



Wiązanie metali ciężkich przez grzyby mikroskopowe

Mirosława Słaba, Jerzy Długoński

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Heavy metals uptake by microscopic fungi

Summary

This review article describes interactions between heavy metals and microscopic fungi which immobilize those metals and can be used in practical application for cleaning up of toxic metals that contaminate the environment. The biosorption process and following factors: metal concentration, pH, amount of biomass, medium, temperature and biomass modification, influencing biosorption efficiency are described in more detail. The examples of highly-efficient desorption of metals from mycelium are presented, too. The role of fungal cell wall in heavy metal uptake is discussed.

Key words:

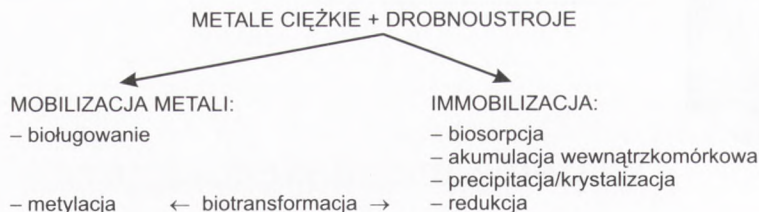
heavy metals, uptake, biosorption, desorption, microscopic fungi.

1. Wstęp

Oddziaływania drobnoustrojów z metalami ciężkimi mogą przyczyniać się zarówno do zwiększania puli metali krążących w środowisku naturalnym, charakteryzujących się dużą toksycznością dla żywych organizmów, jak i do wyłączenia tych metali z obiegu w przyrodzie (immobilizacja metali) poprzez ich wiązanie w biomacie lub wytrącanie w postaci trudno rozpuszczalnych związków (1,2) (rys. 1). Bioługowanie i metylacja metali prowadzą do zwiększenia rozpuszczalności/lotności metali. Wiązanie metali przez drobnoustroje polega na: biosorpcji w osłonach zewnętrznych lub otoczkach, akumulacji we wnętrzu komórek lub mikroprecypitacji – zarówno we wnętrzu jak i w zewnętrz-

Adres do korespondencji

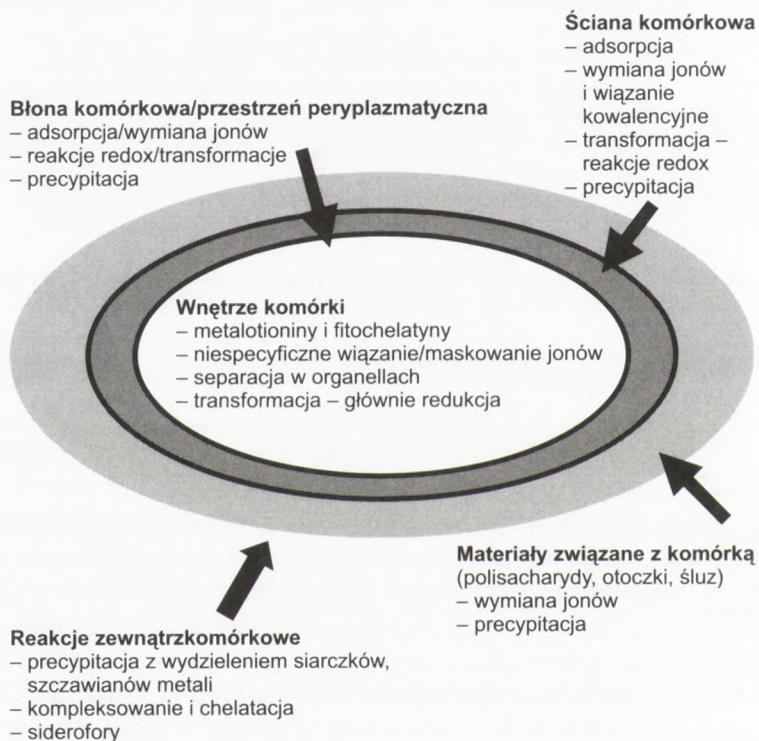
Jerzy Długoński,
Katedra Mikrobiologii
Przemysłowej
i Biotechnologii,
Instytut Mikrobiologii
i Immunologii,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź.



