

Alicja Kośmider\*, Katarzyna Czaczyk

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

Wpłynęło w sierpniu 2009 r.

1. Wprowadzenie. 2. Główne szlaki przemian metabolicznych glicerolu. 3. Biokonwersja glicerolu do produktów użytecznych przemysłowo. 3.1. 1,3-propanediol. 3.2. Dihydroksyacetone. 3.3. Kwas propionowy. 3.4. Kwas bursztynowy. 3.5. Kwas cytrynowy. 3.6. Kwas dokozaheksaenowy. 3.7. Wodór i etanol. 3.8. Inne produkty. 4. Podsumowanie

### Prospects of glycerol utilization in biotechnological processes

*Abstract:* Increasing biodiesel production generates a large quantity of crude glycerol. In spite of the wide use of pure glycerol in food, cosmetic and many other industries, it is too costly to refine crude glycerol to high purity. The possible use of raw glycerol as a carbon source in microbial growth media might contribute to solution of this problem. This report summarizes the currently available studies and possible ways of utilization of crude glycerol in microbiological processes. The paths leading to the bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol, dihydroxyacetone, propionic acid, succinic acid, citric acid, docosahexanoic acid, hydrogen, ethanol and other products, using various species of microorganisms, are presented. Moreover, the economic aspects of glycerol bioconversion to metabolites which are industrially useful are also described.

1. Introduction. 2. Principal metabolic pathways of glycerol utilization. 3. Bioconversion of glycerol to industrially useful products. 3.1. 1,3-propanediol. 3.2. Dihydroxyacetone. 3.3. Propionic acid. 3.4. Succinic acid. 3.5. Citric acid. 3.6. Docosahexanoic acid. 3.7. Hydrogen and ethanol. 3.8. Other products. 4. Summary

---

**Słowa kluczowe:** biodiesel, biokonwersja glicerolu, faza glicerynowa, glicerol, szlaki metaboliczne  
**Key words:** biodiesel, bioconversion of glycerol, crude glycerol, glycerol, metabolic pathways

---

## 1. Wprowadzenie

Surowce kopalniane są głównym źródłem energii na świecie. Malejące zasoby tych paliw, a co za tym idzie drastyczny wzrost cen oraz globalne ocieplenie i zanieczyszczenie środowiska powodują duże zainteresowanie odnawialnymi i niekonwencjonalnymi źródłami energii [47, 79]. Jednym z nich jest biopaliwo do silników wysokoprężnych, tzw. biodiesel, produkowany z olejów roślinnych i tłuszczów zwierzęcych na drodze transestryfikacji. W procesie tym otrzymuje się znaczne ilości odpadowej fazy glicerynowej zawierającej w swym składzie glicerol (propano-1,2,3-triol) (50–60%), metanol, mono- i diacyloglicerole, wolne kwasy tłuszczowe oraz mydła [64].

W 2004 roku w Unii Europejskiej wyprodukowano łącznie 1,93 mln ton biodiesla, a w roku 2010 przewiduje się zwiększenie produkcji do 10 mln ton [31]. W Polsce sektor estrów metylowych znajduje się jeszcze w fazie wstępnego rozwoju. Zdolności produkcyjne naszego kraju na koniec 2006 roku w zakresie tego biopaliwa wynosiły 180–200 tys. ton. Wzrost zdolności produkcyjnych w roku 2007 wynosił 900–1000 ton.

W roku 2010 w Polsce przewiduje się wzrost produkcji biodiesla do poziomu 1,5 mln ton [20].

Tak duża produkcja biodiesla niesie za sobą poważny problem z zagospodarowaniem ok. 200–300 tys. ton fazy glicerynowej rocznie, której zbyt odgrywać będzie istotną rolę w kształtowaniu cen tego biopaliwa [20, 47]. Jak wykazały badania optymalizacyjne, zwiększenie wydajności biodiesla powoduje pogorszenie jego jakości, a z kolei poprawa jakości biodiesla odbywa się kosztem pogorszenia jakości fazy glicerynowej. Dodatkowo skład tego odpadu glicerynowego zmienia się w zależności od rodzaju zastosowanego tłuszczu i technologii [19, 45, 72].

Wykorzystanie fazy glicerynowej jest ograniczone ze względu na obecność w niej metanolu w granicach 5–9%. Z uwagi na ilość otrzymywanej fazy glicerynowej z przewidywanej produkcji biodiesla, stosowanie jej np. jako nawozu mogłoby doprowadzić do zanieczyszczenia powietrza metanolem [19]. Najwięksi producenci biodiesla oczyszczają surowy glicerol stosując zabiegi filtracyjne, chemiczne oraz frakcyjną destylację próżniową [25, 44, 76]. Czysty glicerol można wykorzystać w przemyśle spożywczym (do słodzenia

---

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; tel. (61) 846 60 23; e-mail: kosmider@up.poznan.pl

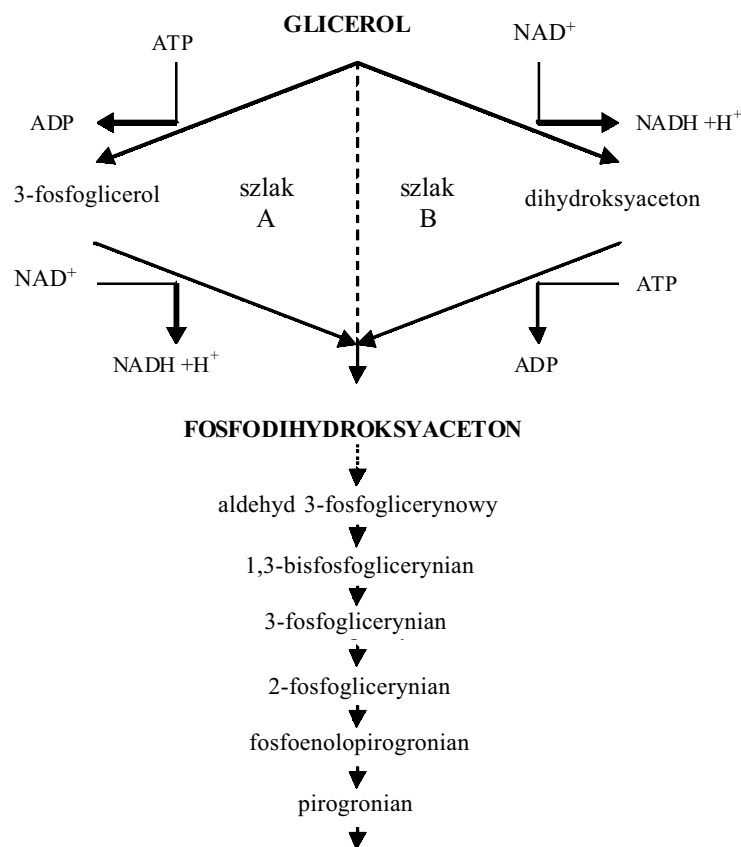
likierów), kosmetycznym (jako środek nawilżający), włókienniczym, farmaceutycznym, celulozowo-papierniczym, do produkcji nitrogliceryny lub jako dodatek paszowy do karmienia trzody chlewnej [48, 63, 64].

