

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP, THU NHẬN VÀ ỨNG DỤNG BỘT MÀU β -CAROTENE, CHẤT NHỮ HÓA SINH HỌC MANNOSYLERYTRITOL LIPIDS (MELs) VÀ DẪN XUẤT CỦA AXIT AMIN S-ADENOSYL-L-METHIONINE (SAM) TỪ VI SINH VẬT

STUDY ON BIOSYNTHESIS, RECOVERY AND APPLICATION OF β -CAROTENE, GLYCOLIPID (MANNOSYLERYTRITOL LIPIDS-MELs) AND A DERIVATIVE OF ACID AMIN (S-ADENOSYL-L-METHIONINE-SAM) FROM MICROORGANISMS

*Nguyễn Thị Hoài Trâm, Nguyễn La Anh, Lê Thị Mai Hương, Trịnh Thị Kim Vân,
Đỗ Thị Thủy Lê, Bùi Thị Hồng Phương
Viện Công nghiệp thực phẩm*

TÓM TẮT

*Các nghiên cứu tổng hợp, thu nhận và ứng dụng bột màu β -caroten, chất nhũ hoá sinh học glycolipit mannosylerythritol lipit (MELs) và dẫn xuất của axit amin S-adenosyl - L - methionine (SAM) từ vi sinh vật đã được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm và xưởng thực nghiệm. Các chủng nấm sợi *Blakeslea trispora*, *Pseudozyma antarctica* và *Saccharomyces cerevisiae* đã được khảo sát, lựa chọn và nâng cao hoạt tính sinh học nhờ các biện pháp công nghệ và xử lý đột biến bằng hoá chất Ethylmethane sulfonate - EMS (đối với chủng *B. trispora* WH2 (-) mang giới tính cái). Các phương pháp tách chiết, tinh sạch và tạo dạng sản phẩm đã được nghiên cứu và lựa chọn. Chế phẩm bột màu β -caroten 1%, dịch MELs thô (65-70%) và bột nấm men giàu SAM (10,4%) đã được nghiên cứu ứng dụng trong sản xuất 6,65 tấn kẹo, bánh, bánh quy kẹp kem các loại.*

ABSTRACT

*The biosynthesis, recovery and application of β -carotene from fungamentous fungi *Blakeslea trispora*, glycolipids mannosylerythritol (MELs) from *Pseudozyma antarctica* and a derivative of acid amin S-adenosyl-L-methionine (SAM) from *Saccharomyces cerevisiae* were investigated at laboratory and pilot scales. The yield of the studied bioactive compounds were significantly improved by implementing technological measures and by using mutant strains of minus mating *B. trispora* WH2(-) obtained by treatment with Ethylmethane sulfonate (EMS). The extraction, purification and formulation methods were studied and selected. Food coloring powder of 1% β -carotene in microencapsulation form, the crude MELs (65-70%) in liquid form and the yeast powder enriched with SAM (10,4%) were used for production of 6.65 tones of candy, biscuit and wafer.*

1. GIỚI THIỆU

Vấn đề đảm bảo chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm hiện nay đang được Nhà nước Việt Nam đặc biệt quan tâm. Xu hướng sử dụng thực phẩm và các phụ gia thực phẩm có nguồn gốc thiên nhiên, an toàn, không độc hại, có lợi cho sức khoẻ cả về giá trị dinh dưỡng và chức năng hỗ trợ phòng chống bệnh tật ngày càng phát triển ở khắp nơi trên thế giới. Một số hoạt chất chức năng từ các nguồn nguyên liệu thực

vật, động vật đã được khai thác và tạo các sản phẩm thương mại. Các chủng vi sinh vật như nấm men, nấm sợi, vi khuẩn cũng là một nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng cho việc khai thác các hoạt chất sinh học có tác dụng cho sức khoẻ [2, 4, 5]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả đã đạt được trong việc nghiên cứu tổng hợp, thu nhận bột màu β -caroten từ nấm sợi *Blakeslea trispora*, chất nhũ tương và hoạt động bề mặt glycolipit Mannosylerythritol lipids (MELs) từ nấm men *Pseudozyma*

antarctica, dẫn xuất của axit amin S-adenosyl - L - methionine (SAM) từ *Saccharomyces cerevisiae* và ứng dụng trong chế biến một số sản phẩm kẹo, bánh và bánh quy kẹp kem quy mô phòng thí nghiệm và quy mô công nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy

Các chủng nấm sợi *B. trispora* WH1(+), WH2(-) và NBRC 5898 (+) tổng hợp β -caroten nhận từ sưu tập giống vi sinh vật Trung Quốc và Nhật Bản. Bào tử *B. trispora* được nuôi trên môi trường PDA (thạch-đường gluco-chất chiết khoai tây) ở 28 °C trong 72-120 giờ. Bào quản bào tử trong cát vô trùng ở 40 °C. Nhân giống lên men sử dụng dịch huyền phù bào tử. Môi trường lên men cơ bản bao gồm glucoza, L-asparagine, muối khoáng, BHT, dầu đậu tương, vitamin B1 hoặc môi trường có sử dụng các nguyên liệu thay thế. Lắc tròn 250 vòng/phút ở 280 °C trong 3-5 ngày [5].

Các chủng nấm men sinh tổng hợp MELs được mua từ sưu tập giống Nhật Bản: *Pseudozyma antarctica* NBRC 10736, *P. aphidis* NBRC 10182, *P. antarctica* NBRC 10260. Giống được giữ trên môi trường thạch YM. Nhân giống và lên men trên môi trường chứa glucoza, cao nấm men, muối khoáng, dầu thực vật [6].

Các chủng nấm men sinh tổng hợp SAM bao gồm chủng *Saccharomyces* sản xuất bia, cồn, rượu sake trong sưu tập giống Viện Công nghiệp thực phẩm và Nhật Bản. Giữ giống trên môi trường thạch dưới lớp parafin lỏng vô trùng ở 40 °C. Nhân giống và lên men trong các môi trường có chứa đường kính, muối khoáng và L-methionine [2].

2.2 Phương pháp phân tích

Xử lý đột biến nấm sợi *B. trispora* WH2 là chủng mang giới tính cái (-) sử dụng hoá chất đột biến Ethylmethane sulfonate (EMS). Kiểm tra bằng môi trường có chứa các kháng sinh lovastatine hoặc nystatine, hoặc acetoacetanidile.

Thu nhận, tách chiết, phân tích β -caroten: Sinh khối *B. trispora* sấy ở 40 °C trong 24 giờ, chiết bằng hệ dung môi hexan/axeton (1,5/1). Tinh sạch bằng phương pháp xà phòng hoá. Hàm lượng β -caroten được phân tích bằng phương pháp quang phổ ($\lambda = 450$ nm) và sắc ký lỏng cao áp [5].

Thu nhận, tách chiết MELs từ nấm men *P. antarctica*: MELs được tách chiết từ dịch nuôi cấy bằng Tert Butyl methyl este (TBME). Phân tích định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng với hệ dung môi cloroform/methanol/nước (65/15/2) và thuốc thử α -Naphtol và được so sánh với sản phẩm ngoại bào của chủng *P. aphidis* DSM 14930 (Hãng Cerestar- Eridania Beghin- Say, Đức). Tinh sạch MELs bằng phương pháp xử lý nhiệt kết hợp với ái lực dung môi. Phân tích định lượng glycolipit bằng HPLC và GC [3, 4].

Tách chiết, tinh sạch và phân tích SAM: SAM được trích ly khỏi sinh khối tế bào nấm men *Saccharomyces* bằng axit perchloric. Hàm lượng SAM được xác định bằng phương pháp quang phổ ($\lambda = 260$ nm). Phân tích định tính SAM bằng phương pháp sắc ký bản mỏng, hệ dung môi n-butanol/acetic axit/nước cất (12/3/5), hiện màu bằng dung dịch ninhydrin. SAM có giá trị $R_f = 0,22$ và chạy lên thành chấm hình lưỡi liềm. Định lượng SAM bằng HPLC. Làm sạch SAM bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên thiết bị FPLC, AKTA prime [1, 7].

