

***Kluyveromyces marxianus* termotoleráns élesztő CBS712 törzsének jellemezése**

**Erdei Éva^{1,3} – Molnár Mónika¹ –
Gyémánt Gyöngyi² – Harangi János² –
Nagy János³ – Pócsi István¹**

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar,

¹Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék, Debrecen

²Biokémiai Tanszék, Debrecen

³Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma,

Mezőgazdaságtudományi Kar,

Földhasznosítási, Műszaki és Területfejlesztési Intézet, Debrecen

erdeie@yahoo.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A bioetanol előállításakor technológiailag kedvezőbb, ha termotoleráns mikroorganizmusok alkalmazásával, magas hőmérsékleten folyik a termelés. A termotoleráns élesztők közül kiemelkedő a *Kluyveromyces marxianus* hőtűrése, melynek IMB3 törzsét az iparban általában 45 °C-on alkalmazzák. A projekt távlati célja a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs genetikai módosítása, a jelenleg alkalmazottnál magasabb hőmérsékleten történő etanol termelés érdekében. Ehhez elsőként a CBS712 törzs jellemzését szükséges elvégezni, különös tekintettel a növekedés hőmérsékleti határának, és az etanol termelés mennyiségének meghatározására. A törzs növekedésének hőmérsékleti határát YPD tápoldatban 48 °C-ban határoztuk meg. A hőmérséklet 45 °C fölé emelése a sejtek életképességének exponenciális csökkenésével járt. Az etanol termelést rázatott lombikban, MYFM tápoldatban, oxigén limitált körülmények között, változó glükóz koncentráció (12-20%) és hőmérséklet (45-47 °C) mellett teszteltük. Előkísérleteinkből megállapítható, hogy a glükóz koncentráció emelése fokozta az etanol termelést. A legmagasabb glükóz koncentráció mellett mért etanol termelés (~ 5%) nem különbözött egymástól a tesztelt hőmérsékleteken (45, 46 és 47 °C), mely megfigyelés jelzi a törzs termotoleranciájának fokozásában rejlő lehetőséget.

Kulcsszavak: *Kluyveromyces marxianus*, etanol, termotolerancia

SUMMARY

Fermentation at high temperature with application of thermotolerant microorganisms is a technological advantage in bioethanol production. Among the yeasts, *K. marxianus* has outstanding thermotolerance. The industrial application of the IMB3 strain occurs usually at 45°C. The final aim of our project is the genetic modification of the *K. marxianus* CBS712 strain in order to achieve ethanol production at higher temperature than the currently applied. This requires the characterization of the CBS712 strain, with special attention to the determination of the temperature limit of its growth and the amount of the ethanol produced. The temperature limit of growth was 48°C in YPD medium. Elevation of the temperature above 45°C led to an exponential drop of the cell viability. Ethanol production was tested in shaking flasks, in MYFM medium, under oxygen limited conditions, applying variable concentrations of glucose (12–20%) and different temperatures (45–47 °C). Preliminary results have revealed that the elevation of glucose concentration increased the amount of ethanol produced. The amount of ethanol (appr. 5%)

produced at the highest glucose concentration was not different at the tested temperatures (45, 46 and 47 °C). The observation indicates the potential in raising the thermotolerance of the strain.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, ethanol, thermotolerance

BEVEZETÉS

A bioetanol az egyik legfontosabb megújuló energiaforrás, amely részben kiválthatja a fosszilis energiaforrásokat, illetve fokozott alkalmazásával csökkenthető a fosszilis energiaforrások felhasználásával előidézett környezetszennyezés. A mezőgazdasági termékek és melléktermékek felhasználására alapozott termelés az utóbbi években érte el azt a technológiai színvonalat, hogy a bioetanol a kőolajtermékek mellett gazdaságilag is reális alternatívává vált az energiapiacra.

Bioetanol előállítására alapanyagként általában burgonya- vagy kukoricakeményítőt használnak. Mellettük egyéb természetesen növények, például rozs, tritikálé, csicsóka, árpa vagy zab felhasználása is előtérbe kerülhet, amivel az eltérő termőképességű földterületek termelésbe vonása is megoldható lenne. A keményítő alapú bioetanol gyártás mellett igen nagy jelentősége van a cellulóz alapú előállításnak, amire elsősorban a fás szárú növények alkalmasak. Az alapanyagok a bioetanol előállítására nem csupán természetesen növények lehetnek, hanem nagyon fontos szerep hárul a mezőgazdasági hulladékokra. Ezek felhasználásakor (szőlővenyige, kukoricaszár, gyümölcsfák nyeseidékei, fakéreg, szalma, faipari hulladékok) maga az alapanyag előállítása nem jelent plusz ráfordítást illetve környezeti terhelést.

