odnotowano w hodowli z gliceryną kosmetyczną w *pH* 4,0 i 4,5 oraz odpadową w *pH* 4,5 i była ona nieznacznie niższa, aniżeli uzyskana w hodowlach z gliceryną [Chiruvolu i in., 1999] dla drożdży *P. pastoris* (0,8 g/g). W badaniach [Juszczak i in., 2005] wydajność procesu produkcji biomasy drożdży z wykorzystaniem glicerolu odpadowego była wyższa i osiągnęła wartości 0,67–1,05 g/g w zależności od użytego szczepu drożdży. W dyskutowanej pracy najniższe wartości wydajności (0,09–0,32 g/g) otrzymano w hodowlach z frakcją glicerynową: metylową i etylową. Tak niska wydajność procesu produkcji można tłumaczyć brakiem zdolności drożdży *P. pastoris* do utylizacji kwasów tłuszczowych. Gatunki posiadające tę umiejętność prowadzą procesy produkcji biomasy z wysoką wydajnością. W hodowlach przeprowadzonych przy wykorzystaniu szczepu *Y. lipolytica* A-101 w podłożu z frakcją glicerynową uzyskano wydajność biomasy 0,67 g/g [Juszczak i Rymowicz, 2009]. Wysoką wydajność biomasy, wynoszącą 1,56 g/g, uzyskano w hodowli szczepu *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 na wolnych kwasach tłuszczowych [Papanikolaou i in., 2007]. W badaniach przy wykorzystaniu substratów tłuszczowych szczepu drożdży *Y. lipolytica* produkowały biomasę z wysoką wydajnością, równą 0,73–1,14 g/g



[Rymowicz i in., 1997b] i były to wartości prawie 2-krotnie wyższe, aniżeli uzyskiwane na sacharydach. Produktywność biomasy kształtowała się na poziomie od 0,31 do 1,94 g/Lh i zależała od stosowanego źródła węgla i pH podłoża hodowlanego (Tab. 1). Największą produktywność biomasy uzyskano w hodowli z udziałem glicerolu i metanolu (1,94 i 1,90 g/Lh, odpowiednio w pH 4,0 i 3,5). Szybkość produkcji biomasy *P. pastoris* poniżej 1 g/Lh obserwowano w podłożu zawierającym frakcję glicerynową etylową (bez względu na pH podłoża).

Wyniki własne są zdecydowanie niższe aniżeli dla drożdży *Pichia pastoris* z metanolem (11,6 g/Lh) czy serwatką (22,4 g/Lh) [Boze i in., 1992]. W badaniach [Juszczak i in., 2005] najwyższą produktywność biomasy, równą 2,58 g/Lh, w podłożach zawierających glicerol odpadowy wykazywał szczep *Y. lipolytica* ATCC 8661 UV'1. W podłożach z frakcją glicerynową produktywność biomasy drożdży *Y. lipolytica* zawierała się w granicach 1,2–2,7 g/Lh [Juszczak i Rymowicz, 2009]. Produktywność biomasy drożdży *C. curvatus* ATCC 20509 w podłożu z glicerolem osiągnęła natomiast wartość 2,36 g/Lh [Meesters i in., 1996].

Ważnym parametrem określającym przydatność drożdży jako dodatku do pasz jest zawartość białka komórkowego oraz jego wartość odżywcza. Zgodnie z normą PN-81/A-79006 zawartość białka jaką muszą charakteryzować się drożdże paszowe wynosi od 40 do 52%. W zależności od stosowanego źródła węgla oraz pH środowiska ilość białka wahała się od 25,6±1,1 do 39,3±1,0%. Najwyższą ilość białka oznaczono w biomase drożdży uzyskanej na glicerynie odpadowej w pH 4,5, natomiast najniższą zawartością białka charakteryzowała się biomasa wyprodukowana w pH 3,5 na frakcji glicerynowej metylowej. Zawartość białka na poziomie 46% uzyskano prowadząc hodowlę drożdży z rodzaj *Hansenula* w podłożu zawierającym metanol jako źródło węgla i energii [Levine i Cooney, 1973]. Stosując w hodowlach metanol, jako źródło węgla otrzymano w biomase drożdży *P. pastoris* białko na poziomie 24% [Mohamed i in., 2007], a w wyniku mutagenizacji tego szczepu zawartość białka w komórkach drożdży wzrosła do 42%. Prowadząc hodowlę drożdży *C. tropicalis* ATCC 60557 i *C. robusta* ATCC 60559 uzyskano stężenie białka w biomase na poziomie, odpowiednio 33,4 oraz 32,1% [Juszczak i in., 2005]. Zbliżoną zawartość białka komórkowego (35,2–36,5%) oznaczono w biomase drożdży *Y. lipolytica* uzyskanej na frakcji glicerynowej [Juszczak i Rymowicz, 2009]. Niski poziom białka w biomase komórkowej drożdży może być spowodowany niedostateczną ilością nieorganicznego i organicznego źródła azotu [Rymowicz i in., 1997a] lub też drożdże mogą gromadzić w swoich komórkach tłuszcze zapasowe [Papanikolaou i in., 2001].

## Wnioski

Należy stwierdzić, że szczep drożdży *Pichia pastoris* ATCC 28485 jest zdolny do utylizacji metanolu występującego w podłożu hodowlanym do 4%.

Wykazano również, że drożdże te utylizują efektywnie glicerol odpadowy, natomiast nie są zdolne do wzrostu w podłożu zawierającym kwasy tłuszczowe i degumming.

