

Małgorzata Lasik, Małgorzata Gumienna, Jacek Nowak

CHARAKTERYSTYKA METABOLIZMU GLUKOZY I FRUKTOZY U DROŻDŻY *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* W WARUNKACH MODELOWYCH

Zakład Fermentacji i Biosyntezy Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. Z. Czarnecki

*Oceniono możliwości biosyntezy kwasu octowego przez drożdże *Brettanomyces bruxellensis* w warunkach hodowli wstrząsanych z wykorzystaniem glukozy i fruktozy jako źródeł węgla. Scharakteryzowano wzrost i żywotność drożdży oraz ich metabolizm szczególnie pod kątem dynamiki oraz wydajności procesu biosyntezy kwasu octowego. Stwierdzono, że trzy testowane szczepy wykazywały zdolność do biosyntezy kwasu octowego a najwyższe uzyskane stężenie wynosiło 6,04 g/dm³.*

Hasła kluczowe: drożdże, *Brettanomyces bruxellensis*, kwas octowy.
Key words: yeasts, *Brettanomyces bruxellensis*, acetic acid.

Drożdże z rodzaju *Brettanomyces* należą do mikroflory winogron i poznane zostały jako jedno ze szczególnych zagrożeń zakażeń mikrobiologicznych win gronowych (1–3). Wyizolowane zostały w 1904 r. z angielskich piw, co znalazło konsekwencję w ich nazwie: *Brettanomyces* – „brettano” czyli British brewer (angielski piwowar) oraz „myces” (grzyby). *Brettanomyces* dobrze znoszą surowe warunki panujące w takim środowisku jakim jest wino, a mianowicie wysoka kwasowość (pH ok. 3,5), wysokie stężenie etanolu (10–14% obj.), niskie stężenie cukrów (nawet poniżej 2 g/dm³) oraz duże ilości związków polifenolowych. Prawdopodobnie dlatego częściej spotyka się je w winach czerwonych niż białych (1–5). Zagrożeniem wynikającym z obecności tych drożdży w winie jest przede wszystkim ich zdolność do syntezy niekorzystnych aromatów. *Brettanomyces* mają bowiem zdolność rozkładu naturalnie występujących w winogronach hydroksykwasów (kumarowego, ferulowego i kawowego) oraz ich biokonwersji do fenolowych związków zapachowych takich, jak: 4-etylo fenol, 4-etylo gwalikol i etylo katechol, odpowiedzialnych za aromaty: wędzonki, stajni, potu, plastrów opatrunkowych czy myszy. Należy jednak zaznaczyć, że poza niekorzystnymi zapachami, drożdże *Brettanomyces* zdolne są również do syntezy całej gamy estrów przyczyniających się z kolei do powstawania przyjemnych aromatów takich, jak: kwiatowy, owocowy, świeżego chleba, piwa czy szynki (3, 6–8).

Analiza metabolizmu drożdży *Brettanomyces* wskazuje również na ich zdolność do biosyntezy podwyższonych ilości kwasu octowego. Niskie wymagania żywieniowe tych drożdży, zdolność do wykorzystywania różnych źródeł węgla oraz bez-

pośredniej biokonwersji glukozy do kwasu octowego z pominięciem fermentacji alkoholowej, to cechy dzięki którym *Brettanomyces* mają szanse stać się mikroorganizmami alternatywnymi dla bakterii *Acetobacter* w procesie produkcji kwasu octowego. Pierwsze doniesienia wskazują na bardzo zróżnicowaną wydajność takiego procesu, w zakresie od 8 do 65 g kwasu octowego/dm³, w zależności od specyfiki szczepu, warunków hodowli oraz rodzaju zastosowanego źródła węgla (9–13).

