

# Wykorzystanie upośledzonych oddechowo mutantów *Saccharomyces cerevisiae* do łącznej fermentacji glukozy i ksylozy wspólnie z drożdżami *Pichia stipitis*

Monika Kordowska-Wiater  
Zdzisław Targoński

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowywania  
Akademia Rolnicza  
Lublin

## 1. Wstęp

**B**iomasa roślinna — obfite, łatwo odnawialne i tanie źródło węglowodanów — stanowi cenny surowiec do produkcji m. in. etanolu. Podstawowym problemem ekonomicznej opłacalności tego procesu jest wydajna fermentacja ksylozy, pentozy stanowiącej główny składnik hemiceluloz, która ulega asymilacji i fermentacji mikrobiologicznej znacznie trudniej niż glukoza (1). Wśród drobnoustrojów posiadających tę zdolność wyróżniają się drożdże *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* i *Pachysolen tannophilus* (1,2). Jednakże w mieszaninach cukrów odpowiadających składem hydrolizatowi ligninocelulozowym następuje sekwencyjna asymilacja cukrów przez wymienione drożdże, w której heksozy są preferencyjnie fermentowane przed D-ksylozą (2,3). Taki schemat fermentacji wynika głównie ze zjawiska glukozowej represji katabolicznej, stąd ksyloza wykorzystywana jest dopiero, wtedy gdy w podłożu pozostaje niewiele glukozy (4,5). Dlatego, jak się wydaje, korzystne jest możliwe szybkie odfermentowanie glukozy przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, a do fermentacji pentoz należy użyć odpowiednich drożdży fermentujących te cukry.

Jednym z rozwiązań zwiększenia wydajności procesu i skrócenia czasu fermentacji jest wykorzystanie wspólnej hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z drożdżami fermentującymi glukozę i ksylozę, np. *P. stipitis* (1,6,7). O możliwości prowadzenia tego procesu i jego efektywności decyduje kilka warunków. Po pierwsze, zastosowane drożdże nie mogą oddziaływać na siebie antagonistycznie, w tym nie mogą wytwarzać toksyn killerowych (8). Po drugie, proces wymaga utrzymania pewnej niewielkiej ilości tlenu w podłożu,

co wpływa na zwiększenie efektywności fermentacyjnej drożdży wykorzystujących ksylozę. Aby uniknąć nadmiernego namnażania się biomasy *S. cerevisiae* w warunkach natleniania, dobre efekty daje zastosowanie ich mutantów upośledzonych oddechowo. Po trzecie, poziom glukozy w podłożu hodowlanym powinien szybko ulec obniżeniu, aby umożliwić wykorzystanie ksylozy. Stosowanie drożdży *S. cerevisiae* z defektem oddechowym, ale o wysokiej zdolności fermentowania glukozy, winno sprzyjać wydajnej fermentacji ksylozy przez *P. stipitis* (9), i co równie ważne, nie prowadzi do dominacji *S. cerevisiae* i eliminacji *P. stipitis* z hodowli (4).

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Szczepy, podłoża

Drożdże gorzelnicze *S. cerevisiae* o symbolach V<sub>30</sub> i Ja(a) i drożdże fermentujące ksylozę *P. stipitis* CCY 39501 pochodziły z kolekcji KTPRSiP. Szczepy drożdży przechowywano na skosach brzeczkowych lub YPG w 4°C.

Stosowane podłoża:

— YPG do mutagenizacji (g/l): wyciąg drożdżowy 10,0, pepton 10,0, glukoza 20,0, bromek etydyny 10 µg/ml;

— do selekcji mutantów: YP + glicerol 20,0;

— do badania zdolności fermentacyjnych mutantów (g/l): glukoza 50,0, wyciąg drożdżowy 3,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,0, MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 1,1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0, mikroelementy wg Mandels-Weber 10 ml/l (10);

— do oznaczania aktywności killerowej (g/l): wyciąg drożdżowy 3,0, Bacto-trypton 5,0, glukoza 10,0, wyciąg słodowy 3,0, kwas cytrynowy 10,5, agar 20,0 i błękit metylenowy 0,03;

— inokulacyjne (g/l): wyciąg drożdżowy 3,0, wyciąg słodowy 3,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0, glukoza lub ksyloza 20,0;

— fermentacyjne (g/l): wyciąg drożdżowy 3,0, wyciąg słodowy 3,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0, mieszanina modelowa cukrów — glukoza 35,0, ksyloza 15,0.