Rys. 1. Schemat przedstawiający oddziaływania drobnoustrojów z metalami ciężkimi.

nych osłonach. Precypitacja metali spowodowana aktywnością drobnoustrojów (produkcja metabolitów, wytrącenie metali w postaci elementarnej na skutek ich redukcji) może zachodzić również poza komórką (rys. 2).

Grzyby mikroskopowe są grupą drobnoustrojów szeroko rozpowszechnioną w środowisku naturalnym, a ich biomasa charakteryzuje się dobrymi właściwościami biosorpcyjnymi.



Rys. 2. Procesy i reakcje odpowiedzialne za mikrobiologiczne wiązanie i detoksykację metali ciężkich, z uwzględnieniem lokalizacji procesu [(1) zmienione].

2. Biosorpcja i czynniki wpływające na jej efektywność

Biosorpcja metali przez drobnoustroje to proces fizykochemiczny, polegający na wiązaniu metali (najczęściej kationów) przez osłony zewnętrzne komórek (ściana komórkowa, otoczka, materiały zewnątrzkomórkowe). Mechanizm biosorpcji jest zróżnicowany. Może być spowodowana adsorpcją, wymianą jonową, kompleksowaniem metali, mikroprecypitacją/kryształizacją. W proces ten są zaangażowane wiązania kowalencyjne, oddziaływania elektrostatyczne lub siły van der Waalsa. Kompleksowanie polega na interakcji kationu metalu z przynajmniej dwoma grupami hydroksylowymi liganda. Wapń, ołów, miedź, stront, kobalt i cynk tworzą połączenia kompleksowe z polisacharydami ściany komórkowej. Natomiast metale takie jak: kadm, srebro i żelazo mają mniejsze zdolności to tworzenia kompleksów z grupami hydroksylowymi (3). Biosorbentami mogą być zarówno aktywne metabolicznie komórki, biomasy odpadowe, a także komórki martwe. Często zdarza się, że wydajność biosorpcji metali przez inaktywowaną biomasę są lepsze niż dla drobnoustrojów żywych (3-5). Szczep grzyba strzępkowego *Verticillium marquandii*, wyizolowany z odpadów poflotacyjnych ze Śląska, będący obiektem naszych badań jest zdolny do efektywnego wiązania cynku i ołowiu (6,7). Najlepsze rezultaty uzyskano po 24 h inkubacji młodej, aktywnej metabolicznie grzybni z cynkiem i ołowiem, w warunkach głodowych. Zdolność do wiązania cynku, spada drastycznie po 15 min termicznej inaktywacji grzybni w temperaturze 100°C. Ołów jest również najlepiej wiązany przez grzybnię żywą, lecz w grzybni po 15 min gotowania wykrywa się jeszcze znaczące ilości ołowiu (80 mg/g suchej masy). Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że w proces wiązania cynku jest zaangażowany metabolizm komórkowy grzyba (8).

2.1. Odczyn środowiska

Optymalne pH należy dobierać eksperymentalnie dla badanego układu: drobnoustrój – metal. Najczęściej niskie pH obniża wydajność wiązania metali przez biomasę drobnoustrojów. Jest to spowodowane konkurencją pomiędzy kationami metali i protonami wodorowymi do grup anionowych w biomacie (9). Wraz ze wzrostem pH więcej grup funkcyjnych, biorących udział w wiązaniu jest zdysocjowanych. Kiedy wszystkie grupy ulegną dysocjacji, ustala się stan równowagi, dalszy wzrost pH nie powoduje zwiększenia efektywności biosorpcji (10). Zależność pomiędzy wzrostem pH (w zakresie 4,0-5,5) a nasileniem procesu wiązania cynku i miedzi zaobserwowano dla szczepu grzyba *Rhizopus arrhizus* (9,11). Bredy i Duncan (12) oraz Zhou (9) tłumaczą wpływ pH na efektywność biosorpcji w ten sposób, że w niskim pH ligandy występujące w ścianie komórkowej są zamaskowane jonami H_3O^+ , które ograniczają dostęp kationów do ligandów na zasadzie sił odpychania (im niższe pH tym silniejsze odpychanie). Wraz ze wzrostem pH więcej grup obdarzonych ładun-