A bioetanol előállítására általában *Saccharomyces cerevisiae* törzseket használnak. A *Saccharomyces cerevisiae* a genetikában is régóta ismert és kutatott modellszervezet, így sok kidolgozott molekuláris biológiai technika létezik a vizsgálatára, manipulálására. Hátrányai között szerepel, hogy magas hőmérsékleten (40-45 °C) veszt életképességéből, így az bioetanol gyártása során ehhez kell alkalmazkodni, ami plusz költséget jelent. Technológiailag kedvezőbb, illetve gazdaságosabb, ha termotoleráns mikroorganizmusok alkalmazásával, magasabb hőmérsékleten folyik az etanol termelés.

Ennek egy formája az alapanyag enzimes emésztését és a mikroorganizmussal történő fermentálást összevonó ún. SSF (simultaneous saccharification and fermentation) technológia. A termelés gazdaságosabb ugyanis, ha az enzimes kezelés után nem kell a rendszert az élesztőgomba miatt nagymértékben lehűteni, és úgy folytatni a fermentálással, hanem egy termotoleráns fajjal, viszonylag magas hőmérsékleten (50-55 °C) egybevonható a két lépés.

A termotoleráns élesztők között kiemelkedő a *Kluyveromyces marxianus* hőtűrése. A *Kluyveromyces marxianus* törzsek nagy biotechnológiai jövővel néznek szembe, például széles szubsztrát spektrumuk, hőtoleranciájuk, valamint magas növekedési rátájuk miatt (Singh et al., 1998). Ezen törzsek alkalmas etanol termelőnek bizonyultak SSF és immobilizációs kísérletekben is, mely ipari felhasználására nézve biztató (Love et al., 1998). Az ipari alkalmazását leíró irodalom 45 °C-on történő felhasználását említi. Más irodalmi adatok viszont arra utalnak, hogy a faj hőtűrésének kiaknázásában még reális lehetőség van, azaz elképzelhető, hogy jobban meg lehetne közelíteni a keményítő hidrolízését végző enzimek optimális működési hőmérsékletét.

Irodalmi adatok szerint az egyik legjobb hőtűrésű törzs az IMB3 (Banat és Marchant, 1995). A törzs eredeti izolátuma képes 52 °C-on növekedni és 50 °C-on etanol termelni. Eredetileg ezzel a törzssel szerettünk volna dolgozni, de ezt már az iparban is használják, és csak az érintett kutatócsoportok számára hozzáférhető. Az NCYC (National Collection of Yeast Cultures) törzscentrum a CBS712 törzset ajánlja kutatómunka céljára. E törzs előnyös lehet, hiszen genomjának 20%-át random módon már megszekvenálták (Llorente et al., 2000) és termotoleranciája is figyelemre méltó.

A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 homotallikus törzs; spóráinak mutagenézise jó lehetséges kiindulópontja a törzs genetikai manipulációjának. A CBS 712 törzs megszekvenált genomjában azonosított kb. 1300 génből csupán 42-nek nincs *Saccharomyces cerevisiae* homológja. E tény azért jelentős, mert a két faj hasonlósága miatt elvileg jól alkalmazható módszer az ismert *Saccharomyces cerevisiae* gének próbaként történő felhasználása *Kluyveromyces marxianus* gének azonosítására, illetve valószínűsíti a jól kidolgozott *Saccharomyces cerevisiae* technikák *Kluyveromyces marxianus*-ra történő adaptálásának sikerességét.