Rozwiązaniem problemu zagospodarowania surowego glicerolu może być wykorzystanie fazy glicerynowej lub częściowo tylko oczyszczonego glicerolu jako składnika podłoża do hodowli drobnoustrojów, których metabolity są użyteczne przemysłowo. Niesie to za sobą konieczność poznania szlaków metabolicznych, które odgrywają istotną rolę w biokonwersji glicerolu przez drobnoustroje. Istotnym czynnikiem poznawczym jest także optymalizacja warunków hodowli dla poszczególnych rodzajów mikroorganizmów.

## 2. Główne szlaki przemian metabolicznych glicerolu

W świecie *Prokaryota* odkryto dwa główne szlaki przemian biochemicznych glicerolu [41], które przedstawiono na schemacie (rys. 1). Pierwszy z nich (szlak A) polega na fosforylacji glicerolu przy pomocy enzymu kinazy glicerolowej do 3-fosfoglicerolu, który to związek poddany działaniu dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej powoduje przemianę w fosfodihydroksyacetone. Fosfodihydroksyacetone powstaje także w trochę

odmiennym szlaku metabolicznym glicerolu (szlak B), gdzie najpierw następuje utlenienie glicerolu do dihydroksyacetonu, a następnie jego fosforylacja. Dalsze przemiany fosfodihydroksyacetonu są jednakowe dla obu szlaków metabolicznych (proces glikolizy) [41]. Związek ten przekształcony zostaje do aldehydu 3-fosfoglicerynowego za pomocą izomerazy triofofosforanowej, ponieważ dalszy przebieg reakcji możliwy jest tylko przy udziale tej aldozy. Ilość zużywanego w dalszych etapach reakcji aldehydu 3-fosfoglicerynowego determinuje intensywność przemian fosfodihydroksyacetonu. Następnie w wyniku działania dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego powstaje 1,3-bisfosfoglicerynian, który dzięki wiązaniu fosforanowemu o wysokiej energii powoduje wytworzenie cząsteczki ATP (adenozynotrifosforanu) oraz 3-fosfoglicerynianu. Reakcja ta zachodzi przy udziale kinazy fosfoglicerynianowej. Dzięki aktywności fosfogliceromutazy, 3-fosfoglicerynian przekształcony zostaje w 2-fosfoglicerynian, a obecność enolazy powoduje konwersję 2-fosfoglicerynianu do fosfoenolopirogronianu. W następnej reakcji, kinaza pirogronianowa przenosi grupę fosforylową z fosfoenolopirogronianu na ADP (adenozynodifosforan), dzięki czemu otrzymujemy ATP i pirogronian. W zależności od rodzaju drobnoustroju, pirogronian (po przekształceniu w ace-



Rys. 1. Podstawowe szlaki biokonwersji glicerolu u drobnoustrojów [schemat uproszczony wg 6, 41, 69]

tylo-koenzym A) ulega dalszym przemianom (tlenowym lub beztlenowym). W warunkach tlenowych pirogronian ten jest utleniany do ditlenku węgla i wody w cyklu kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa). W warunkach beztlenowych (procesy fermentacyjne), przemiany pirogronianu polegają na jego bezpośredniej lub pośredniej redukcji, której towarzyszy utlenianie NADH+H (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy – forma zredukowana) do NAD (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy) [6, 69].

Drobnoustroje, które potrafią zużyć glicerol jako źródła węgla i energii, są zdolne do wykorzystania również innych szlaków metabolicznych, nie zawsze do końca poznanych i wyjaśnionych (np. u niektórych bakterii halofilnych wysokie stężenie soli w podłożu hodowlanym hamuje aktywność zarówno dehydrogenazy fosfoglicerolowej jak i kinazy glicerolowej, a jednak mikroorganizmy te zdolne są do wykorzystania glicerolu jako źródła węgla) [41, 68].

Charakterystyczny jest również szlak metaboliczny fermentacji propionowej z udziałem glicerolu, który rozpoczyna się jego utlenieniem do dihydroksyacetonu, ufosforylowaniem do fosfodihydroksyacetonu, a w następnej kolejności na przemianach charakterystycznych dla procesu glikolizy prowadzących do powstania pirogronianu (rys. 1, szlak B). Kolejny etap przemian polega na transkarboksylacji pirogronianu do szczawiooctanu przy udziale kompleksu CO<sub>2</sub>-biotyna, a następnie jego redukcja przez jabłczan i fumaran do bursztynianu. Przy udziale ATP i koenzymu A (CoA) powstaje w dalszej kolejności sukcylo-CoA, a ten przekształcany jest w metylomalonylo-CoA przez izomerazę metylomalonylo-CoA i witaminę B<sub>12</sub>. Powstały metylomalonylo-CoA przy udziale transkarboksylazy ulega dekarboksylacji do propionylo-CoA, który zostaje rozszczepiony na pirogronian i CoA. W czasie tego procesu CO<sub>2</sub> jest przeniesiony na pirogronian dzięki aktywności biotyny transkarboksylazy [35, 79]. Wysoki stopień redukcji glicerolu przyczynia się do zwiększonej syntezy kwasu propionowego ze względu na dążenie do utrzymania w równowadze potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, zgodnego z charakterem szlaku metabolicznego wykorzystywanego przez bakterie propionowe [3]. Podczas fermentacji propionowej z udziałem glicerolu, oprócz kwasu propionowego, stwierdza się także produkcję innych metabolitów tj. kwasów bursztynowego, octowego, mrówkowego oraz propanolu [3, 27]. W przypadku zastosowania konwencjonalnych źródeł węgla nie stwierdzono powstawania dwóch ostatnich metabolitów [38]. Obecność kwasu mrówkowego i propanolu w medium hodowlanym można wytłumaczyć koniecznością wyrównania potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w komórce i tym samym wytwarzanie bardziej zredukowanych metabolitów [3]. Mechanizmy i szlaki

metaboliczne odpowiedzialne za taki profil fermentacji nie zostały jak dotąd poznane.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się wykorzystaniu narzędzi inżynierii genetycznej i metabolicznej w regulacji szlaków przemian biochemicznych glicerolu. Sterowanie metabolizmem komórki za pomocą technik rekombinacji DNA pozwala na osiągnięcie wyższych wydajności i/lub produktywności metabolitów, wykorzystanie innych źródeł węgla, przeprowadzanie bezpośrednich syntez produktów (pominięcie etapów pośrednich) lub otrzymanie całości nowych substancji [49, 53]. Bakterie *Clostridium butyricum* przekształcają glicerol do 1,3-propanodiolu (1,3-PDO) bez udziału B<sub>12</sub>-zależnej dehydratazy glicerolowej (zjawisko to nie występuje u innych gatunków z rodzaju *Clostridium*). Przeprowadzono badania nad biosyntezą 1,3-PDO, w których przeniesiono geny kodujące ten proces z *Clostridium butyricum* do *Clostridium acetobutylicum* i wykazano możliwość produkcji tego alkoholu bez udziału B<sub>12</sub>-zależnej dehydratazy glicerolowej, z wyższą wydajnością i produktywnością niż szczep niezmodyfikowany [23]. Analogiczne postępowanie pozwoliło na wykorzystanie glicerolu do produkcji m.in. kwasu 3-hydroksypropionowego przez rekombinowany szczep *Escherichia coli* (przeniesienie genów z *Klebsiella pneumoniae*) [59], efektywnej biosyntezy 1,3-PDO przez *E. coli* (przeniesienie genów z *Citrobacter freundii*) [86] czy produkcji aminokwasu lizyny przez *Corynebacterium glutamicum* (ekspresja genów kodujących syntezę kinazy glicerolowej i dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej z *E. coli*) [61]. Badania nad biokonwersją glicerolu przez drobnoustroje z wykorzystaniem tych technik intensywnie się rozwijają, a ich postęp pobudzany jest istniejącymi lub potencjalnymi komercyjnymi ich zastosowaniami [2, 21, 50, 55].