Phân tích thành phần, chỉ tiêu vệ sinh an toàn thực phẩm của các sản phẩm β -caroten, MELs và SAM theo các phương pháp chuẩn của Viện Dinh dưỡng, Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế.

2.3 Phương pháp tạo sản phẩm

Tạo vi nang β -caroten bằng phương pháp nhũ hoá-sấy phun: Làm nóng dung dịch β -caroten ở nơi tối, không có ánh sáng, khuấy đều bằng máy đồng hoá siêu tốc. Tiếp đến là đồng hoá áp lực rồi sấy phun. Sử dụng hai loại hỗn hợp chất bao là đạm đậu

tương thủy phân và đường kính, gelatin và đường kính.

Tạo sản phẩm bột nấm men giàu SAM: Sinh khối nấm men sau quá trình nuôi cấy được ly tâm rửa sạch 2- 3 lần bằng nước cất hoặc nước muối sinh lý sau đó trộn đều với một trong các dung dịch muối làm bền MgSO₄, MgCl₂, CaCl₂ hoặc chitosan và được đông khô. Chế phẩm chứa SAM tinh sạch được tạo thành bằng cách kết tủa SAM tinh khiết từ dịch tinh sạch bằng FPLC, trộn với các muối bền và được đông khô [2].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả khảo sát, lựa chọn và nâng cao hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật tổng hợp β-caroten, MELs và SAM.

Các chủng nấm sợi *Blakeslea trispora*, nấm men *Pseudozyma antarctica* và *Saccharomyces* tổng hợp β-caroten, MELs, SAM đã được khảo sát và nghiên cứu nâng cao hoạt tính sinh học. Chủng nấm sợi *B. trispora* WH2 có giới tính cái (-) đã được xử lý đột biến với hoá chất (EMS). Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy:

- Thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp, bổ sung các tiền chất có cấu trúc vòng β như karosen có ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng, phát triển và tổng hợp β-caroten của các chủng nấm sợi *B. trispora* WH1, *B. trispora* WH2, *B. trispora* NBRC 5989, hàm lượng β-caroten tăng gấp 20 lần so với các chủng gốc trên môi trường lên men cơ bản, đạt 2455-2967 mg/L. Xử lý đột biến *B. trispora* WH2 (-) bằng hoá chất Ethylmethane sulfonate (EMS) đã làm tăng khả năng tổng hợp β-caroten, đạt 4717 mg/L.

- Trong 3 chủng nấm men *Pseudozyma* có khả năng sinh chuyển hoá tạo MELs, chủng *P. antarctica* NBRC 10736 có khả năng chuyển hoá MELs cao, đạt 40,4 g/L sau 19 ngày. Chủng *P. aphidis* DSM 14930 được sử dụng làm chủng đối chứng. Nhiệt độ nuôi cấy 27°C, môi trường có NaNO₃ cho sản phẩm MEL tốt nhất. Dầu đậu nành là nguồn dầu béo được chuyển hóa thành

MELs với hệ số chuyển hóa cao nhất. Đã xác định được hệ số thành phần môi trường Y NaNO₃/cao nấm men = 1,76 (hay 3g NaNO₃ và 1,74 g cao nấm men) để đảm bảo tỷ lệ nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ thích hợp, tạo điều kiện nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ sử dụng hết tại cùng một thời điểm.

- Trong môi trường nuôi cấy có bổ sung methionine, 3 chủng nấm men *Saccharomyces* nghiên cứu đều có khả năng tổng hợp SAM ở các mức độ khác nhau, đạt 6,3-8,1% so với sinh khối khô. Bổ sung nguyên tố vi lượng cobalt dưới dạng muối clo (CoCl₂) và methionine chia làm 3 lần có tác dụng làm tăng sinh khối tế bào nấm men và hiệu suất tổng hợp SAM. Trong cùng điều kiện, chủng *S. cerevisiae* IFO 2346 có hiệu suất tổng hợp sinh khối và SAM cao nhất, đạt 60,0 gam sinh khối ướt/lít và SAM đạt 2,03 g/lít, tương đương 13,5% so với sinh khối khô.