A PhD project távlati célja, a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs olyan genetikai módosítása, amely által az iparban a szokásosnál lényegesen magasabb hőmérsékleten jelentős mennyiségű etanolt termeltethetünk. A spórák mutagenizálása és a jó hőtűrő és magas etanol mennyiséget termelő klónok izolálása előtt elengedhetetlen a kiindulási törzs minél részletesebb jellemzése. E dolgozat vizsgálja a *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs hőtűrését, etanol termelő képességét és a fermentációs idő optimalizálását.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kluyveromyces marxianus CBS712 törzs (NCYC 1026) tenyésztése és fenntartása

A törzset YPD és YM tápagon 30 °C-on tenyésztjük a napi gyakorlati munka céljára. Az YPD táptalaj összetétele: 1% élesztő kivonat (BBLTM), 2% pepton (Difco), 2% glükóz, 2% agar. Az YM táptalaj összetétele: 0,3% élesztő kivonat (BBLTM), 0,3% maláta kivonat 0,5% pepton (Difco), 1% glükóz, 2% agar. Az YPD és az YM táptalajok pH-ja egyaránt 5,5. A törzset a törzsgyűjteményben 20% glicerollal kiegészített YM tápoldatban -70 °C-on tároljuk.

Kluyveromyces marxianus CBS712 törzs növekedésének vizsgálata

A növekedési vizsgálatokhoz használt YPD tápoldatoknak az összetétele és pH-ja megegyezett az YPD táptalaj összetételével, az agar kivételével. Az előtenyészethez 1 telepet YPD tápoldatba inokuláltunk (100 ml-es lombik 10 ml táptalajt tartalmazott). Az inkubálás körülményei: 30 °C, 24 óra, 200 rpm. A törzs növekedését az optikai denzitás fotometriás meghatározásával követtük. Az előtenyészet optikai denzitásának meghatározása után (600 nm-en: OD₆₀₀:2.1.) a főtenyészethez 100 ml YPD tápoldatot OD₆₀₀:0,1 optikai denzitásnak megfelelő sejtmennyiséggel inokuláltunk; a főtenyészetet 500 ml-es lombikban rázattuk. A növekedés monitorozása 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C és 48 °C-on történt.

Életképességi vizsgálatok

A növekedési görbék készítése során a 24 órás mintákból életképességi vizsgálatot végeztünk, félig kvantitatív módszerrel, a következő módon: az adott 24 órás tenyészet 10-szeres hígítási sorozatából (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) 20 µl-eket cseppentettünk egy YPD tápagra.

Az etanol termelés vizsgálata

Az etanol termeltetést MYFM tápoldatban (3 g/l élesztő kivonat (BBLTM), 2 g/l pepton (Difco), 2 g/l KH₂PO₄, 2 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l MgSO₄*7H₂O, 1 g/l MgSO₄*H₂O) végeztük, amely tápoldatot kiegészítettük az adott kísérletnek megfelelő mennyiségű glükózzal. Az előtenyészethez 1 telepet MYFM tápoldatban inokuláltunk (100 ml-es lombik 50 ml táptalajt és 10 g/l glükózt tartalmazott). Az inkubálás körülményei: 45 °C, 24 óra, 200 rpm. A 250 ml-es lombikban rázatott 100, illetve 200 ml tápoldatot, amelyet a megfelelő mennyiségű glükózzal kiegészítettünk, 3 ml előtenyészettel inokuláltuk. Az etanol koncentráció meghatározása 12, 16, 20, 24 illetve 48 órás tenyészetekből történt. A törzs etanol termelését 45 °C, 46 °C, 47 °C-on vizsgáltuk. Az előkísérletek során a lombikokban az anaerobot megközelítő környezet megteremtését szilikon gumidugó használatával értük el, az oxigénlimitáltságot pedig a fordulatszám

csökkentésével. Az etanol mérése gázkromatográffal történt HP-5-ös oszlopon 1% izopropanolt használva belső standardként.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kluyveromyces marxianus CBS712 törzs növekedésének és életképességének vizsgálata

Morfológiai meghatározás

A *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzsről ismert, hogy komplex tápoldatban bimbózó és pszeudohifás növekedésre is képes. E morfológiai jellemzőt YPD táptalajon tesztelve azt tapasztaltuk, hogy a pszeudohifás növekedés az idősebb tenyészetekre jellemző (1. ábra).