Biokonwersja glicerolu (lub fazy glicerynowej) przez drobnoustroje daje możliwości ominięcia niedogodności wynikających z zastosowania tego surowca w procesach katalizy chemicznej. Wykorzystanie glicerolu w syntezach organicznych wymaga często stosowania w procesie technologicznym wysokich temperatur i/lub wysokich ciśnień (otrzymywanie akroleiny, alkoholu alilowego, *tert*-butylowych eterów glicerolu), stwarza konieczność oczyszczania fazy glicerynowej lub w konsekwencji powoduje otrzymanie produktu o niskiej jakości [14, 32, 33, 78].

Ze względu na wyższy poziom redukcji glicerolu w porównaniu do konwencjonalnych substratów, oczekuje się wyższej wydajności jego przemian w procesach biotechnologicznych [27]. Przekształcenie glicerolu w szlaku glikolitycznym do fosfoenolpirogronianu lub pirogronianu powoduje wytworzenie podwójnej ilości redukujących ekwiwalentów w porównaniu z ilością, która powstałaby podczas metabolizmu glukozy lub ksylozy. Glicerol dostarcza więc więcej

energii do dalszych przemian [77, 79]. Z ekonomicznego punktu widzenia korzystniejsze jest użycie glicerolu w procesach beztlenowych, ze względu na niższe koszty aparatury w porównaniu do tlenowych odpowiedników, a także ze względu na mniejsze zużycie energii [22].

### 3. Biokonwersja glicerolu do produktów użytecznych przemysłowo

#### 3.1. 1,3-propanodiol

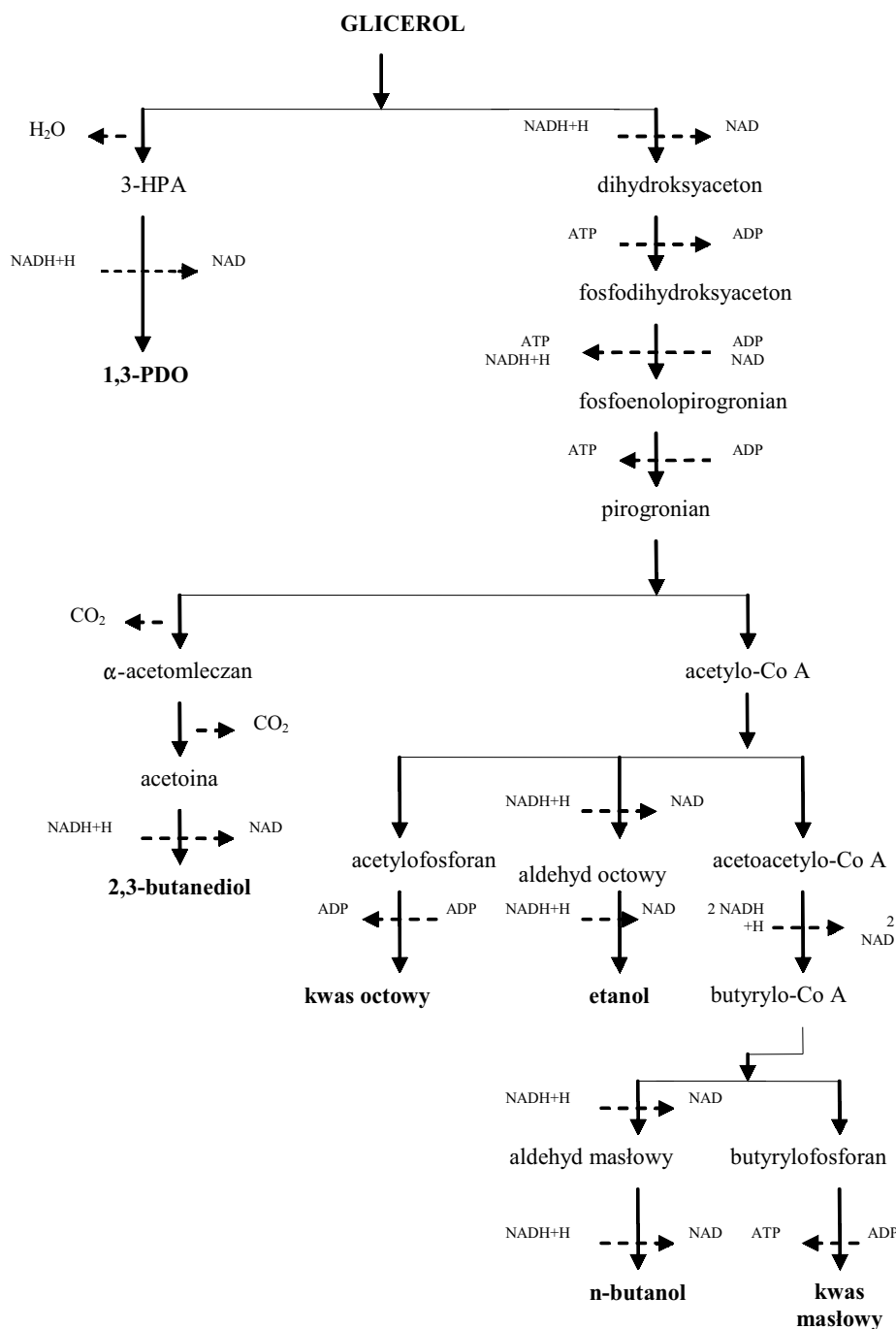
Jednym z produktów użytecznych przemysłowo, które można otrzymać na drodze mikrobiologicznych przemian glicerolu, jest 1,3-PDO. Do tego celu stosuje się z powodzeniem takie drobnoustroje jak: *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, a także *Clostridium pasterianum* oraz *C. butyricum* [4, 7, 8, 13, 23, 26, 28, 56, 60]. W praktyce przemysłowej 1,3-PDO jest wykorzystywany jako monomer do produkcji poliestrów (np. tetraftalanu poli-propylenowego), poliuretanów, smarów, rozpuszczalników organicznych (np. dioksanu, izobutenu). Stwierdzono, że materiały powstałe z reakcji polimeryzacji 1,3-PDO charakteryzują się dobrą biodegradowalnością, większym bezpieczeństwem przemysłowym, lepszą specyficznością i są tańsze [4, 31]. Związek ten znalazł również szereg zastosowań w przemyśle kosmetycznym (jako środek nawilżający i neutralizujący) i farmaceutycznym (jako środek stabilizujący) [52, 77, 85].

