



Biotransformacja L-arabinozy do arabitolu przez drożdże z rodzaju *Pichia* i *Candida*

Monika Kordowska-Wiater, Zdzisław Targoński, Anna Jarosz
Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,
Akademia Rolnicza, Lublin

Biotransformation of L-arabinose to arabitol by yeasts from genera *Pichia* and *Candida*

Summary

Biotransformation of L-arabinose to arabitol by selected yeasts was described. *P. stipitis* CCY 39501, *P. guilliermondii* DSM 70052, *C. shehatae* 3504, *C. shehatae* ATCC 22984, *C. pseudotropicalis* IPF 65, *C. parapsilosis* DSM 70125 were investigated to produce L-arabitol. *C. parapsilosis* DSM 70125 was the best producer of arabitol that was detected in concentrations 10-14 gdm⁻³ in the medium. The highest yield (0,78 gg⁻¹) and productivity (0,036 g(gxh)⁻¹) were also obtained for this strain. The other quite good producers of arabitol were *P. guilliermondii* DSM 70052 and *C. shehatae* ATCC 22984 that produced polioliol with yields 0,43 gg⁻¹ and 0,50 gg⁻¹, respectively, in optimal conditions. Rotation conditions of shaker on the level 150 rpm and temperature of incubation 28°C were selected to be optimal for biotransformation by all yeasts.

Key words:

L-arabinose, arabitol, biotransformation, *Pichia*, *Candida*.

Adres do korespondencji

Monika Kordowska-Wiater,
Katedra Biotechnologii,
Żywnienia Człowieka
i Towaroznawstwa
Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Skromna 8,
20-950 Lublin.

1. Wstęp

Jednym z cukrów wchodzących w skład hemicelulozowej frakcji ligninocelulozy jest L-arabinoza. Ta pentoza wchodzi w skład np. arabinoglukuronoksylanów i arabinogalaktanów. W zależności od pochodzenia hemiceluloz może stanowić od ok. 1% w drewnie brzozy do ok. 45% frakcji ksylanu otrąb ryżowych (1). Arabinozę można uzyskać na drodze chemicznej lub enzyma-

tycznej hydrolizy hemiceluloz, oczyszczenia, a następnie w postaci roztworu może stanowić źródło węgla dla mikroorganizmów asymilujących L-arabinozę. Chemiczna transformacja arabinozy do arabitolu wymaga obecności katalizatora Ru/C i przebiega w temperaturze 240°C przy ciśnieniu wodoru wynoszącym 100 barów, a zatem w dość drastycznych warunkach jak na cukry (2). Drogi komórkowego katabolizmu tej pentozy przebiegają w kierunku transformacji do arabitolu, ksylitolu lub fermentacji do etanolu (3-5). W komórkach grzybów L-arabinoza jest przekształcana przez reduktazę aldozy do arabitolu, który w kolejnych etapach przemian wchodzi do cyklu pentozofosforanowego, a następnie w zależności od warunków środowiska i zdolności metabolicznych drobnoustroju wchodzi do cyklu Krebsa lub ulega przemianie do etanolu. Niektóre drożdże wykazujące zdolność do asymilacji L-arabinozy, wydzielają jako główny produkt arabitol i tylko nieliczne produkują niewielkie ilości etanolu. Zjawisko akumulacji arabitolu badacze tłumaczą nierównowagą ko-faktorową (NADPH/NADP lub NADH/NAD) początkowych przemian metabolicznych L-arabinozy w komórkach mikroorganizmów (4,5).

W badaniach Saha i Bothast wśród 49 szczepów drożdży najbardziej wydajne w produkcji arabitolu były *Candida entomaea* NRRL-Y-7785 i *Pichia guilliermondii* NRRL-Y-2075 (6). Również *Debaryomyces hansenii* badane przez Girio i wsp. miały zdolność transformacji L-arabinozy do arabitolu (7). Z kolei drożdże *Candida arabinof fermentans*, *Ambrosiozyma monospora*, *Candida succiphila* i *C. auringensis* wytwarzały etanol na podłożu zawierającym L-arabinozę jako źródło węgla (8,9).