kiem ujemnym zostaje odsłoniętych, co sprzyja adsorpcji kationów metali na powierzchni komórek. Inaczej jest w przypadku chromu VI, który może występować w postaci anionu chromianowego. W tej sytuacji bardzo niskie pH ($\text{pH} = 2$) sprzyja elektrostatycznym oddziaływaniom pomiędzy grupami aminowymi, obdarzonymi w tym środowisku silnym ładunkiem dodatnim, a anionami chromianowymi (13). Środowisko neutralne lub zasadowe sprzyja immobilizacji metali poprzez ich wytrącenie w postaci trudno rozpuszczalnych soli metali. Jeśli precypitaty są związane z powierzchnią komórki, wydajność biosorpcji zwiększa się. Natomiast w przypadku precypitacji poza komórką, zmniejsza się pula metali zaadsorbowanych na powierzchni komórek. Ponadto wzrost pH powyżej 7 może powodować spadek efektywności wiązania na skutek degeneracji grzybni w środowisku alkalicznym (14).

2.2. Stężenie metalu

Biosorpcja metalu zwiększa się wraz ze wzrostem jego stężenia wyjściowego, po czym stabilizuje się. Dalsze zwiększanie stężenia metalu nie przynosi zwiększenia efektywności biosorpcji (15,16). W zależności od stężenia metalu może zmieniać się rodzaj wiązań, dominujący w procesie biosorpcji. Avery i Tobin (15) dowiedli, że w procesie wiązania metali ciężkich przez drożdże *S. cerevisiae*, przy niskim stężeniu metalu, dominują wiązania kowalencyjne (związane z wypieraniem H^+), natomiast wraz ze wzrostem stężenia metalu ważniejsze stają się oddziaływania elektrostatyczne (wymiana z jonami Mg^{2+} , Ca^{2+}).

Zależność pomiędzy wiązaniem cynku i ołowiu a ich stężeniem wyjściowym wykazano dla szczepu *V. marquandii*. Wzrost stężenia wyjściowego metalu z 5 do 10 mM spowodował najbardziej znaczące różnice w ilości metalu związanego przez grzybnię (wzrost efektywności wiązania o 35% – Zn^{2+} i o 250% – Pb^{2+}). Dalsze zwiększanie stężenia Pb^{2+} (10-30 mM) nie podnosiło znacząco ilości związanego metalu (badania własne, nie opublikowane).

2.3. Ilość cząsteczek biomasy

Innym czynnikiem wpływającym na efektywność biosorpcji jest ilość cząsteczek biomasy. Biosorpcja obniża się wraz ze wzrostem gęstości cząsteczek biosorbenta (9,17). Gadd (2) sugeruje, że stężenie biomasy wpływa na efektywność poprzez oddziaływania elektrostatyczne, niekorzystnie wpływające na miejsca wiążące, a ponadto przy wysokiej gęstości biomasy, ograniczone jest jej mieszanie i kontakt z metalem. Spadek efektywności biosorpcji metali wraz ze wzrostem ilości biomasy sorbenta zaobserwowano u *Rhizopus arrhizus* (18) i *Streptoverticillium cinnamomeum* (19).