Analiza biochemiczna produktów reakcji biokonwersji glicerolu do 1,3-PDO, jako głównego produktu reakcji, wskazuje na możliwość przebiegu tych przemian z wykorzystaniem dwóch szlaków metabolicznych [88]. Świadczy to o dążeniu do utrzymania w układzie równowagi potencjału oksydacyjno-redukcyjnego bez zewnętrznych akceptorów elektronów [43, 79]. Przemiany biochemiczne glicerolu w procesie fermentacji z wykorzystaniem bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i rodzaju *Clostridium* przedstawiono na rys. 2. W redukującym szlaku procesu fermentacji glicerolu powstaje 1,3-PDO. W przemianie tej mamy do czynienia z reakcją hydrogenolizy (uwodornienie monomerów), w której glicerol zostaje przekształcony za pomocą  $B_{12}$ -zależnej dehydratazy glicerolowej (dehydratazy z udziałem koenzymu  $B_{12}$ ), do aldehydu 3-hydroksypropionowego (3-HPA). Kolejnym etapem jest przemiana 3-HPA przy udziale 1,3-PDO dehydrogenazy do 1,3-PDO [7, 79]. W szlaku oksydacyjnym glicerol ulega przemianom do produktów charakterystycznych dla procesu glikolizy [7, 13]. Przy wykorzystaniu bakterii z rodzaju *Clostridium* powstaje kwas masłowy, *n*-butanol, etanol i kwas octowy. Dwa ostatnie metabolity oraz 2,3-butanodiol otrzymuje się stosując bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [7].

Przeprowadzono obszerne badania nad biokonwersją glicerolu do 1,3-PDO z udziałem bakterii *Clostridium butyricum* [26]. Zastosowano w nich fermentację okresową, w której użyto trzy rodzaje podłoży hodowlanych: pożywkę o optymalnej zawartości składników pokarmowych, pożywkę o ograniczonej podaży związków odżywczych oraz zubożone podłoże, w którym biotynę zastąpiono ekstraktem drożdżowym. W celu określenia optymalnej zawartości źródła azotu, do pożywki o ograniczonej podaży związków odżywczych dodawano zróżnicowane ilości chlorku amonu. W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano, że dodatek biotyny w ilości 4  $\mu\text{g/L}$  był wystarczający do przeprowadzenia efektywnej biokonwersji glicerolu i surowej gliceryny do 1,3-PDO (65–67 g/L). Stwierdzono także, że w podłożu o ograniczonej podaży składników odżywczych, dostępność źródła azotu (stosunek C:N poniżej 81:1) była czynnikiem limitującym wykorzystanie glicerolu. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że bakterie *C. butyricum* są zdolne do biokonwersji odpadowej fazy glicerynowej na tym samym poziomie, co w przypadku podłoża o optymalnej zawartości składników pokarmowych, bazującego na ekstrakcie drożdżowym [26].

Zdolność bakterii *Clostridium butyricum* do konwersji glicerolu do 1,3-PDO (0,55 g/g glicerolu) potwierdzono także w innych badaniach [82, 83]. Obliczona teoretyczna wydajność procesu osiągnęła poziom 0,72 mol 1,3-PDO/mol glicerolu i nie obserwowano powstawania metabolitów ubocznych (wodoru, kwasu masłowego).

W celu poprawy wydajności procesu fermentacji w systemie okresowym, zaproponowano model kinetyczny oparty na równaniu Luedekinga-Pireta opisującym korelację pomiędzy wzrostem komórki, zużyciem substratu i wytwarzaniem metabolitów końcowych [10]. Stwierdzono, że nieliniowy sposób zasilania hodowli glicerolem spowodował lepszą produktywność i wyższe stężenie 1,3-PDO, niż w przypadku stosowania okresowego lub ciągłego wprowadzania glicerolu do pożywki. Poprawę efektywności procesu fermentacji glicerolu do 1,3-PDO przez bakterie *Klebsiella pneumoniae* stwierdzono także stosując dodatek fumaranu do pożywki w ilości 5 mM/L [42]. W prezentowanych doświadczeniach zaobserwowano, że związek ten powodował szybszy wzrost komórek *K. pneumoniae*. Stwierdzono, że dodatek fumaranu może powodować przyspieszenie biosyntezy 1,3-PDO poprzez wzrost aktywności enzymów, takich jak dehydrogenaza glicerolowa i 1,3-PDO oksydoreduktaza. Fumarany powodowały zmniejszenie stosunku ekwiwalentów  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , w związku z czym więcej zredukowanej energii mogło zostać wykorzystane w biokonwersji aldehydu 3-hydroksypropionowego do 1,3-PDO.



Rys. 2. Biochemiczne przemiany glicerolu w procesie fermentacji [schemat uproszczony wg 6, 7, 13, 69]

### 3.2. Dihydroksyacetone

Dihydroksyacetone jest najprostszym przedstawicielem ketoz, wykorzystywanym w przemyśle kosmetycznym jako składnik samoopalaczy. Biokonwersja glicerolu do tego związku na drodze mikrobiologicznej możliwa jest przy wykorzystaniu bakterii *Gluconobacter oxydans* [1, 5, 9, 12, 73]. W eksperymentach z hodowlą okresową szczepu bakteryjnego *G. oxydans* CCM 1783, w których badano wpływ dostępności tlenu i wartości pH podłoża hodowlanego na wydaj-

ność procesu fermentacji, stwierdzono zmniejszenie produkcji dihydroksyacetone w kwasowym środowisku reakcji oraz przy koncentracji tlenu poniżej  $4 \times 10^{-4}$  mol/L [73]. Wykazano także, że biosynteza dihydroksyacetone przez *G. oxydans* powoduje zwolnienie tempa wzrostu komórek [9]. Całkowitą inhibicję wzrostu komórek zaobserwowano przy koncentracji dihydroksyacetone na poziomie 61 g/l. Przeprowadzone badania wskazują na konieczność opracowania technologii produkcji dihydroksyacetone z jednoczesnym usuwaniem tego metabolitu.

### 3.3. Kwas propionowy

Mikroorganizmy nie wytwarzające 1,3-PDO zdolne są do przemiany glicerolu w inne użyteczne przemysłowo metabolity [77, 79]. Jedną z możliwości wykorzystania odpadowego glicerolu, jest jego utylizacja do kwasu propionowego w procesie fermentacji z wykorzystaniem bakterii z rodzaju *Propionibacterium* [3, 27, 79]. Szlaki metaboliczne biokonwersji glicerolu do kwasu propionowego omówiono w rozdz. 2. Kwas propionowy znalazł szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym i spożywczym. Przede wszystkim wykorzystuje się go do konserwacji pasz (siano, kiszonki i zboże), a także do utrwalania żywności, głównie do wyrobów piekarskich i serów [36].

W badaniach z wykorzystaniem bakterii propionowych: *Propionibacterium acidipropionici* i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, porównywano efektywność procesu fermentacji stosując jako źródło węgla w pożywce glukozę lub glicerol [27]. Najwyższą produkcją kwasu propionowego przez badane drobnoustroje cechowała się hodowla zasilana okresowo glicerolem. Wydajność procesu z użyciem drobnoustrojów *P. acidipropionici* i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* była odpowiednio o 49% (0,79 mol kwasu propionowego/mol glicerolu) i 45% (0,58 mol kwasu propionowego/mol glicerolu) wyższa w porównaniu z hodowlą zasilaną glukozą.