Wydzielany arabitol mógłby być wykorzystany podobnie jak ksylitol w przemyśle spożywczym jako niskokaloryczny słodzik dobrze tolerowany przez diabetyków, stabilizator wilgotności, składnik polew jadalnych lub w przemyśle farmaceutycznym jako komponent farmaceutyków (6,10). Jednak pomimo tych możliwości arabitol jest w niewielkim stopniu wykorzystywany ze względu na wysokie koszty produkcji i trudną dostępność. Dlatego też prowadzone są poszukiwania nowych szczepów wydajnie produkujących arabitol oraz optymalizacja zarówno procesów rozkładu hemiceluloz jak i biotransformacji.

Celem pracy była selekcja szczepu z dzikich drożdży z rodzaju *Pichia* i *Candida* zdolnych do wydajnej transformacji L-arabinozy do arabitolu z jednoczesnym określeniem wpływu szybkości rotacji wytrząsarki, w której prowadzono hodowle oraz temperatury procesu.

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizmy

W badaniach użyto następujących szczepów drożdży znajdujących się w kolekcji Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Akademii

Rolniczej w Lublinie, a zakupionych w różnych kolekcjach szczepów na świecie: *Pichia stipitis* CCY 39501, *P. guilliermondii* DSM 70052, *Candida shehatae* 3504, *C. shehatae* ATCC 22984, *C. pseudotropicalis* IPF 65, *C. parapsilosis* DSM 70125. Drożdże te wstępnie sprawdzono pod kątem zdolności do asymilacji L-arabinozy. Szczepy przechowywano na skosach agarowych YPG w temp. 4°C i okresowo je przeszczepiano.

2.2. Podłoże hodowlane

Do przygotowania inokulum drożdży i hodowli właściwych wykorzystano pożywkę płynną o następującym składzie (gdm^{-3}): L-arabinoza 20; ekstrakt drożdżowy 3; ekstrakt słodowy 3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; KH_2PO_4 3; o pH 5,5.

2.3. Techniki hodowlane

Podłoże inokulacyjne w probówkach szczepiono drożdżami ze skosów agarowych i inkubowano przez 1 dobę w temperaturze 28°C.

Podłoże hodowlane w ilości 100 cm^3 w kolbach stożkowych na 250 cm^3 zaszczerpiono inokulum tak, aby uzyskać stężenie wyjściowe 2% obj. Hodowle umieszczono na wstrząsarce Centromat R (B Brown International) i inkubowano w temperaturze 28°C przez 4 doby stosując różne szybkości wstrząsania: 50, 100, 150, 200 rpm. W kolejnym etapie badań zastosowano temperatury inkubacji 24 i 32°C przy wstrząsaniu na poziomie 150 rpm. Każdej doby pobierano z hodowli próbki do badań analitycznych.

2.4. Metody analityczne

Biomasę komórek drożdży oznaczano na podstawie pomiaru gęstości optycznej (OD) na spektrofotometrze Specol 11 przy długości fali $\lambda = 600$ nm. Uzyskane wyniki przeliczano na suchą masę drożdży na podstawie przygotowanych krzywych wzorcowych zależności suchej masy od gęstości optycznej. Na podstawie zawartości suchej masy drożdży obliczano wydajność biomasy z 1 g zasymilowanego przez drobnoustroje cukru [Y_B gg^{-1}].

Do oznaczenia stężeń L-arabinozy i L-arabitolu pobrane próbki hodowli drożdży odwirowano w wirówce Sigma typ 4K15 przy 9000 rpm przez 10 min. W supernatantach oznaczano zawartość wymienionych związków metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Rozdział prowadzono na kolumnie Aminex HPX 42C Bio Rad poprzedzonej prekolumną, a do detekcji stosowano detektor refraktryczny (RID) Knauer. Jako eluent służyła woda DDI o temperaturze 85°C i prze-