2.4. Temperatura

Uważa się, że bierna biosorpcja nie zależy od temperatury inkubacji (20,21). Natomiast temperatura może wpływać pośrednio na wydajność wiązania metali poprzez wpływ na aktywność metaboliczną grzybni. Wiązanie ołowiu przez *V. marquandii* w zakresie temperatur 15-37°C przebiega na zbliżonym poziomie. Zaobserwowano natomiast, że wzrost temperatury inkubacji do 37°C powoduje obniżenie poboru cynku przez grzybnię o 30% w stosunku do układu kontrolnego (28°C) (badania własne, nie opublikowane).

2.5. Skład podłoża

Skład podłoża może wywierać wpływ zarówno na bierną sorpcję, jak i na aktywny pobór metalu (22,23). Jones i Gadd (24), a także Ross (25), zaobserwowali stymulujący wpływ glukozy na wiązanie metali. Jest to tłumaczone wzmożoną syntezą białek, biorących udział w transporcie metali poprzez błonę komórkową, a przez to zwiększeniem aktywnego poboru metali. Zbieżne wyniki otrzymali Avery i Tobin (26), świadczące o korzystnym wpływie glukozy obecnej w pożywce na aktywną, zależną od metabolizmu, akumulację strontu. Z kolei Lopez Errasquin i Vazques (27), uzyskali rezultaty przeciwne, świadczące o tym, że brak cukrów w podłożu podnosi efektywność wiązania metali przez *Trichoderma artroviride*. Autorzy tłumaczą to tym, że w obecności bogatego źródła węgla może istnieć aktywny mechanizm detoksykacji, redukujący ilość pobieranego metalu lub zwiększona biosorpcja metali jest spowodowana częściową autolizą komórek, zachodzącą po wyczerpaniu się źródeł węgla. Lepsze wiązanie metali może być spowodowane zwiększeniem się powierzchni autolizowanej ściany komórkowej, a także odsłonięciem miejsc wiążących metale, znajdujących się głębiej we wnętrzu komórki (26,27). Podobne wyniki uzyskano dla *V. marquandii*. Stwierdzono, że cynk jest wiązany na niskim poziomie (poniżej 40 mg/g suchej masy) w czasie hodowli grzybni na bogatym podłożu (Sabouraud z dodatkiem glukozy), natomiast na podłożu zawierającym wywar z siana z dodatkiem skrobi zaobserwowano wzrost wydajności wiązania metalu (do 84 mg/g suchej masy) (28).

2.6. Modyfikacje biomasy

Efektywność biosorpcji można zwiększyć poprzez różne modyfikacje biomasy. Omar i wsp. (23) donoszą, że etanol zwiększa możliwości biosorpcyjne. Sugerują, że biomasa odpadowa drożdży po procesie fermentacji alkoholowej może mieć dobre właściwości biosorpcyjne na skutek kontaktu komórek z wytwarzanym przez nie etanolem. Na przebieg biosorpcji chromu przez *Rhizopus nigricans* korzystnie wpływała

preinkubacja grzybni z 0,1 M roztworem kwasu (wzrost o 8-22% w porównaniu do układu kontrolnego). Jest to tłumaczone tym, że kwaśna hydroliza prowadzi do obdarzenia ładunkiem dodatnim grup aminocukrów i D-glukozaminy, co sprzyja wiązaniu anionu chromianowego (13,29). Z kolei modyfikacje biomasy tego szczepu roztworami słabych zasad prowadziły do redukcji biosorpcji chromu. Obniżenie zdolności biosorpcyjnych grzybni po alkalizacji jest najprawdopodobniej spowodowane hydrolizą białek wchodzących w skład ściany oraz deacylacją chityny, a także depolimeryzacją łańcucha glukanowego. Biosorpcja chromu (ładunek ujemny) przebiega inaczej niż innych metali (kationów). Dlatego w wielu przypadkach alkaliczna preinkubacja biomasy wzmacnia biosorpcję wielu metali, np. Pb – przez *Saccharomyces uvarum* (30), Cu – *Ganoderma lucidum* (31), Zn – *Aspergillus niger* (32) Pb, Cu i Cd – *A. niger* (33). Wyniki te są interpretowane w ten sposób, że potraktowanie biomasy ługiem uwalnia dodatkowe grupy chemiczne, biorące udział w wiązaniu kationów metali. Podobny stymulujący efekt uzyskano po wysuszeniu i sproszkowaniu grzybni (34).