### 3.4. Kwas bursztynowy

Kwas bursztynowy wykorzystywany jest do produkcji żywic syntetycznych oraz biodegradowalnych polimerów [67, 81]. Związek ten może być produktem pośrednim reakcji charakterystycznych dla cyklu kwasów trikarboksylowych. Możliwe jest także jego pozyskanie w procesie fermentacji z wykorzystaniem glicerolu jako źródła węgla [24]. Wykorzystanie *Anaerobispirillum succiniproducens* do konwersji glicerolu do kwasu bursztynowego pozwoliło na uzyskanie wydajności procesu na poziomie 133% (w porównaniu do glukozy). Stosunek wagowy kwasu bursztynowego do kwasu octowego (produkt uboczny) wynosił 25,8:1 i był aż 6,5-krotnie wyższy, niż przy zastosowaniu glukozy jako źródła węgla [39]. Połączenie glukozy i glicerolu w medium hodowlanym, spowodowało zmniejszenie produkcji kwasu bursztynowego i wzrost produkcji kwasu octowego. Wykorzystanie glicerolu przez komórki *A. succiniproducens* uzależnione było od ilości ekstraktu drożdżowego dodanego do pożywki. Najwyższą produkcją kwasu bursztynowego charakteryzowała się hodowla, którą okresowo zasilano glicerolem i ekstraktem drożdżowym. W tym wariantcie doświadczenia zaobserwowano 160% wydajność procesu i stosunek wagowy kwasu bursztynowego do octowego wynoszący 31,7:1 [39].

### 3.5. Kwas cytrynowy

Kwas cytrynowy jest jednym z kwasów organicznych, których produkcja przemysłowa opiera się na procesach biotechnologicznych. Do tego celu wykorzystuje się głównie pleśnie z gatunku *Aspergillus niger* [71]. Kwas cytrynowy stosuje się jako naturalny konserwant żywności, a także do nadawania odpowiednich cech smakowych produktom żywnościowym i napojom. Używany jest też jako łagodny środek czyszczący, stabilizator oraz przeciwutleniacz [62]. Światowa produkcja kwasu cytrynowego kształtuje się na poziomie 1,4 mln ton, a głównymi substratami używanymi do jego produkcji są: melasa, sacharoza i glukoza [71].

Drobnoustrojami wykazującymi zdolność do biosyntezy kwasu cytrynowego są także drożdże *Yarrowia lipolytica* [49]. Mogą one wykorzystywać do tego celu różne źródła węgla (alkany, glukozę, etanol, oleje roślinne) [18]. Są także zdolne do przeprowadzenia biokonwersji glicerolu do kwasu cytrynowego i izocytrynowego [29, 40, 56, 64, 68].

Zastosowanie odpadowego glicerolu do produkcji kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* jest jednak zagadnieniem nowym i stosunkowo mało poznany. Badania potwierdziły, że drożdże te potrafią wykorzystać odpadowy glicerol do syntezy dużych ilości tego kwasu (do 195 g/l), z dobrą wydajnością (0,62 g/g glicerolu) i dużą selektywnością (powyżej 97%) [64–66]. Prowadzone są także badania nad wykorzystaniem mutantów drożdży *Y. lipolytica* w celu zwiększenia wydajności tego procesu oraz nad prowadzeniem hodowli skojarzonych (np. produkcja kwasu cytrynowego i erytroli) [65, 66].

### 3.6. Kwas dokozaheksaenowy

W ostatnich latach pojawiły się także doniesienia na temat produkcji kwasu dokozaheksaenowego (DHA, 22:6 *n*-3) w procesie heterotroficznej fermentacji z wykorzystaniem alg *Schizochytrium limacinum*. Kwas dokozaheksaenowy jest wielonienasyconym kwasem omega-3, który znalazł zastosowanie w leczeniu chorób serca, różnego rodzaju typów raka, schizofrenii i choroby Alzheimera [11, 70]. Wykazano także możliwość zastosowania odpadowego glicerolu do produkcji DHA [11]. Przy stężeniu glicerolu w pożywce na poziomie 7,5–10% oraz dodatku źródła azotu oraz soli mineralnych uzyskano wydajność DHA na poziomie 4,9 g/L pożywki.

### 3.7. Wodór i etanol

Produkcja wodoru i etanolu z glicerolu na drodze mikrobiologicznej możliwa jest dzięki zastosowaniu w procesie fermentacji drobnoustrojów *Enterobacter*

*aerogens* [30, 46, 54, 57, 76]. Ito i wsp. [30] wykorzystali szczep *E. aerogens* HU-101 do produkcji wodoru i etanolu z wykorzystaniem glicerolu jako źródła węgla. Proces fermentacji prowadzono w systemie ciągłym z użyciem komórek adherujących do złoża upakowanego w bioreaktorze. Glicerol rozpuszczano w syntetycznym medium w celu przyspieszenia tempa utylizacji tego związku. Dodatek ekstraktu drożdżowego i tryptonu do podłoża spowodował przyspieszenie produkcji wodoru i etanolu. Stwierdzono, że produktywność wodoru na czystym glicerolu wynosiła 80 mmol/L z wydajnością etanolu 0,8 mmol/mol glicerolu. Analogiczne eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem surowej gliceryny, dla której produktywność procesu była niższa i wynosiła 30 mmol wodoru/L/h. Zastosowanie komórek immobilizowanych na nośniku ceramicznym pozwoliło zwiększyć produktywność procesu do 63 mmol wodoru/L/h, a wydajność produkcji etanolu wyniosła wówczas 0,85 mol/mol glicerolu [30].

### 3.8. Inne produkty

W dostępnej literaturze prezentowane są również badania dotyczące biokonwersji glicerolu do innych metabolitów. Wykorzystując grzyby *Mortierella isabellina* (ATHUM 2935) stwierdzono możliwość biokonwersji fazy glicerynowej do tłuszczu mikrobiologicznego, osiągając wydajność 4,4 g/100 g glicerolu (51% tłuszczu w suchej masie komórek) [56]. Uzyskana frakcja lipidowa zawierała 18% kwasu g-linolenowego. Glicerol wykorzystano również do produkcji biosurfaktantów [58, 84]. Zastosowano drożdże *Pseudozyma antarctica* (JCM 10317<sup>T</sup>) do biosyntezy glikolipidów na podłożu w którym jedynym źródłem węgla był glicerol (wydajność procesu 13,6 g/100 g glicerolu) [51]. Glicerol wykorzystano także do syntezy aminokwasów: L-lizyny i L-glutaminy przez *Corynebacterium glutamicum* [61]. Glicerol utylizowano również w mikrobiologicznej produkcji barwników takich jak prodigiozyna i astaksantyna [69]. Przy wykorzystaniu bakterii *Serratia marcescens* wyprodukowano 583 mg/L prodigiozyny, stosując glicerol jako główne źródło węgla w pożywce [74]. Utylizacji glicerolu do astaksantyny w ilości 33,7 mg/L dokonano z kolei przy użyciu drożdży *Phaffia rhodozyma* [37]. Glicerol zastosowano również do produkcji polihydroksyalkanolanów (PHA) [34].