1. ábra: A: Pszeudohifás növekedés, B: Bimbózó növekedés

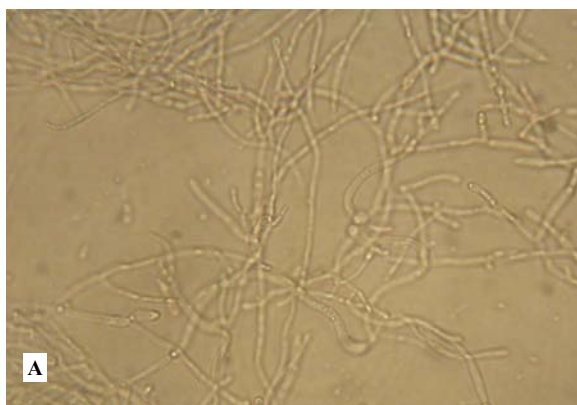


Figure 1: A: Growth of pseudohypha, B: Budding of yeast cells

Növekedés vizsgálata

A törzs növekedését először az élesztőgenetikában rutinszerűen használt körülmények között, azaz 30 °C-on teszteltük. Az etanol termelés szempontjából fontos hőmérsékleti tartomány eléréséig a növekedés hőmérsékleti függését csak néhány hőfokon, a hőmérséklet nagy léptékű emelésével teszteltük.

Intenzív növekedést tapasztaltunk 30 °C, 35 °C és 40 °C-on is (2. ábra). Figyelemre méltó, hogy a 45 °C-on való növekedés nem tér el drasztikusan az alacsonyabb hőmérsékleteken (35 °C és 40 °C) tapasztalhatótól, amely azért fontos, mert a *Kluyveromyces marxianus* iparban már használt törzseit (IMB3, IMB4) is 45 °C-on tesztelik illetve alkalmazzák (Hack és Marchant, 1998b; Banat és Marchant, 1995). 45 °C fölött fokenként teszteltük a növekedést. A növekedés logaritmikus fázisa 46 °C és 47 °C-on már hanyatlik, de nem túl erőteljesen. A 48 °C-on való abszolút minimális növekedése miatt (OD₆₀₀:0,156 kiinduló tenyészet, 24 órás tenyészet OD₆₀₀:0,315) a hőmérsékleti határt ebben a fokban határoztuk meg (2. ábra). Minden egyes hőmérsékletnél 3 mérés átlagát és szórását tartalmazza az ábra.

Életképesség vizsgálata

A növekvő hőmérséklet életképességre gyakorolt hatását az élő sejtszám meghatározására alkalmas félig kvantitatív drop teszttel határoztuk meg. A teszt az élő sejtszám abszolút meghatározása nélkül, egymáshoz viszonyítva adja meg, hogy a hőmérséklet emelésével milyen az életképesség csökkenésének a mértéke. A 3. és 4. ábrán jól látszik, hogy 45 °C fölött 1 fokos hőmérsékletemelkedés 10-szeres életképességbeli csökkenést vont maga után, kivéve a 47 °C-ról 48 °C-ra való emelkedést, mert itt már 100-szoros volt az életképességbeli csökkenés.

Az etanol termelés vizsgálata

Az iparban és a kísérletekben az etanol termelés hőmérséklete általában a 45 °C (Hack és Marchant, 1998a; Love et al., 1998), így mi is ezen a hőmérsékleten kezdtük el a termeltetést. Előkísérleteinkben először a viszonylag alacsony glükóz koncentráció hatását vizsgáltuk, illetve teszteltük, hogy az oxigén limitáció különböző mértéke hogyan befolyásolja az etanol termelést (1. táblázat).

Előkísérletünk során az oxigén limitáció tekintetében 2 paraméterrel dolgoztunk: 100 ml és 200 ml tenyészettel a 250 ml-es lombikban, valamint a 16 órás tenyésztést követően, a lombik szilikon gumidugóval történő bedugaszolásával közel anaerob körülményeket idéztünk elő, különösen a 200 ml táptalajt tartalmazó lombikok esetében. A kisebb térfogatú kultúra, amely inkább aerob körülményeket teremtett az élesztő számára, jobban segítette az etanol termelést, ezért a következő kísérletünkben már ezzel a paraméterrel dolgoztunk. Alacsony glükóz koncentráció mellett az etanol termelés csekély; a 100 g/l glükóz koncentrációnál termelt etanol mennyisége is elmarad az irodalmi értékek alapján várható koncentrációtól (Hack és Marchant, 1998a, b).

A következő előkísérletben a glükóz koncentráció emelése mellett (120 g/l, 140 g/l, 160 g/l, 180 g/l, 200 g/l) teszteltük a fermentálás célszerű időtartamát (2. táblázat). A glükóz koncentráció emelése

egyértelműen fokozta az etanol termelést; megállapítható továbbá, hogy az etanol termelés maximuma már 24 óra körül detektálható oxigén limitált körülmények között.

2. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs növekedése különböző hőmérsékleten

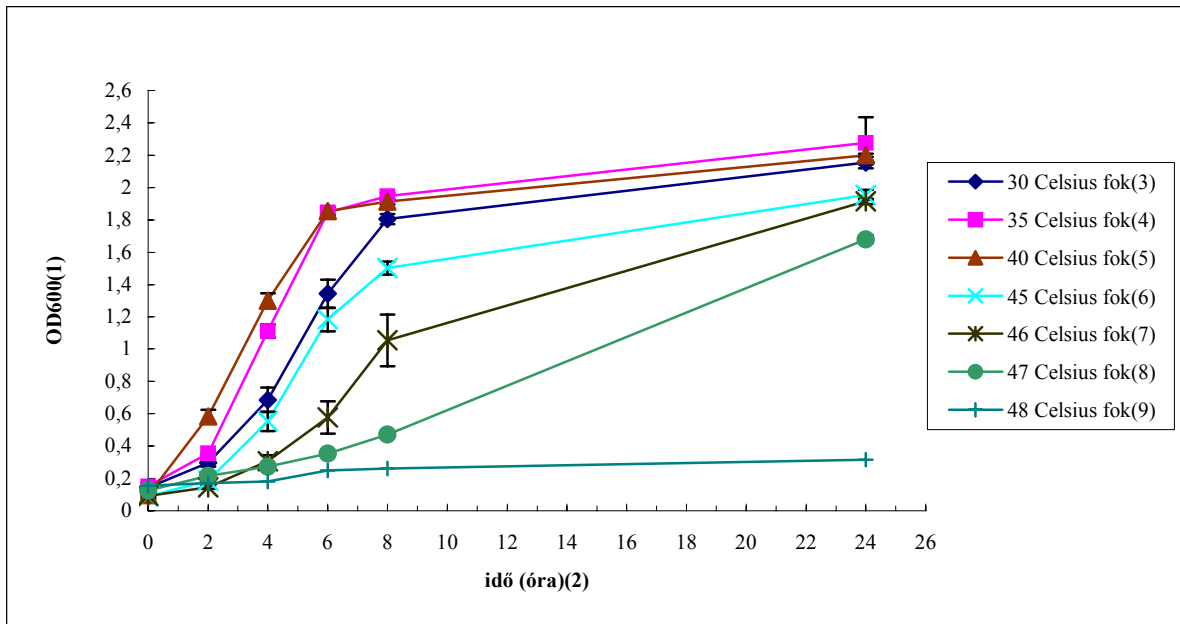


Figure 2: Growth of *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain on different temperature
Optical density on 600 nm(1), time (hour)(2), 30 Celsius degree(3), 35 Celsius degree(4), 40 Celsius degree(5), 45 Celsius degree(6), 46 Celsius degree(7), 47 Celsius degree(8), 48 Celsius degree(9)

3. ábra: Életképesség meghatározása drop tesztel
24 órás tenyészet, majd a hígítási sorozatok

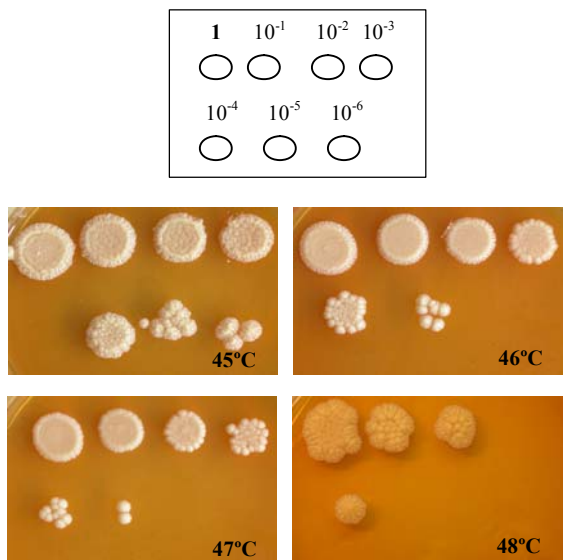


Figure 3: Determination of cell viability with drop test, Culture of 24 hour and serial of dilution

4. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs életképessége a hőmérséklet emelésével exponenciálisan csökken