2.7. Inne jony

Kationy i aniony, a także związki chelatujące, występujące w środowisku, mogą wpływać na przebieg wiązania metali zarówno stymulująco, jak i hamująco. W oddziaływaniach tych ważna jest chemiczna natura sorbowanego metalu oraz dodawanego jonu (promień jonowy, ładunek) oraz stężenie. Jeżeli mechanizm wiązania polega głównie na reakcji wymiany jonowej, dodatek innego kationu podnosi efektywność wiązania badanego metalu, np. Mg^{2+} wpływa korzystnie na biosorpcję cynku przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Rhizopus*, *Mucor* i *Penicillium* (4). Zhou (9) pisze, że aniony (chlorki, siarczany) i związki chelatujące (EDTA) ograniczają wiązanie metali. Hamujący wpływ jest tym większy, im większy jest promień jonowy liganda/metalu. Efekt inhibicji ujawnia się zwłaszcza przy niskim stężeniu metalu i wysokim stężeniu anionów. Wtedy wokół kationu metalu tworzy się warstwa anionów (kompleksowanie), która ogranicza adsorpcję kationu metalu do miejsc wiążących w ścianie komórkowej (9).

3. Desorpcja

Biosorpcja jest procesem odwracalnym. Metal związany w biomacie może być z niej wyłukany i odzyskiwany (w przypadku cenniejszych metali: złota, srebra, miedzi) lub bezpiecznie usunięty (kadm, ołów, chrom), a biomasa ponownie użyta do wiązania metali. Pisano już (rozdz. 2.1), że odczyn środowiska jest bardzo ważnym czynnikiem, wpływającym na efektywność biosorpcji. Środowisko kwaśne (pH około 2) nie tylko hamuje biosorpcję metali, ale także prowadzi do uwalniania więk-

szości metali z biomasy. Najczęściej używanymi desorbentami są słabe roztwory (0,1 M) kwasów nieorganicznych (HCl, H₂SO₄, HNO₃) (2,35). Oprócz kwasów, do desorpcji metali są często używane organiczne związki kompleksujące (np. EDTA). Ich zaletą jest to, że nie powodują destrukcji grzybni (co może się zdarzyć przy zbyt wysokim stężeniu desorbentów kwaśnych, a także alkalicznych) (2). Metale takie jak złoto, srebro i rtęć w pH = 2 są jednak silnie związane z powierzchnią komórek drobnoustrojów (2). Do desorpcji tych metali są potrzebne silne związki chelatujące, np. merkaptoetanol (36). Trzecią grupą desorbentów są węglany. Powodują wymywanie metali z grzybni w pH alkalicznym. Węglany są często używane do desorpcji radionuclidów. Kwaśny węglan sodu powodował bardzo efektywne (do 100%) wymywanie uranu z grzybni *R. arrhizus* (2,37).

4. Rola ściany komórkowej grzybów mikroskopowych w biosorpcji metali

Składniki ściany komórkowej grzybów: chityna (polimer N-acetyloD-glukozyminy) i chitozan (deacylowana pochodna chityny) są bogate w grupy obdarzone ładunkiem i to decyduje o ich dobrych właściwościach biosorpcyjnych (2,38). Sarret i wsp. (39) wykazali, że właściwości efektywnego wiązania cynku i ołowiu przez ścianę komórkową *Penicillium chrysogenum* są uwarunkowane obecnością grup fosforanowych. W wiązaniu chromu VI przez *Rhizopus nigricans* biorą udział przede wszystkim grupy aminowe, występujące w białkach i chitynie ściany (13). Skład procentowy chityny i chitozanu w ścianie komórkowej grzybów jest uzależniony nie tylko od przynależności gatunkowej, ale zmienia się w zależności od szczepu, wieku hodowli, składników podłoża i innych czynników (40) i może podlegać indukcji pod wpływem metali. Hefnawy i Razak (41) wykazali, że ilość protein, cukrów i chityny w ścianie *Fusarium oxysporum* wzrastała w próbie z dodatkiem miedzi (w porównaniu z układem kontrolnym).