## 4. Podsumowanie

Pozyskiwanie energii ze źródeł odnawialnych jest jednym ze sposobów rozwiązania problemu wyczerpywania się światowych zasobów konwencjonalnych

surowców, takich jak węgiel, gaz ziemny czy ropa naftowa. Jest to również metoda na ograniczenie niekorzystnych zmian środowiskowych (m.in. emisji dwutlenku węgla) jakie niesie za sobą stosowanie tradycyjnych technik pozyskiwania energii. Problem stanowi jednak koszt uzyskiwania energii ze źródeł odnawialnych, który znacznie przewyższa ceny paliw tradycyjnych [17, 31, 77]. Wszystko to sprawia, że ludzkość już teraz poszukuje rozwiązań alternatywnych.

Przewidywany wzrost produkcji tzw. biodiesla, zarówno w Polsce jak i na świecie, niesie za sobą konieczność zagospodarowania produktów ubocznych tego procesu (m.in. fazy glicerynowej), co może w znaczący sposób przyczynić się do obniżenia cen tego paliwa. W niniejszym opracowaniu przedstawiono możliwości wykorzystania glicerolu lub fazy glicerynowej jako substratu dla procesów mikrobiologicznych, których metabolity są użyteczne przemysłowo. W tabeli I przedstawiono przykłady biokonwersji glicerolu przez różne szczepy drobnoustrojów, wraz z typem hodowli, rodzajem wykorzystywanego substratu oraz maksymalną wydajnością procesu.

Pomimo coraz większej wiedzy na temat drobnoustrojów zdolnych do utylizacji glicerolu, pojawiają się przesłanki mogące spowodować ograniczenie ich wykorzystania w przemyśle. Czynnikiem limitującym w takich przypadkach jest patogenność drobnoustrojów, wymagania dotyczące warunków hodowli, konieczność drogiej suplementacji pożywek, jak również ograniczone stosowanie technik genetycznych w warunkach przemysłowych i słaba wiedza na temat fizjologii mutantów [3, 83, 87, 88]. Mikroorganizmem o bardzo dobrze poznanej fizjologii poddawany z powodzeniem manipulacjom genetycznym, jest *Escherichia coli* [3]. Przez ostatnie 80 lat uważano tę bakterię za niezdolną do fermentacji glicerolu. Dowiedziano jednak, że przy zapewnieniu odpowiednich warunków procesu, takich jak kwaśny odczyn środowiska, usuwanie powstającego w wyniku fermentacji gazowego wodoru i zapewnienie odpowiedniego składu podłoża, bakterie *E. coli* mogą metabolizować glicerol w sposób całkowicie beztlenowy [3, 15, 80]. Zdolne są wówczas do wytworzenia etanolu, kwasu bursztynowego, kwasu octowego i kwasu mlekowego [11, 15]. Obecnie trwają prace badawcze nad poznaniem szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za te uzdolnienia. Biokonwersja glicerolu jest także możliwa przy użyciu rekombinowanych szczepów *E. coli* [55, 59].

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że skład fazy glicerynowej, powstającej przy produkcji biodiesla, jest istotnym czynnikiem warunkującym biokonwersję glicerolu przez drobnoustroje. Substancje zawarte w tej frakcji, inne niż glicerol, mogą mieć inhibujący (lub stymulujący) wpływ na przebieg tego procesu. Autorzy badań ograniczają się najczęściej do

Przykłady biokonwersji glicerolu przez drobnoustroje

| Produkt               | Wykorzystywane mikroorganizmy                                 | Typ hodowli                                | Substrat <sup>1</sup>   | Wydajność procesu <sup>2</sup>    | Piśmiennictwo |
|-----------------------|---|--|---|-----------------------------------|---------------|
| 1,3-PDO               | <i>Clostridium butyricum</i>                                  | okresowa (beztlenowa)                      | glicerol – 129 g/L<br>faza glicerynowa – 121 g/L<br>(67% glicerolu) | 0,63 mol/mol<br>0,66 mol/mol      | [26]          |
|                       | <i>Clostridium butyricum</i>                                  | ciągła (z zawracaniem komórek, beztlenowa) | glycerol – 56 g/L   | 0,48 g/g                          | [8]           |
|                       | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                  | okresowo-dopływowa                         | glicerol – 20 g/L<br>faza glicerynowa – 20 g/L<br>(85% glicerolu)   | 0,49 mol/mol<br>0,46–0,47 mol/mol | [52]          |
|                       | <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>(szcep XJ-Li)                 | okresowa<br>okresowo-dopływowa             | glicerol – 20 g/L<br>glicerol – 20 g/L                              | 0,75 mol/mol<br>0,70 mol/mol      | [85]          |
| dihydroksyaceton      | <i>Gluconobacter oxydans</i>                                  | okresowa                                   | glicerol – 50 g/L   | 0,64 mol/mol                      | [73]          |
| kwas propionowy       | <i>Propionibacterium acidipropionici</i>                      | okresowa                                   | glicerol – 20 g/l   | 0,84 g/g                          | [3]           |
|                       | <i>Propionibacterium acidipropionici</i>                      | okresowa                                   | glicerol – 20 g/l   | 0,79 mol/mol                      | [26]          |
|                       | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> | okresowa                                   | glicerol – 20 g/l   | 0,58 mol/mol                      | [27]          |
| kwas bursztynowy      | rodzina <i>Pasteurellaceae</i><br>(szcep DD1)                 | okresowa (beztlenowa)                      | glicerol – 10 g/L   | 1,2 g/g                           | [67]          |
|                       | <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> (algi)           | okresowa                                   | glicerol – 20 g/L   | 1,3 g/g                           | [39]          |
| kwas cytrynowy        | <i>Yarrowia lipolytica</i><br>(mutanty octanowe)              | okresowa                                   | faza glicerynowa – 200 g/L<br>(55% glicerolu)                       | 0,67 g/g glicerolu                | [66]          |
|                       | <i>Yarrowia lipolytica</i><br>(szcep Wratislavia K1)          | okresowo-dopływowa                         | glicerol – 250 g/L  | 0,44 g/g                          | [65]          |
| kwas dokozaheksaenowy | <i>Schizochytrium limacinum</i> (algi)                        | okresowa<br>faza glicerynowa – 75 g/L      | glicerol – 75 g/L<br>(85% glicerolu)                                | 171,37 mg/g<br>170,45 mg/g        | [11]          |
| etanol                | <i>Enterobacter aerogenes</i><br>HU-101                       | ciągła z komórkami<br>immobilizowanymi     | faza glicerynowa – 1,7 g/L<br>(41% glicerolu)                       | 0,85 mol/mol                      | [30]          |

<sup>1</sup> Podano rodzaj zastosowanego substratu (glicerol lub faza glicerynowa) oraz jego stężenie w pożywce hodowlanej, dla fazy glicerynowej podano także zawartość czystego glicerolu.