Bảng 1. Kết quả khảo sát lựa chọn và nâng cao hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật tổng hợp MELs và SAM

Tên chủng giống	Đơn vị đo	Hoạt lực ban đầu	Hoạt lực sau khi xử lý bằng biện pháp	
			Công nghệ	Đột biến
<i>B. trispora</i> WH ₁ (+)	Hàm lượng	98,6	2785,3	-
<i>B. trispora</i> WH ₂ (-)	β-caroten (mg/L)	103,3	2965,7	4717,0
<i>B. trispora</i> NBRC 5989 (+)		78,2	2455,0	-
<i>Pseudozyma antarctica</i> NBRC 10182		Hiệu suất thu hồi MELs	39,4	-
<i>P. antarctica</i> NBRC 10736	thô (g/L)	40,4	-	-
<i>P. aphidis</i> DSM 14930		38,2	-	-
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2346		Hàm lượng SAM (% SK khô)	8,1	13,5
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2347	7,6		10,0	-
<i>S. carlsbergensis</i> HN	6,3		8,3	-

3. 2 Kết quả tổng hợp, thu nhận β -caroten, MELs và SAM từ vi sinh vật quy mô Phòng thí nghiệm và Xưởng thực nghiệm.

Sự nghiên cứu và lựa chọn các điều kiện công nghệ thích hợp khi nuôi cấy *B. trispora* WH2 tổng hợp β -caroten, *P. antarctica* NBRC 10736 tổng hợp MELs và *S. cerevisiae* tổng hợp SAM được thực hiện trên các thiết bị lên men 14, 500 và 1500 lít tại Viện Công nghiệp thực phẩm. Kết quả (Bảng 2) cho thấy thiết bị 14 và 1500 lít có hệ thống điều khiển các thông số tốc độ khuấy, hàm lượng oxy hoà tan nên hiệu suất lên men cao hơn so với thiết bị lên men 500 lít.

Bảng 2. ảnh hưởng của điều kiện công nghệ và thiết bị nuôi cấy đến khả năng tổng hợp β -caroten, MELs và SAM của các chủng vi sinh vật

Tên chủng giống	Đơn vị đo	Quy mô TB (lít)		
		14	500	1500
<i>B. trispora</i> WH ₂	Hàm lượng SK khô (g/l)	49,0	46,5	55,2
	Hàm lượng β -caroten (mg/l)	3979,0	3865,0	4930,0
<i>P. antarctica</i> NBRC 10736	Hàm lượng MELs (g/l)	80,0	60,0	120,0
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2346	Hàm lượng SK -it (g/l)	70,0	100,0	120,0
	Hàm lượng SAM (% SK khô)	14,4	15,6	18,5

Ghi chú: Điều kiện nuôi cấy: 1. *B. trispora* WH2: T°: 28°C, pH=9; Khuấy 120-300 v/ph; Sục khí 0,7 - 1,5 l/ph; 2. *P. antarctica* NBRC 10736: Tiếp dầu đậu tương; T°: 27°C; pH=6,2; Thời gian: 14 ngày; Sục khí 0,4 - 0,5 l/ph; 3. *S. cerevisiae* IFO 2346: Tiếp methionine 3 lần; To: 28°C; pH=6,0; Sục khí 0,2 - 1,5 l/ph.

Các sản phẩm β -caroten, MELs và SAM tạo thành sau quá trình nuôi cấy nấm sợi và nấm men đã được tách chiết và tinh sạch. Kết quả cho thấy:

- Hàm lượng β -caroten từ sinh khối của 3 chủng nấm sợi *B. trispora* WH1, WH2 và 5989 chứa 82,9 86,3 và 92,2% so với tổng lượng carotenoid sau quá trình tách chiết bằng hệ dung môi hexan/acetone và tinh sạch bằng phương pháp xà phòng hoá.

- MELs được tách chiết khỏi dịch lên men bằng phương pháp xử lý nhiệt và dung môi cồn ethanol, tách cặn bằng ly tâm và cô chân không thu dịch MELs thô có hàm lượng 65-70%. Dung dịch MELs có độ tinh sạch 92-95% thu được bằng phương pháp làm sạch với hệ dung môi hexan/methanol/nước, sau đó cô chân không đuổi dung môi và tách nước.