## LITERATURA

Anupama, Ravindra P., 2000. Value - added food: Single cell protein *Biotechnol. Adv.*, **18**, 459–479. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00045-8

Boze H., Moulin G., Galzy P., 1992. Production of food and fodder yeasts *Crit. Rev. Biotechnol.*, **12**, nr 1/2, 65–86. DOI: 10.3109/073885592.09.069188.

Boze H., Moulin G., Galzy P., 1995. Production of microbial biomass. In *Bio-technology*, Ed. Rehm H.J., Reed G., VCH, New York.

Cereghino J.L., Cregg J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *FEMS. Microbiol. Rev.*, **24**, 45–66. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.

Chiruvolu V., Eskridge K., Cregg J.M., Meagher M.M., 1999. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **75**, 163–173. DOI: 10.1007/BF 0278 7771.

Choi M. H., Ji G. E., Koh K. H., Ryu Y. W., Jo D. H., Park Y. H., 2002. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production *Biores. Technol.*, **83**, 251–253. DOI: 10.1016/S0960-8524 (01) 00232-2.

Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* *Mol. Biotechnol.*, **16**, 23–52. DOI: 10.1385/MB:16:1:23.

Duff S.J.B., Murray W.D., 1988. Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 44–49. DOI: 10.1002/bit.260310108.

Europejska Rada ds. Biodiesla, 2011. *The European Biodiesel Board*: [http://www.ebb-eu.org/EBBpressreleases/EBB%20press%20release%202010%20prod%202011\\_capacity%20FINAL.pdf](http://www.ebb-eu.org/EBBpressreleases/EBB%20press%20release%202010%20prod%202011_capacity%20FINAL.pdf)

ICIS, 2012. Chemicals, Energy, Fertilizers - prices, news and analysis: <http://www.icis.com/>

Jungo C., 2007. Quantitative characterization of a recombinant *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain secreting avidin using transient continuous cultures *Thèse EPFL*, no 3794. DOI: 10.5075/epfl-thesis-3794.

Juszczak P., Musiał I., Rymowicz W., 2005. Dobór szczepów drożdży do produkcji biomasy z glicerolu odpadowego *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, **4**, nr 1-2, 65–76.

Juszczak P., Rymowicz W., 2009. Microbial bioconversions of raw glycerol. In *Microbial Conversions of Raw Glycerol*. Ed. Aggelis G., Nova Science Publishers, Inc, New York.

Kramarz M., 1992. Badania nad wykorzystaniem roślinnych substratów tłuszczowych do produkcji biomasy drożdży paszowych w skali przemysłowej. *Prace Nauk. Akad. Ekon. Wrocław*, nr 626, 67–74.

Lammers P.J., Kerr B.J., Weber T.E., Dozier III W.A., Kidd M.T., Bregendahl K., Honeyman M.S., 2008. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs *J. Anim. Sci.*, **86**, 602 – 608. DOI: 10.2527/jas.2007-045.

Levine, D. W., and C. L. Cooney. 1973. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast *Appl. Microbiol.*, **26**, 982–990.

Meesters P.A.E.P., Huijberts G.N.M., Eggink G., 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 575–579. DOI: 10.1007/s00253-012-3921-7.

Mohamed H.A.A., Abd-El-Aal S.K.H., Abosereh N.A., 2007. Biological effect of methanol utilization by *Pichia pastoris* after helium-neon laser treatment *Res. J. Agric. and Biol. Sci.*, **3**, 5, 485–493.

Musiał I., Rymowicz W., Kita A., 2004. Produkcja biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* z tłuszczów odpadowych po smażeniu produktów przekąskowych *Biotechnologia*, **3**, nr 1-2, 75–83.

Papanikolaou S., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis G., 2007. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica* *Electron. J. Biotechnol.*, **10**, 425–435. DOI: 10.2225/vol10-issue3-fulltext-8.

Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G., Marc I., 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats *Antonie Van Leeuwenhoek*, **80**, 215–224. DOI: 10.1023/A:1013083211405.

Puniya A. K., Singh S., Kumar C. G., Singh K., 1995. Single cell protein: A promising dietary substitute *Ind. J. Exp. Biol.*, **33**, 545–551. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00042-2.

Ren H.T., Yuan J.Q., Bellgardt K.H., 2003. Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance *J. Biotechnol.*, **106**, 53–68. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.08.003.

Rymowicz W., Kinal S., Wojtatowicz M., Bodarski R., 1997a. Charakterystyka biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* wyprodukowanej na substratach tłuszczowych *Biotechnologia*, **3**, 38, 70–77.

Rymowicz W., Rafałowicz D., Wojtatowicz M., Musiał I., 1997b. Dobór szczepów i składu podłoża do produkcji biomasy *Yarrowia lipolytica* na substratach tłuszczowych *Biotechnologia*, **3** (38), 62–69.

Satora P., Wiśniewski M., 2011. Znaczenie przemysłowe drożdży z rodzaju *Pichia* *Post. Mikrobiol.*, **50**, 3, 247–255.

Thompson J.C., He B.B., 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks *Appl. Eng. Agr.*, **22**, 2, 261–265.

Vogt A., 2004. Nowa technologia otrzymywania estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych z tłuszczów roślinnych i zwierzęcych-komponentów biopaliw i surowców oleochemicznych. *Materiały konferencyjne: Fakty i mity o biopaliwach*. SNTiTR NOT, Wrocław, Polska, Listopad 2004, 17–32.

Zhang W., Inan M., Meagher M.M., 2000. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **5**, 275–287. DOI: 2D7CBBF8-6C67-4158-9070-28AC4C93D31.