### 2.2. Metody

#### 2.2.1. Mutagenizacja i selekcja mutantów

Drożdże gorzelnicze V<sub>30</sub> oraz Ja(a) z odmłodzonych hodowli na skosach brzeczkowych zaszczepiono na podłożę YPG z dodatkiem bromku etydyny w ilości 10 µg/ml. Hodowle stacjonarne prowadzono w ciemności w termostacie o temp. 28°C. Po 48 h hodowle odwirowano (wówczas w podłożu oznaczono niewielką zawartość cukru), a uzyskaną biomasą zaszczepiono świeże podłożę YPG z bromkiem etydyny. Hodowle prowadzono w tych samych warunkach przez 24 h (również do zużycia glukozy), po czym przeniesiono powtórnie w opisany sposób do świeżej pożywki YPG z bromkiem etydyny.

Po kolejnej dobie inkubacji drożdże rozcieńczono w płynie fizjologicznym i przeszczepiono na agarowe podłoże YPG w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Po 2 dobach inkubacji wyrosłe kolonie przeszczepiono na podłoże YP z glicerolem, aby potwierdzić ich defekt oddechowy. Kolonie uzyskanych mutantów oddechowych rozwijały się na YPG, natomiast nie wykazywały wzrostu na podłożu z glicerolem.

#### 2.2.2. Porównanie zdolności fermentacyjnych szczepów macierzystych i mutantów

W tym celu przygotowano jednodniowe inokula szczepów macierzystych Ja(a) i V<sub>30</sub> oraz wyselekcjonowanych mutantów w ten sposób, że do podłoża do badania zdolności fermentacyjnej mutantów wprowadzono komórki drożdży ze skosów brzeczkowych lub YPG i namnożono na wyrząsarce Centromat R przy 200 rpm, w 28°C. Tak przygotowanym inokulum w ilości 1% zaszczepiono 100 ml w/w podłoża fermentacyjnego w kolbach o objętości 500 ml. Hodowle prowadzono w warunkach wglębnych przy 200 rpm, w 28°C przez 3 doby. Co 24 h oznaczano ilość etanolu i glukozy w płynach pohodowlanych oraz stopień przyrostu biomasy komórkowej.

#### 2.2.3. Zgodność szczepów drożdży *S. cerevisiae* i ich mutantów oraz *P. stipitis* (wytwarzanie toksyn killerowych)

Zgodność drożdży *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> i Ja(a) oraz wybranych mutantów sprawdzono na podłożu do oznaczania aktywności killerowej z błękitem metylenowym jako wskaźnik żywotności komórek. Szczepy *S. cerevisiae* i mutanty rozprowadzono na w/w podłożu agarowym, aby uzyskać jednolity wzrost, natomiast *P. stipitis* szczepiono w postaci rysy. Wykonano również układ odwrotny w celu sprawdzenia aktywności killerowej *S. cerevisiae*. Po inkubacji płytek w 28°C przez 3 doby, sprawdzono efekt działania drobnoustrojów zakładając, że potencjalny producent toksyny killerowej, rosnący w postaci linii, byłby otoczony strefą zahamowania wzrostu komórek wrażliwych, ograniczoną strefą komórek martwych, barwiących się na niebiesko błękitem metylenowym (8).