- SAM được tách chiết khỏi sinh khối tế bào nấm men bằng axit perchloric. Sau khi tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion trên hệ thống FPLC AKTA prime đạt độ tinh sạch tương đương với mẫu chuẩn của các hãng Sigma (Mỹ) và Nacalai (Nhật Bản).

3.3. Nghiên cứu tạo sản phẩm và ứng dụng bột màu β -caroten, glycolipit MELs, bột nấm men giàu SAM và chế phẩm chứa SAM tinh sạch.

Các điều kiện công nghệ vi nang hoá bằng phương pháp nhũ hoá - sấy phun tạo bột màu tan trong nước từ β -caroten tan trong dầu đậu tương, tạo các dạng sản phẩm MELs thô và tinh sạch, chế phẩm bột nấm men giàu SAM và chứa SAM tinh sạch đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy:

- Protein đậu tương thủy phân (SPH) và gelatin (G) kết hợp với đường sacarose (S) tạo thành hỗn hợp chất bao tốt nhất cho quá trình vi nang hoá β -caroten với tỷ lệ S : G bằng 17: 3 và SPH: S bằng 6 : 14. Hàm lượng chất khô 20%, nồng độ chất nhũ hoá như Xanthan Gum hoặc monoglycerit từ 0,3-0,5%, áp lực đồng hoá từ 30-40 Mpa, nhiệt độ nhũ hoá 70°C, nhiệt độ không khí vào sấy phun là 195°C là các thông số đã được lựa chọn để hiệu suất và chất lượng

bột màu β -caroten đạt giá trị cao nhất.

- Sinh khối nấm men chứa SAM được trộn đều với một trong các loại phụ gia làm bền khác nhau $MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, chitosan và được đông khô. Số liệu từ Bảng 3 cho thấy mẫu được trộn với $MgSO_4$ có hàm lượng SAM cao nhất (10,4%). Chế phẩm chứa 30-33% SAM với độ tinh sạch 92-95% cũng có kết quả tốt nhất khi được làm bền với muối $MgSO_4$.

Bảng 3. Tác dụng của các phương pháp xử lý lên bột nấm men giàu SAM

Mẫu xử lý với các loại phụ gia khác nhau	Hàm lượng SAM(%)	
	Bột nấm men giàu SAM	CP chứa SAM tinh sạch
$MgSO_4.7H_2O$	10,4	33,0
$MgCl_2.2H_2O$	9,7	32,0
$CaCl_2.2H_2O$	8,4	30,0
Chitosan + $MgSO_4.7H_2O$	8,8	-

- Sản phẩm bột màu β -caroten, MELs, bột nấm men *S. cerevisiae* giàu SAM và chế phẩm chứa SAM tinh sạch đã được phân tích tại Trung tâm kiểm nghiệm ATVSTP Viện Dinh dưỡng và Phòng thí nghiệm VILAS, Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế, Phòng thí nghiệm VILAS, Viện Chăn nuôi, Bộ NN & PTTN. Kết quả cho thấy các sản phẩm đều đạt chỉ tiêu chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm (Bảng 4).

- Bột màu β -caroten, MELs và SAM đã được nghiên cứu ứng dụng sản xuất 6,65 tấn kẹo mềm, bánh, bánh quy kẹp kem tại Công ty Cổ phần Bánh kẹo Hải Hà, Trảng An, Hữu Nghị, Hương Sen, Phát Việt và Tùng Lâm. Tỷ lệ sử dụng bột β -caroten là 1,45 kg/tấn kẹo, 0,7 kg/tấn bánh, MELs thô là 0,5% so với chất béo thay thế cho việc sử dụng chất nhũ hoá Lecithin. Bột nấm men giàu SAM hoặc chế phẩm chứa SAM tinh sạch được nghiền mịn và phối trộn với tỷ lệ 3% so với trọng lượng kem. Sản phẩm bánh, kẹo thử nghiệm có hương vị đặc trưng theo tên gọi, không làm ảnh hưởng đến quy trình sản xuất và chất lượng sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