W osłonach komórkowych grzybów występują często barwniki melaninowe, bogate w związki fenolowe, a także peptydy, węglowodany, węglowodory alifatyczne i kwasy tłuszczowe, a w nich wiele grup aktywnych w wiązaniu metali ciężkich (42).

W wiązaniu metali ciężkich przez ścianę komórkową drożdży *S. cerevisiae* udział biorą również proteiny (z licznymi grupami karboksylowymi) (43,44). Udowodniono to ten sposób, że po usunięciu białek ściany komórkowej pronaza, wiązanie metali spadło o 29,5% (43). Ponadto powierzchniowe białka i cukry występujące u flokulujących drożdży stwarzają dodatkowe miejsca do wiązania metali (23,45).

5. Podsumowanie

Stan środowiska naturalnego w Polsce, w ciągu ostatniego dziesięciolecia uległ znaczącej poprawie. Regulacje prawne wprowadziły bardziej restrykcyjne ograniczenia dotyczące emisji zanieczyszczeń i zawartości toksycznych substancji w ście-

kach, wodach, glebie. Uwarunkowania ekonomiczne spowodowały z kolei racjonalne gospodarowanie zasobami naturalnymi, w tym złożami metali oraz zamknięcie wielu nierentownych zakładów przetwórstwa metali. Niemniej jednak metale ciężkie, nagromadzone w środowisku w ciągu dziesięcioleci, wciąż są niebezpieczne dla organizmów żywych – ze względu na to, że krążą one w biocenozie i bardzo trudno jest je wyeliminować z łańcucha pokarmowego. Drobnoustroje izolowane z zanieczyszczonego otoczenia charakteryzują się często dużą tolerancją na wysokie stężenia toksycznych metali. Stwarza to możliwość praktycznego wykorzystania oddziaływań zachodzących w środowisku do jego oczyszczania z niebezpiecznych metali. Potencjał biotechnologiczny drobnoustrojów wciąż jeszcze nie w pełni pozostaje wykorzystany. Obecnie prowadzone prace badawcze zmierzają z jednej strony do szczegółowego poznania mechanizmów interakcji mikroorganizmów z metalami ciężkimi (zarówno procesów fizykochemicznych, jak i aktywnego transportu, akumulacji i detoksykacji metali w komórkach), a z drugiej nastawione są na uczynienie procesów zachodzących z udziałem drobnoustrojów bardziej efektywnymi i opłacalnymi, tak aby mogły być konkurencyjne w porównaniu do tradycyjnych, fizykochemicznych metod oczyszczania ścieków, wody i gleby.