#### 2.2.4. Równoczesna fermentacja glukozy i ksylozy do etanolu przez mieszane hodowle drożdży *P. stipitis* CCY 39501 z jednym ze szczepów drożdży *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> i Ja(a) lub ich wybranymi mutantami oddechowymi V<sub>30</sub>l40, V<sub>30</sub>lll24, Ja116, Ja1125

Badane drożdże ze skosów brzeczkowych lub YPG zaszczepiono na podłoże inokulacyjne w ilości 10 ml i inkubowano 24 h w 28°C na wyrząsarce Centromat R przy 150 rpm. Tak uzyskane inokula zawierały około  $4-6 \times 10^7$  komórek/ml. Podłoża fermentacyjne w ilości 150 ml w kolbach o objętości 500 ml szczepiono przygotowanymi hodowlami inokulum w ilości 2% obje-

tościowych (1% *S. cerevisiae* + 1% *P. stipitis*). Hodowle fermentacyjne wgłębne prowadzono na wytrząsarce Centromat R firmy B. Braun Biotech International przy 150 rpm, aby umożliwić niewielkie natlenianie, w temp. 28°C przez 6 dni. Próbkę analizowano co 24 h.

### 2.2.5. Metody analityczne

Przyrost biomasy oznaczono w następujący sposób: odwirowano 10 ml hodowli biomasy, przemywano wodą destylowaną, a następnie suszono w temp. 104°C do stałej masy. Przy analizie aktywności fermentacyjnej mutantów oddechowych oznaczano przyrost biomasy na podstawie gęstości optycznej przy  $\lambda=550$  nm.

Zawartość glukozy w płynach fermentacyjnych szczepów Ja(a) i V<sub>30</sub> i ich mutantów oddechowych oznaczano metodą opisaną przez Millera z kwasem 3,5-dwunitrosalicylowym (11).

Zawartość glukozy, ksylozy i ksylitolu w próbach fermentacyjnych oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Rozdział prowadzono na kolumnie firmy Tessek (Czechy) wypełnionej nośnikiem Sepharon-NH<sub>2</sub> o długości 250 mm oraz wykorzystano detektor refraktometryczny RI. Fazę ruchomą stanowił acetonitryl i woda w stosunku 80:20.

Zawartość etanolu oznaczano metodą chemiczną Kellermanna (12).

## 3. Wyniki

W wyniku mutagenizacji drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* Ja(a) i V<sub>30</sub> wyselekcjonowano 8 mutantów Ja(a) oraz 11 mutantów V<sub>30</sub>. W porównaniu ze szczepami wyjściowymi charakteryzowały się one wolniejszymi przyrostami biomasy i zużyciem glukozy zwłaszcza w pierwszej dobie inkubacji (szczepy wyjściowe już po pierwszej dobie wykorzystywały prawie w całości glukozę, podczas gdy mutanty po dwóch dobach) oraz wolniejszą produkcją etanolu. Największe stężenia etanolu w pożywce odnotowano po dwóch lub trzech dobach hodowli.

W badaniach zgodności szczepów i aktywności killerowej dowiedziono, że analizowane drożdże *S. cerevisiae* i *P. stipitis* nie wytwarzały czynników killerowych, czyli dawały możliwość dowolnego łączenia ich w prowadzeniu wspólnej hodowli i łącznej fermentacji glukozy i ksylozy.

### 3.1. Fermentacja mieszaniny glukozy i ksylozy przez drożdże macierzyste *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> i Ja(a) i *P. stipitis* w warunkach hodowli wgłębnej

Do fermentacji wykorzystano podłoże zawierające mieszaninę glukozy i ksylozy w stosunku zbliżonym do składu hydrolizatów ligninocelulozowych, a zatem 3,5% glukozy i 1,5% ksylozy, w którym szczepy macierzyste *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> i Ja(a) szybko asymilowały glukozę, gdyż po 48 h nie wykryto obecności tego cukru w podłożu pohodowlanym. Natomiast *P. stipitis* w mi-

nimalnym stopniu zużyła ksylozę w połączeniu ze szczepem *S. cerevisiae* V<sub>30</sub>, a łącznie z *S. cerevisiae* Ja(a) wykorzystała około 0,5% użytej pentozy. Podczas wspólnych hodowli drożdży gorzelnicznych Ja(a) z *P. stipitis* po dwóch dobach fermentacji uzyskano ok. 2% v/v etanolu, co stanowiło maksymalną wydajność, dochodzącą do 57,7% w stosunku do wydajności teoretycznej w przeliczeniu na sumę cukrów. W ciągu następnych dni ilość etanolu sukcesywnie się zmniejszała, prawdopodobnie na skutek reasymilacji etanolu jako źródła węgla w miejsce glukozy, która została zużyta, lub wskutek częściowego jego utlenienia. W drugiej dobie hodowla osiągnęła fazę stacjonarną wzrostu.