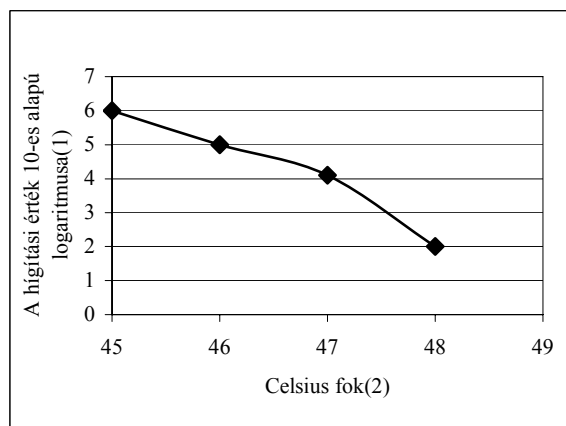


Figure 4: Elevation of the temperature led to an exponential decline of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain viability
Logarithm of dilution(1), Celsius degree(2)

1. táblázat

Etanol termelés tesztelése alacsony glükóz koncentráció és különböző mértékben oxigénlimitált körülmények között, 45 °C-on

Glükóz koncentráció (g/l)(1)	A tenyészet térfogata a 250 ml-es lombikban (ml)(2)	16 órás tenyészet etanol koncentrációja (% (v/v))(3)	24 órás tenyészet etanol koncentrációja (% (v/v))(4)	48 órás tenyészet etanol koncentrációja (% (v/v))(5)
50	200	1,27	1,36	1,22
50	100	1,35	1,24	1,26
100	200	2,01	2,53	2,75
100	100	2,57	2,77	3,22

Table 1: Investigation of ethanol production between low glucose concentration and different kind of oxigene limited conditions at 45 °C
 Glucose concentration (g/l)(1), amount of culture in 250 ml flask(2), ethanol concentration measure in 16 hour culture (% v/v)(3), ethanol concentration measure in 24 hour culture (% v/v)(4), ethanol concentration measure in 48 hour culture (% v/v)(5)

2. táblázat

Etanol termelés tesztelése növekvő glükóz koncentráció mellett 45 °C-on

Glükóz koncentráció (g/l)(1)	A tenyészet térfogata a 250 ml-es lombikban (ml)(2)	16 órás tenyészet etanol koncentrációja (% (v/v))(3)	24 órás tenyészet etanol koncentrációja (% (v/v))(4)	48 órás tenyészet etanol koncentrációja (% (v/v))(5)
120	100	3,40	3,47	3,00
140	100	4,34	3,60	3,47
160	100	4,88	4,46	4,34
180	100	4,27	4,82	4,21
200	100	5,03	4,78	4,31

Table 2: Investigation of ethanol production with elevation of glucose concentration at 45 °C
 Glucose concentration (g/l)(1), amount of culture in 250 ml flask(2), ethanol concentration measure in 16 hour culture (% v/v)(3), ethanol concentration measure in 24 hour culture (% v/v)(4), ethanol concentration measure in 48 hour culture (% v/v)(5)

Az etanol termelés időbeni maximumának és hőmérsékleti határának tesztelése érdekében, emelkedő glükóz koncentrációk mellett, 12 és 24 óra között több mintát véve, különböző hőmérsékleteken vizsgáltuk az etanol termelést (5. ábra, 6. ábra, 7. ábra). Megállapítható, hogy

1. A glükóz koncentráció növelése egyértelműen az etanol termelés fokozásához vezetett;
2. Az etanol termelés maximuma általában 20–24 óra körül van;
3. A hőmérséklet 45 °C fölé emelése nem csökkentette az etanol termelés mértékét.

Utóbbi különösen szembetűnő, ha az egyes hőmérsékletek mellett mérhető maximális etanol koncentrációkat hasonlítjuk össze (8. ábra).

Tájékoztató jellegű előkísérleteink eredményei még megerősítést igényelnek, mert ezek az adatsorok nem tartalmaznak párhuzamos méréseket. Ezekből a kísérletekből a következő általános tendenciák szűrhetőek le: a glükóz koncentráció emelése egyértelműen az etanol termelés fokozásához vezetett. Még a 20%-os glükóz koncentráció sem hatott az élesztőre károsan, ezért érdemes tovább tesztelni a törzs glükóz toleranciájának határát. Szükséges megvizsgálnunk 48 °C-on (esetleg magasabb hőmérsékleten is) az etanol termelést, mert a 45-47 °C-on mért adatok alapján arra következtethetünk, hogy a magas glükóz koncentráció mellett a törzs hőtoleranciája is javul. Célszerű továbbá meghatározni az egyes hőmérsékletekhez tartozó legoptimálisabb glükóz koncentrációt és fermentációs időt.