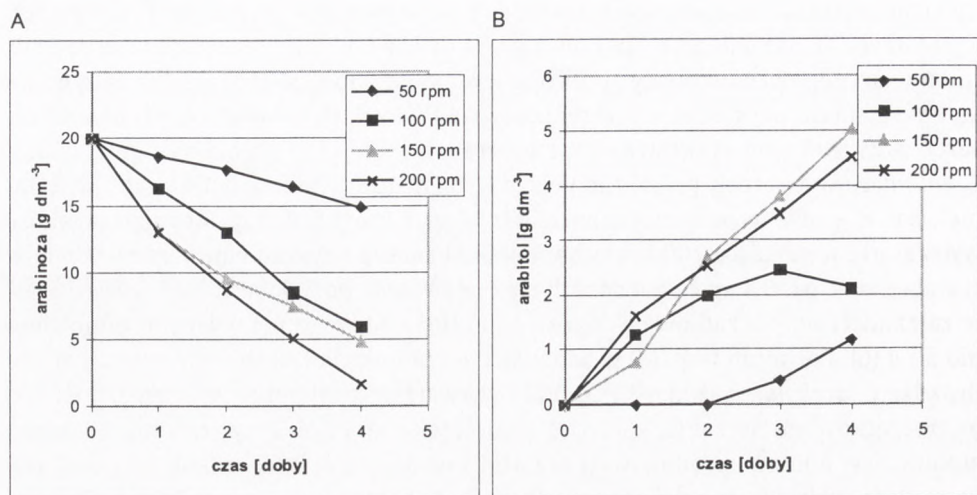
plywie $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Jako wzorców do identyfikacji związków i oznaczenia ich stężeń w próbkach użyto 0,125% roztworów L-arabinozy (POCh) i L-arabitolu (Sigma). Na podstawie zawartości cukru i polialkoholu w poszczególnych dobach hodowli obliczono maksymalne wydajności procesów fermentacyjnych, określając ilości gramów L-arabitolu wyprodukowanych z 1 g arabinozy przez drożdże [$Y_A \text{ gg}^{-1}$] oraz stopień zużycia cukru [$S_A\%$] w czasie odpowiadającym maksymalnemu stężeniu L-arabitolu. Produktywność arabitolu wyliczono na podstawie uzyskanej wydajności tego polioliu przypadającej na jednostkę czasu [$q_A \text{ g(gxh)}^{-1}$].

Podczas pobierania prób oznaczano ich odczyn (pH) stosując pehametr pH-Me-ter CG840 wyposażony w elektrodę zespoloną kalomelowo-szklaną.