W przypadku równoczesnej hodowli drożdży *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> i *P. stipitis* największe stężenie etanolu odnotowano dopiero po 96 h hodowli — 2,26% v/v. Osiągnięto wówczas maksymalną wydajność procesu równą 55,9%, chociaż komórki osiągnęły stacjonarną fazę wzrostu po 48 h inkubacji. Dokładne dane przedstawione są w tabelach 1,2,3.

### 3.2. Fermentacja mieszaniny glukozy i ksylozy przez upośledzony oddechowo mutant *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> lub mutant drożdży Ja(a) wraz z *P. stipitis* w warunkach hodowli wglębniej

W hodowlach *S. cerevisiae* Ja116 lub Ja1125 z *P. stipitis* całkowite zużycie glukozy nastąpiło po 48 h, po czym drożdże rozpoczęły utylizację ksylozy, która po sześciu oraz pięciu dobach uległa całkowitej asymilacji. Podczas hodowli *P. stipitis* z mutantem oddechowym V<sub>30</sub>III24 ubytek cukrów kształtował się podobnie, natomiast gorszy efekt uzyskano z użyciem mutantu V<sub>30</sub>I40, który wykorzystywał glukozę wolniej niż pozostałe mutanty. W związku z tym proces wydłużył się w czasie i po sześciu dobach pozostało jeszcze około 0,5% nie wykorzystanej przez *P. stipitis* ksylozy (tab. 1). Etanol wytwarzany przez kultury mieszane drożdży Ja116 lub Ja1125 i *P. stipitis* pojawił się w maksymalnych stężeniach odpowiednio po 72 i 96 h. Osiągnięto wówczas maksymalne wydajności etanolu wynoszące odpowiednio 54,7% i 53,6-50,5%. W kolejnych dwóch dobach jego stężenie obniżyło się prawdopodobnie na skutek reasymilacji, gdyż w końcowej fazie hodowli stanowił jedyne źródło węgla, lub na skutek częściowego utlenienia. Przyrosty biomasy w hodowlach *P. stipitis* zarówno z mutantami Ja(a), jak i V<sub>30</sub> były najwyższe po 48 h. W ciągu kolejnych dni hodowli nieco się zmniejszyły, ale ilość biomasy komórkowej sukcesywnie wzrastała do piątej doby, osiągając w tych hodowlach wyższe wartości w porównaniu z hodowlami z udziałem szczepów macierzystych (tab. 2 i 3).

TABELA 1  
ZAWARTOŚĆ CUKRÓW W PODŁOŻU POHODOWLANYM W POSZCZEGÓLNYCH DOBACH HODOWLI (%)

Szczepy	Zawartość cukrów (%) w podłożu po określonym czasie hodowli											
	1 doba		2 doba		3 doba		4 doba		5 doba		6 doba	
	ksyl.	gluk.	ksyl.	gluk.	ksyl.	gluk.	ksyl.	gluk.	ksyl.	gluk.	ksyl.	gluk.
Ja(a) + <i>P. stipitis</i>	1,5	1,58	1,48	0	1,41	0	1,33	0	1,31	0	0,99	0
Ja16 + <i>P. stipitis</i>	1,5	2,41	1,5	0,17	0,96	0	0,54	0	0,25	0	0,04	0
Ja125 + <i>P. stipitis</i>	1,5	2,85	1,5	0,12	0,87	0	0,31	0	0,05	0	0	0
V <sub>30</sub> + <i>P. stipitis</i>	1,5	0,5	1,48	0,09	1,38	0,07	1,37	0,01	1,37	0	1,36	0
V <sub>30</sub> 140 + <i>P. stipitis</i>	1,5	3,05	1,5	0,8	1,5	0,18	1,32	0,03	1,04	0	0,55	0
V <sub>30</sub> 1124 + <i>P. stipitis</i>	1,5	2,85	1,5	0,19	0,99	0,04	0,52	0,02	0,03	0	0	0

ksyl. — ksyloza, gluk. — glukoza

TABELA 2  
ZAWARTOŚĆ ETANOLU W PODŁOŻU POHODOWLANYM W POSZCZEGÓLNYCH DOBACH HODOWLI (% v/v)