W prezentowanej pracy oceniono wzrost oraz metabolizm drożdży *Brettanomyces bruxellensis* w podłożach zawierających różne rodzaje oraz stężenia cukru jako źródła węgla szczególnie pod kątem dynamiki oraz wydajności procesu biosyntezy kwasu octowego.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano trzy szczepy drożdży *Brettanomyces bruxellensis* pochodzące z Cornell Enology Strain Collection (NYSAES, NY, USA): *B. bruxellensis* CE 116, *B. bruxellensis* CE 120 oraz *B. bruxellensis* CE 254. Drożdże przechowywano i namnażano w podłożu YM, Difco (glukoza 10 g/dm³, pepton małosolny 5 g/dm³, ekstrakt drożdżowy 3 g/dm³, ekstrakt słodowy 3 g/dm³). Dla biosyntezy kwasu octowego stosowano modelowe podłoże glukozowe (11) o składzie: glukoza 50 g/dm³, (NH₄)₂HPO₄ 2 g/dm³, KH₂PO₄ 5 g/dm³, MgSO₄ · 7 H₂O 0,4 g/dm³, ekstrakt drożdżowy 1 g/dm³, pH = 4. Dla oceny wpływu różnych źródeł węgla na wydajność biosyntezy kwasu octowego zastosowano modyfikację własną podłoża modelowego, w której glukozę w stężeniu 50 g/dm³ zastępowano glukozą i fruktozą w stężeniach 10 i 25 g/dm³, oraz stosowano równocześnie glukozę i fruktozę (symulacja składu moszczu gronowego) w stężeniach 5, 10 i 25 g/dm³.

Hodowle prowadzono w warunkach wstrząsanych (150 obr./min), w temp. 30°C, bez regulacji pH. Inokulum stanowiła 48 h hodowla szczepu *Brettanomyces bruxellensis* w ilości 5% (v/v).

Metody analityczne:

Liczbę oraz żywotność komórek drożdży oceniano mikroskopowo za pomocą komory Thoma oraz z zastosowaniem barwienia błękitem metylenowym.

Kwasowość czynną oceniano za pomocą pH-metru Elmetron CP-411 z automatyczną kompensacją temperatury. Zmiany stężenia glukozy, fruktozy oraz kwasu octowego oceniano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Płyny pohodowlane filtrowano przez mikrofiltr 0,45 µm, tak przygotowane próbki nastrzykiwano na kolumnę Aminex HPX-87H (BIO-RAD) w objętości 20 mm³. Fazę ruchomą stanowił roztwór kwasu siarkowego o stęż. 0,005 mol/dm³. Czas analizy wynosił 30 min., a temp. 30°C.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na podstawie analizy wyników hodowli wszystkich trzech testowanych szczepów *Brettanomyces bruxellensis* stwierdzono, iż największa dynamika wykorzystania glukozy występowała w pierwszych siedmiu dniach hodowli (tab. I). Najwyższe

odnotowane stężenie kwasu octowego dla szczepów *B. bruxellensis* CE 116, CE 120 i CE 254 wyniosło odpowiednio $5,76 \pm 0,50$, $6,04 \pm 0,29$ i $5,66 \pm 0,49$ g/dm³. Żywotność drożdży do siódmego dnia hodowli była bardzo wysoka (> 95%), a następnie nieznacznie obniżała się. Uzyskane w warunkach prezentowanego doświadczenia ilości kwasu octowego są jednak niższe od wyników prac innych badaczy. Podczas hodowli prowadzonych w podobnych warunkach uzyskiwane stężenia kwasu octowego sięgały od 9 g/dm³ (11) lub 11 g/dm³ (10) do 24 g/dm³ (13). W przypadku zwiększenia napowietrzania podłoża hodowlanego w warunkach hodowli bioreaktorowych najwyższe odnotowane stężenie wynosiło 65 g/dm³ (12). Trzeba jednak podkreślić, że wydajność procesu biosyntezy kwasu octowego jest ściśle związana ze specyfiką szczepu. Freer i współpr. (13) w tych samych badaniach podają, że 26 szczepów z 60 badanych w ogóle nie było zdolnych do produkcji kwasu octowego na określonym poziomie detekcji.