Đã khảo sát, lựa chọn, sử dụng các biện pháp công nghệ, thiết bị và chế độ lên men phù hợp để nâng cao hoạt tính 3 chủng nấm sợi *Blakeslea trispora* tổng hợp β -caroten, nấm men *Pseudozyma antarctica* sinh chuyển hoá tổng hợp MELs và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* tổng hợp SAM ở quy mô Phòng thí nghiệm và Xưởng thực nghiệm. Khả năng tổng hợp β -caroten của chủng nấm sợi có giới tính cái *B. trispora* WH2 (-) đạt 4717 mg/L sau khi xử lý đột biến bằng hoá chất Ethylmethane sulfonate - EMS. Các phương pháp tách chiết, tinh sạch và tạo dạng sản phẩm đã được nghiên cứu và lựa chọn. Chế phẩm bột màu β -caroten 1%, dịch MELs thô (65-70%) và bột nấm men giàu SAM (10,4%) đã được nghiên cứu ứng dụng trong sản xuất 6,65 tấn kẹo, bánh, bánh quy kẹp kem các loại.

Bảng 4. Phân tích thành phần VSATTP các sản phẩm β -caroten MELs và SAM

Chỉ tiêu phân tích	Kết quả			
	Bột β -caroten	MELs thô	SAM I	SAM 2
Độc chất	KPH	KPH	KPH	KPH
Độc tính cấp (số chuột chết khi thử với liều tối đa)	0	0	0	0
Thử giới hạn kim loại nặng (ppm)	< 20	-	< 20	< 20
Thành phần (%)				
- Độ ẩm	4,80	-	6,66	-
- Gluxit	75,70	-	15,00	-
- Lipid	0,53	-	2,37	-
- Protein	23,60	-	47,96	-
Hoạt chất	1,00	65-70	8,4-10,3	30-33
Vi sinh vật gây bệnh (số bào tử vi khuẩn/gam)	0	0	0	-
Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc (số khuẩn lạc/gam)	0	0	0	-
Mùi	Thơm	-	Nấm men	-
Màu	Đỏ cam	Nâu	Ngà	Trắng
Trạng thái	Bột	Lỏng	Bột	Bột

Ghi chú: Mẫu SAM1: Bột nấm men giàu SAM, SAM2: Chế phẩm chứa SAM tinh sạch; KPH: không phát hiện; (-): Không phân tích; Vi sinh vật gây bệnh: *E. coli* (37°C/96 h)/g; - *Coliforms* (37°C/48 h)/g; - *S. aureus* (37°C/48 h)/g; - *Salmonella* (37°C/48 h)/25 g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Aboul-enein, H. Y., Abu-Zaid, S.*; HPLC analysis of S-adenosyl-L-methionine in pharmaceutical formulation; *Pharmazie*, 56, 626-628, (2001).
2. *Gennari, F.*; Process for producing stable Sulpho-adenosyl - L-methionine salt; United States Patent, N^o4621056, (1986).
3. *Hommel, R. K., Weber, L., Weiss, A., Himelreich, U., Rilke, O., Kleber, H. P.*; Production of sophorose lipid by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola* grown on glucose; *J. Biotechnol*, 33: 147-155, (1994).
4. *Tabuchi, T.*; Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*; *Agric. Biol. Chem*, 54, 37-40, (1990).
5. *Mantzouridou, F., Roukasa, T., Kotzekidou, P., Liakopoulou, M.*; Optimization of beta - carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora*: a mathematical modeling; *Appl. Biochem. Biotechnol*, 101 (2), 153 – 175, (2002).
6. *Shabtai, Y., Wang, D. I. C.*; Production of emulsan in a fermentation process using soybean oil (SBO) in a carbon-nitrogen coordinated feed; *Bio-technol. Bioeng*, 35, 753-765, (1989).
7. *Shiozaki, S., Shimizu, S., Yamada, H.*; Production of S-adenosyl - L-methionine by *Saccharomyces sake*; *J. Biotechnol*, 4, 345-354, (1986).