<sup>2</sup> Wydajność procesu podano w g substratu/g produktu (lub mol/mol); w przypadku fazy glicerynowej wydajność procesu przeliczono na czysty glicerol.

podania zawartości czystego glicerolu w tej frakcji i/lub jej pochodzenia [52, 66]. Jest to niewystarczające do kompleksowej oceny możliwości wykorzystania fazy glicerynowej w procesach mikrobiologicznych.

Z ekonomicznego punktu widzenia, utylizacja odpadowego glicerolu na drodze biokonwersji mikrobiologicznej jest szansą dla przemysłu paliwowego. Możliwe jest to dzięki wykorzystaniu odpowiednich grup drobnoustrojów, mogących fermentować glicerol do użytecznych przemysłowo metabolitów, z dobrą wydajnością, bez konieczności oczyszczania fazy glicerynowej. Istotnym aspektem jest też cena jaką powstały produkt może osiągnąć na rynkach światowych. Przy bardzo niskich kosztach otrzymywania fazy glicerynowej (60–80 € za tonę) wysoka cena metabolitów może warunkować opłacalność takich procesów. Produkty takie jak 1,3-PDO czy kwas cytrynowy są stosunkowo tanie (1,5–2 \$ za kg i 0,8–1,2 \$ za kg,

odpowiednio), ale ceny innych metabolitów są znacznie bardziej atrakcyjne (np. erytrol – 4,5 \$ za kg, tłuszcz zawierający kwas  $\gamma$ -linolenowy – 40–50 \$ za kg) [29, 56, 65].

W chwili obecnej biodiesel i bioetanol są znacznie droższe od paliw otrzymywanych z ropy naftowej. O kosztach biopaliw decyduje przede wszystkim cena surowca, która z kolei zależy od rodzaju tego surowca, stosowanej technologii, a także aktualnych podatków i ulg (podatek VAT, akcyza, opłata paliwowa) [16, 19, 20]. Produkcja biopaliw może być opłacalna pod warunkiem sprzedaży nie tylko paliwa, ale także produktów ubocznych powstających w trakcie jego wytwarzania (słomy, śruty poekstrakcyjnej, glicerolu, czy mydeł). Perspektywy wykorzystania glicerolu lub fazy glicerynowej w procesach mikrobiologicznych są bardzo duże, ale wymaga to jeszcze dalszych badań dotyczących przede wszystkim doboru szczepów



(ewentualnych ich modyfikacji genetycznych), dokładnego poznania szlaków metabolicznych utylizacji glicerolu oraz optymalizacji warunków hodowli.

## Piśmiennictwo

- Adlercreutz P.: Oxygen supply to immobilized cells: 5. Theoretical calculations and experimental data for the oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with oxygen or p-benzoquinone as electron acceptor. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 223–232 (1986)
- Bahrami A., Shojaosadati S.A., Khalilzadeh R., Farahani E., Vasheghani F. E.: Two-stage glycerol feeding for enhancement of recombinant hG-CSF production in a fed-batch culture of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1081–1085 (2008)
- Barbirato F., Chedaille D., Bories A.: Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 441–446 (1997)
- Barbirato F., Himmi E.H., Conte T., Bories A.: 1,3-propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops Prod.* **7**, 281–289 (1998)
- Bauer R., Katsikis N., Varga S., Hekmat D.: Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **28**, 37–43 (2005)
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: *Biochemia*, Wyd. Nauk. PWN., Warszawa, 2007
- Biebl H., Menzel K., Zeng A.-P., Deckwer W.-D.: Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 289–297 (1999)
- Biebl H., Zeng A.-P., Menzel K., Deckwer W.-D.: Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 24–29 (1998)
- Bories A., Claret C., Soucaille P.: Kinetic study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* **26**, 243–248 (1991)
- Cheng, K.K., Liu H.J., Liu D.H.: Kinetic analysis of aerobic batch fermentation of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Modern Chem. Ind.* **25**, 185–188 (2005)
- Chi Z., Pyle D., Wen Z., Frear C., Chen S.: A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.* **42**, 1537–1545 (2007)
- Claret G., Salmon J. M., Romieu C., Bories A.: Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 359–365 (2004)
- Deckwer W.-D.: Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 143–149 (1995)
- Deshmane V.G., Gogate P.R., Pandit A.B.: Process intensification of synthesis process for medium chain glycerides using cavitation. *Chem. Eng. J.* **145**, 351–354 (2008)
- Dhamandi Y., Murarka A., Gonzalez R.: Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 821–829 (2006)
- Dobek T.K.: Efektywność ekonomiczna i energetyczna produkcji biodiesla w zależności od stosowanych technologii uprawy rzepaku ozimego. *Acta Agrophysic.* **11**, 369–379 (2008)
- Fernando S., Adhikari S., Kota K., Bandi R.: Glycerol based automotive fuels from future biorefineries. *Fuel*, **86**, 2806–2809 (2007)
- Finogenova T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Chernyavskaya O.G.: Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects. *Appl. Biochem. Microbiol.* **41**, 418–425 (2005)
- Gaca J., Prus A., Adamowicz A., Wejherowska G.: Ekologiczne uwarunkowania produkcji biodiesla. *Czysta Energia*, **11**, 12–13 (2002)
- Gaca J.: Faza glicerynowa po produkcji biodiesla – odpady czy cenny surowiec? *Czysta Energia*, **11**, 34–35 (2006)
- Ghosalkar A., Sahai V., Srivastava A.: Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresour. Technol.* **99**, 7906–7910 (2008)
- Gonzalez R., Murarka A., Dharmadi Y., Yazdani S.S.: A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Met. Eng.* **10**, 134–245 (2008)
- Gonzalez-Pajuelo M., Meynial-Salles I., Mendes F., Andrade J.C., Vasconcelos I., Soucaille P.: Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab. Eng.* **7**, 329–336 (2005)
- Gottschalk G.: *Bacterial metabolism*. Wyd. Springer-Verlag, New York, 1986
- Gui M.M., Lee T.T., Bhatia S.: Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, **33**, 1646–1653 (2008)
- Himmi E.H., Bories A., Barbirato F.: Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresour. Technol.* **67**, 123–128 (1999)
- Himmi E.H., Bories A., Boussaid A., Hassani L.: Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 435–440 (2000)
- Huang H., Gong C.S., Tsao G.T.: Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98–100**, 687–69 (2002)
- Imandi S.B., Bandaru V.V.R., Somalanka S.R., Garapati H.R.: Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enz. Microb. Technol.* **40**, 1367–1372 (2007)
- Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui K., Nishio N.: Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 260–265 (2005)
- Karinen R.S., Krause A.O.I.: New biocomponents from glycerol. *Appl. Catal. A.* **306**, 128–133 (2006)
- Kijęński J., Jamróz M.E., Tęcza W.: Badania nad wykorzystaniem glicerolu w syntezie organicznej. Cz.2. Konwersja glicerolu do jego tert-butylowych eterów. *Przem. Chem.* **4**, 282–285 (2007)
- Kijęński J., Migdał A.R., Jamróz E., Tęcza W., Śmigiera E., Osawaru O., Nemptusiak M.: Badania nad wykorzystaniem glicerolu w syntezie organicznej. Cz.1. Konwersja glicerolu do akroleiny. *Przem. Chem.* **4**, 278–281 (2007)
- Koller M., Bona R., Braunegg G., Hermann C., Horvat P., Kroutil M., Martinz J., Neto J., Pereira L., Varila P.: Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, **6**, 561–565 (2005)
- Kujawski M.: Aktywność enzymatyczna i przydatność technologiczna bakterii fermentacji propionowej, praca habilitacyjna, Zesz. Nauk. Akad. Rol.-Tech. Olszt., Olsztyn, (1996)