Tabela I. Zmiany pH, liczby i żywotności drożdży oraz stężenia glukozy, kwasu octowego i alkoholu podczas hodowli *Brettanomyces bruxellensis* w modelowym podłożu glukozowym

Table I. Changes in the pH, amount and vitality of yeasts, as well as in the concentration of glucose, acetic acid and ethanol during cultivation of *Brettanomyces bruxellensis* in the model glucose medium

Dzień hodowli	pH	log kom/cm ³	Żywotność drożdży (%)	Glukoza (g/dm ³)	Kwas octowy (g/dm ³)	Etanol (% v/v)
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CE 116						
0	4,19±0,00	7,62±0,00	97,86±0,00	50,00±0,00	0	0
1	3,16±0,03	7,83±0,14	97,44±0,33	45,00±0,00	0	0
3	2,49±0,01	8,60±0,01	96,51±0,15	33,70±7,07	3,53±0,11	0,70±0,99
7	2,59±0,00	8,42±0,06	92,97±4,09	20,90±1,14	5,38±0,61	1,80±0,04
10	2,61±0,00	8,44±0,01	94,51±0,43	17,42±1,39	5,60±0,69	1,57±0,13
14	2,57±0,01	8,43±0,03	90,74±0,06	14,01±2,68	5,76±0,50	1,54±0,00
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CE 120						
0	4,19±0,00	7,36±0,00	97,41±0,00	50,00±0,00	0	0
1	3,09±0,03	7,81±0,11	98,15±2,62	34,62±2,11	0	0
3	2,50±0,00	8,69±0,05	95,65±2,98	26,69±7,62	5,64±1,70	1,20±0,00
7	2,64±0,02	8,39±0,06	96,58±2,74	21,27±8,30	5,94±0,80	1,80±0,13
10	2,65±0,01	8,62±0,03	95,17±1,03	17,24±6,99	6,04±0,29	1,55±0,01
14	2,64±0,01	8,53±0,02	89,57±1,37	14,56±4,86	5,64±0,76	1,50±0,06
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CE 254						
0	4,18±0,00	7,55±0,00	98,81±0,00	50,00±0,00	0	0
1	3,06±0,01	8,15±0,05	95,89±3,61	40,64±0,76	0	0
3	2,51±0,00	8,44±0,04	94,55±0,02	31,98±1,22	5,66±0,49	1,95±0,08
7	2,66±0,01	8,50±0,05	97,21±1,02	29,58±2,60	5,13±0,26	1,46±0,28
10	2,65±0,01	8,64±0,13	93,50±1,25	26,76±0,61	5,25±0,24	1,44±0,15
14	2,62±0,01	8,44±0,04	88,86±1,78	25,00±1,20	5,47±0,18	1,51±0,00

Należy również zwrócić uwagę na zdolność drożdży do wykorzystania etanolu jako źródło węgla. We wszystkich hodowlach zauważono syntezę niewielkich ilości etanolu. Jednak po siódmym dniu hodowli jego stężenie zaczęło się obniżać co może świadczyć o wykorzystaniu go przez drożdże jako źródło węgla. Takie zjawisko podczas hodowli *Brettanomyces* jest potwierdzeniem obserwacji innych badaczy (11–13) analizujących warunki syntezy kwasu octowego.

Tabela II. Zmiany pH, liczby i żywotności drożdży oraz stężenia cukru (glukozy lub fruktozy), kwasu octowego i alkoholu podczas hodowli szczepu *Brettanomyces bruxellensis* CE 254 w modyfikowanym podłożu glukozowym

Table II. Changes in the pH, amount and vitality of yeasts, as well as in the concentration of sugar (glucose or fructose), acetic acid and ethanol during cultivation of the strain *Brettanomyces bruxellensis* CE 254 in the modified glucose medium