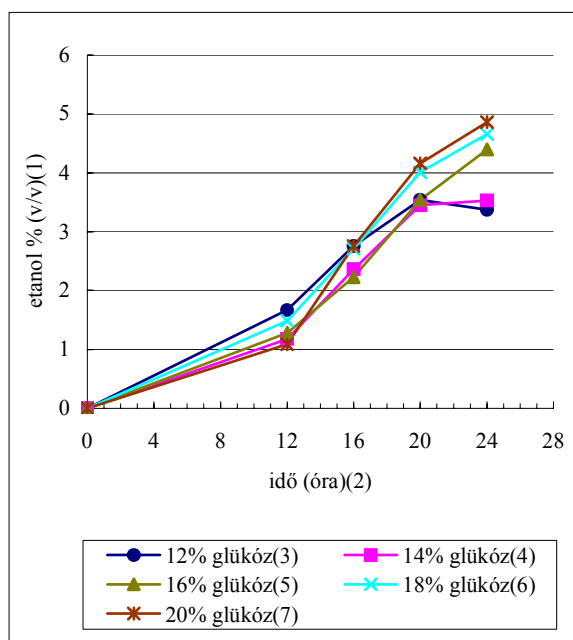
 5. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelése 45 °C-on


Figure 5: Ethanol production of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain at 45 °C
 Ethanol % (v/v)(1), time (hour)(2), 12% glucose(3), 14% glucose(4), 16% glucose(5), 18% glucose(6), 20% glucose(7)

6. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelése 46 °C-on

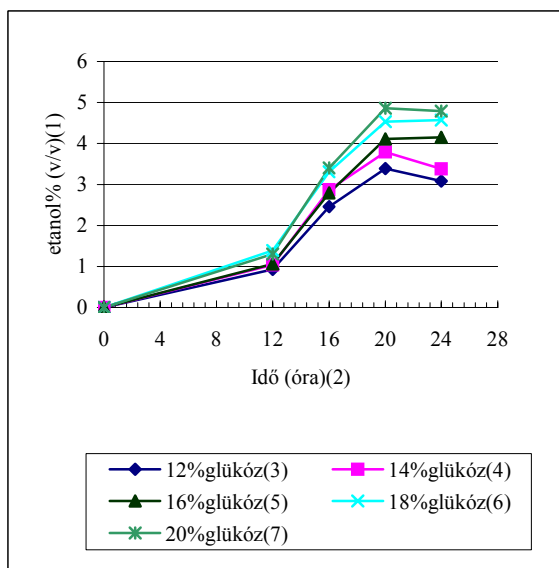


Figure 6: Ethanol production of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain at 46 °C
Ethanol % (v/v)(1), time (hour)(2), 12% glucose(3), 14% glucose(4), 16% glucose(5), 18% glucose(6), 20% glucose(7)

7. ábra: *Kluyveromyces marxianus* CBS712 törzs etanol termelése 47 °C-on

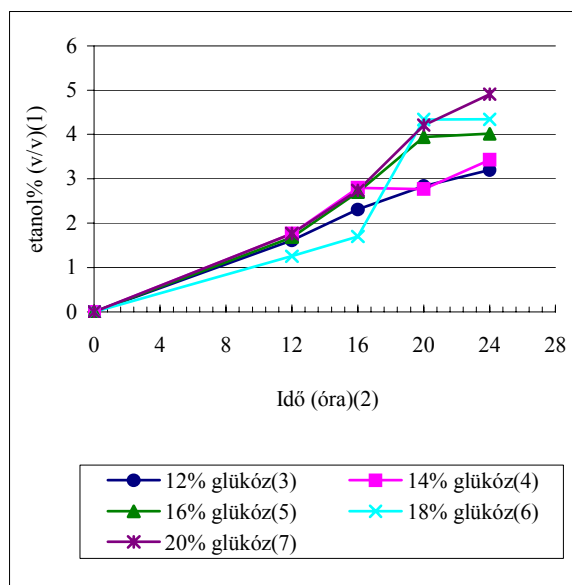


Figure 7: Ethanol production of the *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain at 47 °C
Ethanol % (v/v)(1), time (hour)(2), 12% glucose(3), 14% glucose(4), 16% glucose(5), 18% glucose(6), 20% glucose(7)