Szczepy	Zawartość etanolu (% v/v) w podłożu w określonym czasie hodowli					
	1 doba	2 doba	3 doba	4 doba	5 doba	6 doba
Ja(a) + <i>P. stipitis</i>	1,75	2,00	1,90	1,71	1,64	1,53
Ja16 + <i>P. stipitis</i>	1,13	1,60	2,04	1,75	1,53	1,97
Ja125 + <i>P. stipitis</i>	0,91	1,46	2,00	2,04	1,97	1,60
V <sub>30</sub> + <i>P. stipitis</i>	0,80	1,50	1,82	2,26	2,15	2,19
V <sub>30</sub> 140 + <i>P. stipitis</i>	0,84	1,42	1,79	2,37	2,26	2,04
V <sub>30</sub> 1124 + <i>P. stipitis</i>	0,65	1,71	1,93	1,75	1,75	1,75

TABELA 3  
PRZYROST BIOMASY W POSZCZEGÓLNYCH DOBACH HODOWLI (mg SUCHEJ MASY/ml)

Szczepy	Ilość suchej masy (mg/ml) w określonym czasie hodowli					
	1 doba	2 doba	3 doba	4 doba	5 doba	6 doba
Ja(a) + <i>P. stipitis</i>	3,4	3,5	3,1	3,3	3,3	3,3
Ja16 + <i>P. stipitis</i>	1,8	3,5	4,1	4,6	5,8	5,5
Ja125 + <i>P. stipitis</i>	2,5	3,7	3,8	3,6	4,3	3,6
V <sub>30</sub> + <i>P. stipitis</i>	3,7	3,9	3,7	3,5	3,6	3,3
V <sub>30</sub> 140 + <i>P. stipitis</i>	2,0	3,8	4,2	4,7	5,4	5,1
V <sub>30</sub> 1124 + <i>P. stipitis</i>	1,7	3,7	4,4	4,3	5,2	4,9

W kulturze mieszanej mutantu  $V_{30}I40$  z *P. stipitis*, który wolniej zużywał glukozę, najwyższe stężenie etanolu osiągnięto po 96 h — 2,37% v/v (wydajność maksymalna 58,66%) i ilość ta nieznacznie obniżyła się podczas dwóch kolejnych dób hodowli. Nieco mniejsze stężenie etanolu zaobserwowano w hodowli *P. stipitis* — mutant  $V_{30}III24$ , gdyż nie przekraczało ono 2% po 72 h inkubacji, po czym nieznacznie spadło (tab. 2).

W żadnej kombinacji hodowlanej nie odnotowano wydzielania ksylitolu, który mógłby być produktem ubocznym prowadzonej fermentacji.

#### 4. Dyskusja

Obserwując proces fermentacji prowadzony przez oba niezmutowane szczepy *S. cerevisiae* wraz z *P. stipitis* można zauważyć szybką asymilację glukozy przy niewielkim wykorzystaniu ksylozy. Maksymalne wydajności etanolu stwierdzono po 2 dobach fermentacji z udziałem Ja(a) (57,7%), i dopiero po 4 dobach z udziałem  $V_{30}$  (55,93%). Tę niską wydajność fermentacyjną może tłumaczyć zwiększony przyrost biomasy związany z faktem, że hodowle prowadzono w warunkach częściowego natleniania. Mając na uwadze niskie wykorzystanie ksylozy wynoszące 34% dla hodowli *S. cerevisiae* Ja(a) + *P. stipitis* i tylko blisko 3% dla  $V_{30}$  + *P. stipitis*, przy 100% zużyciu glukozy, należy stwierdzić, że w tych układach etanol pochodził głównie z fermentacji glukozy. Niska wydajność fermentacyjna *P. stipitis* w połączeniu z drożdżami gorzelnicznymi mogła być spowodowana m. in.