Dzień hodowli	pH	log kom/cm ³	Żywotność drożdży (%)	Cukier (g/dm ³)	Kwas octowy (g/dm ³)	Etanol (% v/v)
glukoza 25 g/dm ³						
0	4,51±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	25,00±0,00	0	0
1	2,60±0,02	8,30±0,01	97,51±2,07	7,88±0,04	0,92±0,16	0,82±0,04
3	2,54±0,05	8,42±0,03	97,29±0,74	0,12±0,00	4,07±1,21	0,71±0,00
7	2,77±0,04	8,40±0,11	79,10±4,11	0	5,82±0,42	0,62±0,00
fruktoza 25 g/dm ³						
0	4,42±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	25,00±0,00	0	0
1	2,88±0,04	8,11±0,15	96,22±0,25	9,73±1,17	1,14±0,02	0,51±0,00
3	2,70±0,00	8,42±0,01	96,18±0,08	0	3,42±1,87	0,62±0,11
7	2,84±0,01	8,26±0,02	78,14±11,36	0	5,96±0,24	0,62±0,01
glukoza 10 g/dm ³						
0	4,57±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	10,00±0,00	0	0
1	2,84±0,02	8,19±0,03	98,02±1,07	0,96±0,21	1,47±0,02	0,42±0,02
3	2,70±0,00	8,62±0,03	95,90±0,04	0,15±0,07	0,21±0,13	0,20±0,14
7	2,83±0,01	8,41±0,24	83,18±1,03	0	0	0
glukoza 10 g/dm ³						
0	4,48±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	10,00±0,00	0	0
1	2,87±0,03	8,17±0,11	98,05±0,45	0,03±0,04	0,45±0,07	0,21±0,01
3	2,84±0,02	8,41±0,07	96,19±0,51	0	0,43±0,04	0,14±0,02
7	2,92±0,00	8,39±0,03	86,67±5,45	0	0	0

Podczas hodowli z zastosowaniem dwóch rodzajów cukru: glukozy i fruktozy w różnych stężeniach wykazano, że stężenie zarówno glukozy, jak i fruktozy w ilości 10 g/dm³, było zbyt niskie dla uzyskania zadowalającej wydajności produkcji kwasu octowego (tab. II). W przypadku glukozy cukier został wykorzystany po trzecim dniu hodowli, w przypadku fruktozy już po pierwszym dniu. W podłożu pojawił się kwas octowy jednak w bardzo małych ilościach (w podłożu zawierającym glukozę – 1,47 ± 0,02 g/dm³ i fruktozę – 0,45 ± 0,07 g/dm³). Zaobserwowano, że

zarówno powstały kwas, jak i etanol były wykorzystane przez drożdże jako jedyne pozostałe w środowisku źródło węgla (kiedy glukoza i fruktoza została całkowicie zutylizowana). Po siedmiu dniach hodowli odnotowywano brak glukozy, fruktozy, kwasu octowego i etanolu. Wartość pH w obu przypadkach osiągnęła najniższy poziom w trzecim dniu hodowli. Następnie, podobnie jak w pierwszym etapie badań, zaobserwowano podwyższenie pH z jednoczesnym zmniejszeniem liczby drożdży, co może wskazywać na lizę komórek. Podczas hodowli w podłożu zawierającym 25 g/dm³ glukozy lub fruktozy ponownie zaobserwowano całkowite wykorzystanie cukru już po trzech dniach (tab. II). Stwierdzono, że stężenie to jest wystarczające, aby drożdże nie wykorzystywały kwasu octowego i etanolu jako dodatkowego źródła węgla. Stężenie kwasu octowego osiągnęło poziom $5,96 \pm 0,24$ g/dm³ w przypadku podłoża zawierającego fruktozę i $5,82 \pm 0,42$ g/dm³ w podłożu zawierającym glukozę. Ponownie po intensywnym obniżeniu pH środowiska hodowlanego obserwowano wzrost pH po trzecim dniu hodowli z jednoczesnym obniżeniem liczby komórek. Różne stężenia i rodzaje źródeł węgla korzystnych dla procesu produkcji kwasu octowego przez drożdże *Brettanomyces* były również celem badań innych naukowców. Aguilar i współpr. (9) wskazują na stężenie glukozy w wysokości 50–60 g/dm³ jako najlepsze środowisko do biosyntezy (stężenie kwasu octowego sięgało wtedy 13 g/dm³). Z kolei wg Freer i współpr. (12) najlepszym stężeniem glukozy było