36. Kumar S., Babu B.V.: A Brief Review on Propionic Acid: A Renewal Energy Source. *Proc. Natl. Conference on Environmental Conservation (NCEC-2006)*, September 1-3 September 1-3, 459-464 (2006)
37. Kusdiyantini E., gaudin P., Goma G., Blanc P.J.: Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. Lett.* **20**, 929-934 (1998)
38. Leaver F.W., Wood H.G., Sternholm R.: The fermentation of three carbon substrate by *Clostridium propionicum* and *Propionibacterium*. *J. Bacteriol.* **70**, 521-530 (1955)
39. Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N.: Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 41-48 (2001)
40. Levinson W.E., Kurtzman C.P., Kuo T.M.: Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enz. Microb. Technol.* **41**, 292-295 (2007)
41. Lin E.C.C.: Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 535-578 (1976)
42. Lin R., Liu H., Hao J., Cheng K., Liu D.: Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1755-1759 (2005)
43. Malinowski J.J.: Reactive extraction for downstream separation of 1, 3-propanediol. *Biotechnol. Prog.* **16**, 76-79 (2000)
44. Marchetti J.M., Errazu A.F.: Technoeconomic study of supercritical biodiesel production plant. *Energ. Convers. Manage.* **49**, 2160-2164 (2008)
45. Marchetti J.M., Miguel V.U., Errazu A.F.: Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. *Fuel Proc. Technol.* **89**, 740-748 (2008)
46. Markov S. A., Bazin M. J., Hall D.O.: The potential of using cyanobacteria in photo bioreactors for hydrogen production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **52**, 59-86 (1995)
47. Markowska J.: Rynek biomasy i biopaliw w Polsce. *Przem. Spoż.* **7**, 19-21 (2007)
48. Miesiąc I.: Metody zagospodarowania frakcji glicerynowej z procesu metanolizy oleju rzepakowego. *Przem. Chem.* **8-9**, 1045-1047 (2003)
49. Mijts B.N., Schmidt-Dannert C.: Engineering of secondary metabolic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 597-602 (2003)
50. Mlicková K., Roux E., Athenstaedt K., d'Andrea S., Daum G., Chardot T., Nicaud J.M.: Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3918-3924 (2004)
51. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D.: Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317<sup>T</sup>. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 78-81 (2007)
52. Mu Y., Teng H., Zhang D.-J., Wang W., Xiu Z.-L.: Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1755-1759 (2006)
53. Nakamura C.E., Whited G.M.: Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 454-459 (2003)
54. Nakashimada Y., Rachman M.A., Kakizono T., Nishio N.: H<sub>2</sub> production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int. J. Hydrogen Energ.* **27**, 1399-1405 (2002)
55. Nikel, P.I., Pettinari M.J., Galvagno M.A., Méndez B.S.: Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* arcA mutants in microaerobiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2614-2620 (2006)
56. Papanikolau S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis G.: Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after biodiesel (fatty acid methyl-esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biom. Bioenerg.* **32**, 60-71 (2008)
57. Rachman M.A., Furutani Y., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N.: Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 358-363 (1997)
58. Rahman K.S.M., Rahman T.J., McClean S., Marchant R., Bannat I.M.: Rhamnolipid biosurfactant production by strain of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* **18**, 1277-1281 (2002)
59. Raj S.M., Rathnasingh C., Jo J.-E., Park S.: Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Proc. Biochem.* **43**, 1440-1446 (2008)
60. Reiman A., Biebl H., Deckwer W.-D.: Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 359-363 (1998)
61. Rittmann D., Lindner S.N., Wendisch V.F.: Engineering of a glycerol pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6216-6222 (2008)
62. Roehr M., Kubicek C.P., Kominek J., Citric acid (w) Biotechnology: Products of primary metabolism. 2<sup>nd</sup> ed., vol. 6, red. Roehr M., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1996, s. 312-345
63. Roszkowski A.: Płynne paliwa roślinne-ocena stanu badań i perspektywy. *Prob. Inż. Rol.* **4**, 93-106 (1998)
64. Rymowicz W., Juszczyk P., Rywińska A., Żarowska B., Musiał I.: Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol.* **2**, 46-54 (2005)
65. Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W.: Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chem. Pap.* **62**, 239-246 (2008)
66. Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczyk P.: Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.* **60**, 391-394 (2006)
67. Scholten E., Dägele D.: Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnol. Lett.* **30**, 2143-2146 (2008)
68. Sher J., Elevi R., Mana L., Oren A.: Glycerol metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter rubber*. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 211-215 (2004)
69. Silva G.P., Mack M., Contiero J.: Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* **27**, 30-39 (2009)
70. Simopolous A.P.: Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 560S-9S (1999)
71. Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Pandey A.: New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 141-149 (2006)
72. Srivastava P.K., Verma M.: Metryk ester of karanja oil as an alternative renewable source energy. *Fuel*, **87**, 1673-1677 (2008)
73. Svitel J., Sturdík E.: Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 351-155 (1994)
74. Tao J., Wang X., Shen Y., Wei D.: Strate Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 969-972 (2005)

75. Thomson J.C., He B.: Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstock. *Appl. Eng. Agri.* **22**, 261–265 (2006)
76. Tsygankov A. A., Hirata Y., Miyake M., Asada Y., Miyake J.: Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 575–578 (1994)
77. Willke T., Vorlop K.-D.: Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 131–142 (2004)
78. Xia Y.M., Fang Y., Zhang K.C., Shi G.Y., Brown J.J.: Enzymatic synthesis of partial glycerol caprate in solvent-free media. *J. Mol. Catal. B*, **23**, 3–8 (2003)
79. Yazdani S.S., Gonzalez R.: Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 213–219 (2007)
80. Yazdani S.S., Gonzalez R.: Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Met. Eng.* **10**, 340–351 (2008)
81. Zeikus J.G.: Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 423–464 (1980)
82. Zeng, A.P., Biebl H., Deckwer W.D.: Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: Recent Progress. *ACS Symposium Series*, **666**, 264–279 (1997)
83. Zeng, A.P.: Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Biosyst Eng.* **14**, 169–175 (1996)
84. Zhang G., Wu Y., Oian X., Meng Q.: Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **6B**, 725–730 (2005)
85. Zhang G.L., Ma B.B., Xu X.L., Wang L.: Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Eng. J.* **37**, 256–260 (2007)
86. Zhang X., Li Y., Zhunge B., Tang X., Shen W., Rao Z., Fang H.Y., Zhunge J.: Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1,3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 945–952 (2006)
87. Zhang X.M., Li Y., Zhunge B., Tang X.M., Shen W., Rao Z.M., Fang H.Y., Zhunge J.: Optimization of 1,3-propanediol production by novel recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 1075–1078 (2006)
88. Zhu M.M., Lawman P.D., Cameron D.C.: Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. *Biotechnol. Prog.* **18**, 694–699 (2002)