1) hamującym wpływem etanolu wydzielanego do podłoża przez *S. cerevisiae* w pierwszych dobach hodowli, gdyż zgodnie z innym badaniem *P. stipitis* charakteryzuje się znacznie większą wrażliwością na wyższe stężenia etanolu niż *S. cerevisiae* (1,4);

2) szybkim zużyciem składników odżywczych przez aktywne drożdże *S. cerevisiae*, co uniemożliwiło wzrost *P. stipitis* (4);

3) wytwarzaniem związków chemicznych, których nie analizowano ilościowo, a które powstają podczas hodowli, np. glicerol lub octan (13);

4) warunkami beztlenowymi, wskutek szybkiego katabolizmu glukozy przez *S. cerevisiae*, gdyż jak wykazali Laplace i wsp. (4) podczas hodowli tych drobnoustrojów, aktywnie rosnących i fermentujących prężność tlenu spada w podłożu do zera.

Aby zatem sprostać wymaganiom tlenowym drożdży fermentujących ksylozę pojawiła się idea pozyskania mutantów drożdży *S. cerevisiae* z defektem w metabolizmie tlenowym. Znane jest mutagenne działanie bromku etyldyny na mitochondrialny DNA, odpowiedzialny za syntezę m. in. enzymów oddychania tlenowego włącznie z oksydacyjną fosforylacją (14). W tym układzie jako główne szlaki kataboliczne pozostają zatem przemiany beztlenowe u zmutowanych *S. cerevisiae*, a obecny w podłożu tlen może być wykorzystany przez *P. stipitis*. Hodowle z udziałem mutantów oddechowych *S. cerevisiae* Ja(a) i  $V_{30}$  potwierdziły te założenia. *P. stipitis* podczas wspólnych hodowli z mutantem oddechowym w dużo większym stopniu wykorzystywała

ksylozę z podłoża, co wskazuje na dogodniejsze warunki do jej rozwoju w porównaniu z poprzednio omówionym układem hodowlanym. W tym przypadku zapewniono lepszy dostęp tlenu w podłożu dla *Pichii stipitis*, co zaowocowało większym wzrostem biomasy komórkowej po drugiej dobie inkubacji. Należy podkreślić, że w hodowlach *P. stipitis* z macierzystymi *S. cerevisiae* po dwóch dobach fermentacji nie obserwowano przyrostu biomasy. Można zatem sądzić, że w obecności mutantów oddechowych nastąpił lepszy rozwój drożdży fermentujących ksylozę, gdyż miały one korzystniejsze warunki tlenowe do asymilacji glukozy. Chociaż podczas konkurencji pomiędzy drożdżami o glukozę jako źródło węgla *S. cerevisiae* znacznie szybciej wykorzystywały użytą heksozę niż drożdże z rodzaju *Pichia* czy *Candida*, to nie zmniejszyło to jej hamującego efektu na pobieranie i wykorzystywanie ksylozy, nawet w korzystnych dla tego procesu warunkach tlenowych (4). Udowodniono, że glukoza silnie hamowała przyswajanie ksylozy przez drożdże fermentujące ksylozę w mieszaninie cukrów, a wielkość represji zależała od względnych proporcji obu węglowodanów i sposobu hodowli drożdży. Tego typu zachowanie określa się jako tzw. zachowanie diauksyczne drożdży *P. stipitis* czyli sekwencyjne wykorzystanie heksoz i pentoz (13). W prowadzonym doświadczeniu spadek zawartości glukozy do ok. 0,1% umożliwił szybką asymilację ksylozy. Z kolei w pracach Grootjena i wsp. (13) odnotowano, że przy stężeniu glukozy w podłożu równym 0,23% ciągle jeszcze inhibowany był proces przyswojenia stosowanej pentozy, podobne dane odnośnie do represyjnego działania glukozy w stężeniu powyżej 0,2% podał Panchal i wsp. (15). Wykorzystanie zarówno glukozy jak i ksylozy przez mikroorganizmy fermentujące ksylozę związane jest z metabolicznym działaniem glukozy na transport i indukcję enzymów włączonych w metabolizm ksylozy (4). Z rozważań tych wynika, że do fermentacji ksylozy konieczne jest szybkie obniżenie stężenia glukozy w podłożu, aby pozostała jej niewielka ilość 0,2-0,1%, która nie działa już represyjnie na proces asymilacji ksylozy.