Tabela III. Zmiany pH, liczby i żywotności drożdży oraz stężenia cukru (glukozy i fruktozy), kwasu octowego i alkoholu podczas hodowli szczepu *Brettanomyces bruxellensis* CE 254 w modyfikowanym podłożu glukozowym

Table III. Changes in the pH, amount and vitality of yeasts, as well as in the concentration of sugar (glucose and fructose), acetic acid and ethanol during cultivation of the strain *Brettanomyces bruxellensis* CE 254 in the modified glucose medium

Dzień hodowli	pH	log kom/cm ³	Żywotność drożdży (%)	Glukoza (g/dm ³)	Fruktoza (g/dm ³)	Kwas octowy (g/dm ³)	Etanol (% v/v)
glukoza/fruktoza: 25/25 g/dm ³							
0	4,47±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	25,00±0,00	25,00±0,00	0	0
1	3,11±0,21	8,13±0,11	96,98±0,78	14,83±3,22	21,80±3,25	0,83±1,17	0,45±0,21
3	2,58±0,01	8,65±0,05	96,20±0,11	0	0	2,30±0,15	0,85±0,07
7	2,65±0,01	8,57±0,09	79,44±4,25	0	0	4,10±0,49	1,01±0,13
glukoza/fruktoza: 10/10 g/dm ³							
0	4,59±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	0	0
1	2,94±0,14	8,35±0,16	96,68±1,81	2,18±1,52	5,10±2,61	1,06±0,15	0,46±0,08
3	2,79±0,02	8,34±0,12	96,65±1,53	0	0	3,28±1,10	0,45±0,04
7	2,87±0,02	8,15±0,10	81,85±4,45	0	0	5,66±0,24	0,45±0,01
glukoza/fruktoza: 5/5 g/dm ³							
0	4,48±0,00	7,95±0,00	98,89±0,00	5,00±0,00	5,00±0,00	0	0
1	3,04±0,05	8,20±0,05	98,04±1,10	0	0,11±0,16	1,17±0,02	0,39±0,06
3	2,95±0,07	8,55±0,04	96,41±1,70	0	0	0,42±0,17	0,17±0,10
7	2,91±0,02	8,58±0,02	80,68±0,95	0	0	0	0

100 g/dm³. Przy takiej koncentracji cukru jako substratu, uzyskano stężenie kwasu octowego na poziomie 31,6 g/dm³, ale glukoza w podłożu nie została całkowicie wykorzystana. Należy podkreślić, że podczas tak przeprowadzonej hodowli tylko 5 szczepów z 60 badanych miało zdolność do produkcji kwasu octowego powyżej 29 g/dm³. Natomiast 28 z nich uzyskało wydajność powyżej 5 g/dm³. Zatem wydajności uzyskane w ramach prezentowanych badań znajdują potwierdzenie w wynikach badań innych zespołów.

W podłożach z zastosowaniem glukozy i fruktozy jako źródeł węgla ponownie zaobserwowano całkowite zużycie cukru, jednak glukoza zawsze była wykorzystywana w pierwszej kolejności. Podobne preferencje dotyczące wykorzystania glukozy przez drożdże *B. bruxellensis* w porównaniu z innymi źródłami węgla takimi, jak: melas, sacharoza, sok buraczany i ananasowy zostały opisane również przez innych badaczy podczas hodowli okresowych prowadzonych w bioreaktorach (9). W ramach prezentowanych badań własnych, największą koncentrację kwasu octowego (5,66±0,24 g/dm³) uzyskano w hodowli ze stężeniem cukrów glukoza/fruktoza 10/10 g/dm³. W przypadku stężenia cukrów 5/5 g/dm³ jako źródło węgla wykorzystane były także, wytworzone wcześniej kwas octowy i etanol. Przy stężeniu cukrów 25/25 g/dm³ stwierdzono zmniejszoną produkcję kwasu octowego, jak również niską przeżywalność komórek – 79,44% po siedmiu dniach (tab. III). Stwierdzono, że takie stężenie cukru może mieć inhibujący wpływ na metabolizm badanego szczepu.