Literatura

- Gadd G.M., White C., (1993), *Tibtech.*, 11, 353-359.
- Gadd G.M., (2001), *Biotechnology*, 10, Ed. Rehm H. J., 225-264, John Wiley & Sons, New York.
- Wojnowska-Baryła I., Klimiuk E., (1997), *Biotechnologia*, 4, 103-112.
- Fourest E., Canal C., Roux J. C., (1994), *FEMS Microbiol. Rev.*, 14, 325-332.
- Volesky B., May Phillips H. A., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 797-806.
- Długoński J., Słaba M., (1997), *Proc. Inter. Symp. Environ. Biotechnol.*, Eds. Verachteret H., Vestraete W., Oostende, 443-446.
- Długoński J., Słaba M., (1997 b), *Proc. Inter. Symp. Environ. Biotechnol.*, Eds. Verachteret H., Vestraete W., Oostende, 447-451.
- Słaba M., (2000), *Badania zdolności Verticillium marquandii IM6003 do wiązania metali ciężkich z użyciem grzybni i protoplastów jako modeli badawczych*. Praca doktorska, Uniwersytet Łódzki.
- Zhou J. L., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 686-693.
- Yin P., Yu Q., Jin B., Ling Z., (1999), *Wat. Res.*, 33, 1960-1963.
- Zhou J. L., Kiff R. J., (1991), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 52, 317-330.
- Bredy D., Duncan J. R., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 149-154.
- Bai R. S., Abraham T. E., (2002), *Water Research*, 36, 1224-1236.
- Lo W., Chua H., Lam K.-H., Bi S.-P., (1999), *Chemosphere*, 39, 2723-2736.
- Avery S. V., Tobin J. M., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2851-2856.
- Słaba M., Długoński J., (2002), *Post. Microbiol.*, 41, 167-183.
- Gadd G. M., White C., (1989), *Tetal – Microbe Interaction*, Eds. Poole R. K., Gadd G. M., 19-38, IRL Press, Oxford.
- Fourest E., Roux J.-C., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 399-403.
- Puranik P. R., Paknikar K. M., (1997), *J. Biotechnol.*, 55, 113-124.
- de Rome L., Gadd G. M., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 84-90.
- Chmielowski J., (1991), *Biotechnologia*, 3-4, 63-72.
- Iverson W. P., Brickman F. E., (1978), *Water Pollut. Microbiol.*, 2, 201-232.

23. Omar N. B., Merroun M. L., Arias Penalver J. M., Gonzalez Munoz M. T., (1997), *Chemosphere*, 35, 2277-2283.
24. Jones R. P., Gadd G. M., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 1-17.
25. Ross I. S., (1993), *Stress Tolerance of Fungi*, Ed. Lemke P. A., 97-125, Marcel Dekker, New York.
26. Avery S. V., Tobin J. M., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3883-3889.
27. Lopez Errasquin E., Vazquez C., (2003), *Chemosphere*, 50, 137-143.
28. Ślaba M., Długoński J., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1699-1704.
29. Nair R. K. G., Madhavan P., (1992), *Proc. 8th Carbohydrate Conf.*, Trivandrum, 59-65.
30. Ashkenazy R., Gottlieb L., Yannai S., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 1-10.
31. Muraleedharan T. R., Venkobachar C., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 320-325.
32. Luef E., Prey T., Kubicek C. P., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 688-692.
33. Kapoor A., Viraraghavan T., Cullimore D. R., (1999), *Bioresource Technol.*, 70, 95-104.
34. Ross I. S., Townsley C. C., (1986), *Immobilization of Ions by Biosorption*, Eds. Eccles H., Hunt S., Harwood, Chichester, 49-58.
35. Remteke P., (2000), *J. Environ. Biol.*, 21, 219-221.
36. Darnall D. W., Greene B., Henzel M. T., Hosea J. M., McPherson R. A., (1986), *Environ. Sci. Technol.*, 20, 206.
37. Tsezos M., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 973.
38. Tobin J. M., White C., Gadd G. M., (1994), *J. Ind. Microbiol.*, 13, 126-130.
39. Sarret G., Manceau A., Spadini L., Roux J. C., Hazemann J. L., Soldo Y., Eybert Berard L., Menthon-nex J. J., (1998), *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1648-1655.
40. Zhou J. L., Banks C. J., (1993), *Chemosphere*, 27, 607-620.
41. Hefnawy M. A., Razak A. A., (1998), *Folia Microbiol.*, 43, 453-458.
42. Fogarty R. V., Tobin J., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 311-317.
43. Bredy D., Stoll A. D., Starke L., Duncan J. R., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 3, 297-302.
44. Felse P. A., Panda T., (1999), *Bioproc. Engin.*, 20, 505-512.
45. Stratford M., (1992), *Yeast*, 8, 25-38.