W wyniku wspólnych hodowli z użyciem mutantów oddechowych drożdży *S. cerevisiae* i *P. stipitis* zarówno glukoza jak i ksyloza zostały wykorzystane całkowicie lub prawie całkowicie. Uzyskane wydajności etanolu rzędu ok. 50-60% są stosunkowo niskie, ale dalsze prace, w szczególności optymalizacja ilości wprowadzanego do hodowli tlenu, winna umożliwić przeprowadzenie procesu z wyższą wydajnością. Można również oczekiwać skrócenia czasu fermentacji. Ponadto ważne znaczenie dla przebiegu procesu ma odczyn podłoża. W prowadzonej hodowli początkowe pH wynosiło ok. 5 i nie było ono później kontrolowane. Należałoby zatem również określić optymalną wartość pH podłoża, aby podnieść wydajność i szybkość prowadzonej fermentacji. Inne możliwości intensyfikacji procesu to wykorzystywanie w procesie fermentacji immobilizowanych komórek drożdży (16) lub prowadzenie hodowli w seryjnych bioreaktorach (17).



**Literatura**

1. Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M., (1991), *Biotech. Lett.*, 13,6, 445-450.
2. Webb S. R., Lee H., (1990), *Biotech. Adv.*, 8, 685-697.
3. Du Preez J. C., Bosch M., Prior B. A., (1986), *Appl. Microb. Biotech.*, 23, 228-233.
4. Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M., (1993), *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 3, 207-212.
5. Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 398-402.
6. Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M., (1991), *Appl. Microb. Biotech.*, 36, 158-162.
7. Slininger P. J., Bothast R. J., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 1104-1112.
8. Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R., (1992), *Can. J. Microbiol.*, 38, 654-658.
9. Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M., (1993), *Appl. Microb. Biotech.*, 39, 760-763.
10. Mandels M., Weber J., (1969), *Adv. Chem. Ser.*, 95, 391-413.
11. Miller G. L., (1959), *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
12. Kellermann E., (1960), *Kvasný Prumysl*, 6, 11.
13. Grootjen D. R. J., van der Lans R. G. J. M., Luyben K. Ch. A. M., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 648-654.
14. Ułaszewski S., (1994), *Biotechnologia*, 1, 18-31.
15. Panchal C. J., Bast L., Russel I., Steward G. G., (1988), *Can. J. Microbiol.*, 34, 1316-1320.
16. Grootjen D. R. J., Meijlink L. H. H. M., Vleesenbeek R., van der Lans R. G. J. M., Luyben K. Ch. A. M., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 530-536.
17. Grootjen D. R. J., Jansen M. L., van der Lans R. G. J. M., Luyben K. Ch. A. M., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 828-833.

**Using respiratory deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose and xylose cofermentation with *Pichia stipitis*****Summary**

One of the main problems limiting the economic production of ethanol from lignocellulosic biomass is D-xylose fermentation. In a medium containing glucose and xylose, it is preferable to achieve conversion with glucose fermenting yeast like *S. cerevisiae* and xylose fermenting yeast like *P. stipitis*. In order to resolve this problem, it is better to use respiratory deficient mutants. In this research, respiratory deficient mutant strains *S. cerevisiae* V<sub>30</sub> and Ja(a) were obtained and their ability to ferment glucose in coculture with *P. stipitis* was investigated. A higher xylose conversion was observed in *P. stipitis* cultivation with these mutants because of better oxygen conditions than in the culture with native *S. cerevisiae*. A degree of assimilated xylose did not efficiently increased ethanol yields but on the other hand it increased the production of yeast biomass. Process conditions in relation to the fermentative performances using different strains combinations are discussed.

**Key words:**

xylose, glucose, cofermentation, *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, respiratory deficient mutants.

**Adres do korespondencji:**

Zdzisław Targoński, Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa, Akademia Rolnicza, ul. Skromna 8, skr. pocz. 158, 20-950 Lublin.