WNIOSKI

1. Stwierdzono zdolność trzech testowanych szczepów drożdży *Brettanomyces bruxellensis* CE 116, CE 120 oraz CE 254 do biosyntezy kwasu octowego w zastosowanych warunkach tlenowych – hodowli wstrząsanych, prowadzonych w temp. 30°C, bez regulacji kwasowości środowiska.

2. Z przetestowanych źródeł węgla najkorzystniejszym pod względem biosyntezy kwasu octowego była glukoza w stężeniu od 25 do 50 g/dm³. W przypadku braku glukozy w środowisku zarówno fruktoza, jak i etanol mogą również stanowić przyswajalne dla *Brettanomyces* źródła węgla, jednak obserwowany wzrost i metabolizm drożdży były w takich warunkach istotnie ograniczone.

M. Lasik, M. Gumienna, J. Nowak

CHARACTERISTIC OF GLUCOSE AND FRUCTOSE METABOLISM BY YEAST *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* IN A MODEL MEDIUM

Summary

The possibility of acetic acid biosynthesis by the yeast *Brettanomyces bruxellensis* with a carbon source of glucose and fructose, in shake conditions was evaluated. The characteristic of growth and vitality of the yeast as well as the metabolism, specially from the point of view of the dynamic and efficiency of acetic acid biosynthesis were performed. It was found that all three tested strains were able to produce the acetic acid and the highest obtained concentration reached 6 g/dm³.

PIŚMIENNICTWO

1. Conterno, L., Lucy Joseph, C.M., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F.: Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2006; 57 (2): 139-147. – 2. Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A.: Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeasts species during the initial stages winemaking. *J. Appl. Microbiol.*, 2006; 100: 1208-1219. – 3. Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M.: Spoilage yeasts in the wine industry. *Intern. J. Food Microbiol.*, 2003; 86: 23-50. – 4. Ciani, M., Maccarelli, F., Fatichenti, F.: Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces* /*Dekkera* yeasts under different of aerobiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003; 19: 419-422. – 5. Guadalupe Aguilar Uscanga, M., Delia, M.-L., Strehaiano, P.: Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.*, 2000; 46: 1046-1050. – 6. Harris V., Ford Ch.M., Jiranek V., Grbin P.R.: *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilization of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008; 78: 997-1006. – 7. Suarez, R., Suarez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderon, F.: The production of ethylphenols in wine by yeasts of genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chemistry*. 2007; 102: 10-21. – 8. Shinorara, T., Kubodera, S., Yanagida, F.: Distribution of Phenolic Yeasts and Production of Phenolic Off-Flavors in Wine Fermentation. *J. Bioscience and Bioengineering*. 2000; 90 (1): 90-97. – 9. Aguilar Uscanga, M.G., Escudero Abarca, B.I.: Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *B.bruxellensis* in batch culture. *J. Food Process Engineer.*, 2007; 30: 13-23. – 10. Castro-Martinez, C., Escudero-Abarca, B.I., Gomez Rodriguez, J., Harward-Jones, P.M., Aguilar-Uscanga, M.G.: Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. *J. Food Process Engineer.*, 2005; 28: 133-143.
11. Aguilar Uscanga, M.G., Delia, M.L., Strehaiano, P.: *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid productoin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003; 61: 157-162. – 12. Freer, S.N., Dien, B., Matsuda, S., Production of acetic acid by *Dekkera*/*Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World J. Microb. Biotechnol.*, 2003; 19: 101-105. – 13. Freer S.N.: Acetic acid production by *Dekkera*/*Brettanomyces* yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2002; 18: 271-275.

Adres: 60-624 Poznań, Wojska Polskiego 31.