8. ábra: Maximális etanol termelési adatok összevetése 45 °C, 46 °C és 47 °C-on különböző glükóz koncentrációknál

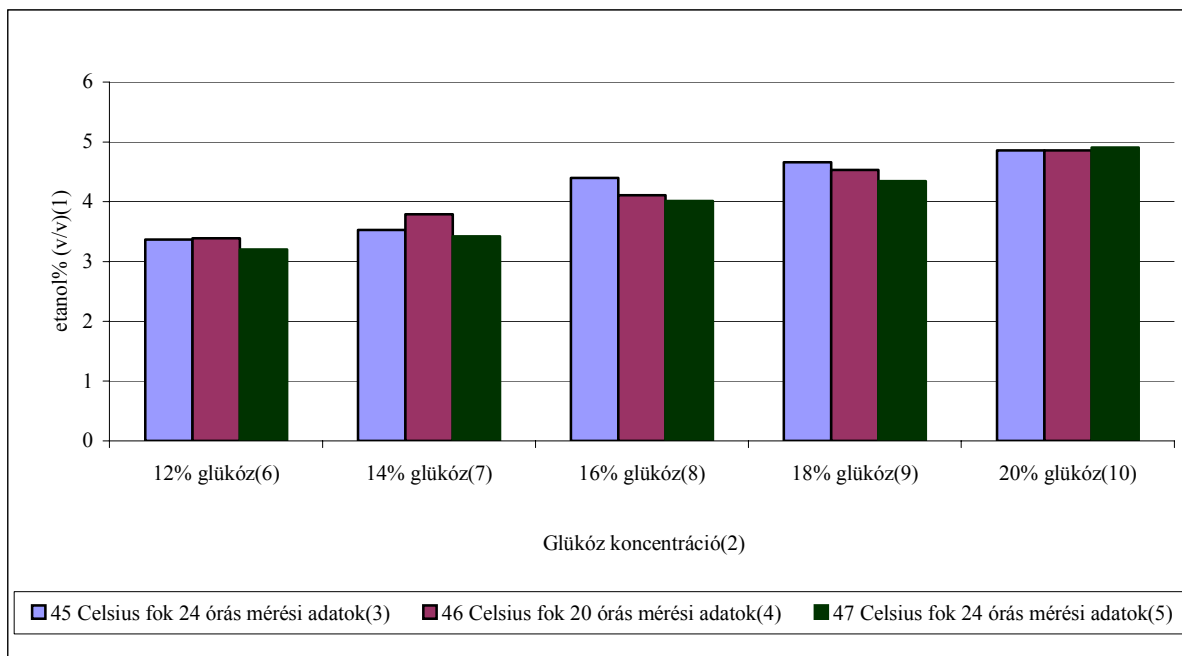


Figure 8: Maximal ethanol production at different concentration of glucose and temperature (45 °C, 46 °C and 47 °C)
Ethanol % (v/v)(1), glucose concentration(2), 45 Celsius degree measuring data of 24 hour(3), 46 Celsius degree measuring data of 20 hour(4), 47 Celsius degree measuring data of 24 hour(5), 12% glucose(6), 14% glucose(7), 16% glucose(8), 18% glucose(9), 20% glucose(10)

IRODALOM

- Banat, I. M.-Marchant, R. (1995): Characterisation and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 304-306.
- Hack, C. J.-Marchant, R. (1998a): Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*: development of an ethanol fermentation process: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 323-327.
- Hack, C. J.-Marchant, R. (1998b): Ethanol adaptation in a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 227-231.
- Llorente, B.-Malpertuy, A.-Blandin, G.-Artiguenave, F.-Wincker, P.-Dujon, B. (2000): Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Lett.* 487: 71-75.
- Love, G.-Gough, S.-Brady, D.-Barron, N.-Nigam, P.-Singh, D.-Marchant, R.-McHale, A. P. (1998): Continuous ethanol fermentation at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in Calcium alginate and kissiris: *Bioprocess Engineering*. 18: 187-189.
- Singh, D.-Nigam, P.-Banat, I. M.-Marchant, R.-McHale, A. P. (1998): Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II – Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 823-834.