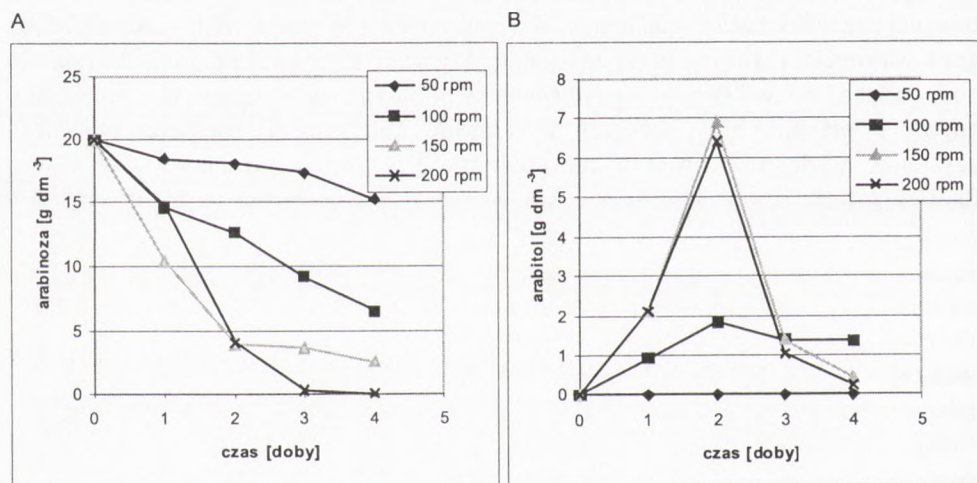
3. Wyniki i dyskusja

Biotransformacja L-arabinozy do L-arabitolu jest procesem dość rzadko opisywanym przez badaczy. McMillan i Boynton (11), Dien i wsp. (8), Saha i Bothast (6), Girio i wsp. (7) prowadzili badania na drożdżach z rodzaju *Candida*, *Pichia* oraz *Debaryomyces* i spośród wielu szczepów wyselekcjonowali tylko kilku producentów tego polioliu (6-8,11). W prezentowanej pracy wykazano, że wszystkie badane szczepy drożdży asymilowały L-arabinozę i wytwarzały L-arabitol, a dynamika asymilacji i biotransformacji uzależniona była od szybkości wstrząsania hodowli na wytrząsarce. Dokładny przebieg procesu asymilacji arabinozy przedstawiono na rysunkach 1A-6A. Tempo asymilacji rosło wraz ze wzrostem szybkości mieszania hodowli, a tym samym zwiększonym dostępem tlenu. Pentoza była najszybciej wykorzystywana przez *C. parapsilosis* DSM 70125, zwłaszcza przy 150 i 200 rpm wytrząsarki (rys. 6A). Przy wspomnianych szybkościach wstrząsania prawie wszystkie szczepy zużyły arabinozę całkowicie lub pozostało jej ok. 1-2% po 4 dobach hodowli, zaś przy szybkości wstrząsania na poziomie 50 rpm drożdże zużyły tylko 5-7,5 gdm^{-3} cukru. Drożdże *C. pseudotropicalis* IPF 65 asymilowały arabinozę z największą szybkością przy 100 rpm (rys. 5A), kiedy to po 4 dobach stwierdzono brak tego cukru w podłożu. Natomiast w hodowlach pozostałych szczepów w pożywce zostało 4-7 gdm^{-3} L-arabinozy. Drożdże wykorzystywały L-arabinozę do produkcji biomasy oraz wydzielaly polialkohol L-arabitol do środowiska (tab.). Z reguły najwyższe stężenia polialkoholu oznaczano w hodowlach drożdży prowadzonych przy 150 rpm (rys. 1B-6B). Najwyższe stężenia i wydajności arabitolu uzyskano w hodowli szczepu *C. parapsilosis* DSM 70125 (10-14 gdm^{-3} polioliu, wydajności 0,51-0,78 gg^{-1}) (rys. 6B. tab.). Również w hodowlach *C. shehatae* ATCC 22984 oraz *P. guilliermondii* NRRL Y-2075 odnotowano wysokie stężenia i wydajności tego polialkoholu, odpowiednio 8,57 gdm^{-3} przy 150 rpm i wydajności 0,50 gg^{-1} oraz 6,41 gdm^{-3} przy 200 rpm i wydajności 0,43 gg^{-1} (rys. 2B, 4B, tab.). Wybrane parametry procesu produkcji arabitolu z L-arabinozy przez wszystkie badane mikroorganizmy przedstawiono w tabeli. Saha i Bothast przeprowadzili screening 49 szczepów drożdży asymilujących L-arabinozę i spośród wielu producentów L-arabi-

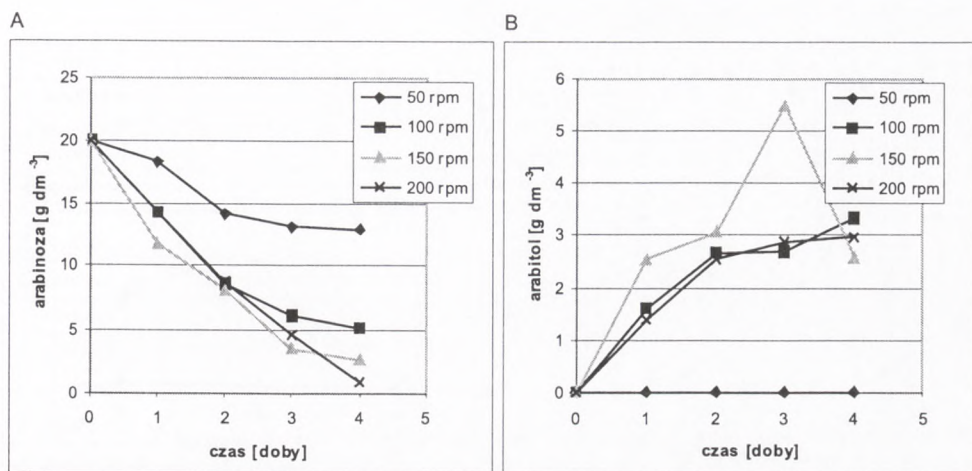
tolu najwydajniejsze były: *Candida entomaea* NRRL Y-7785 i *Pichia guilliermondii* NRRL Y-2075 (6). W wyniku hodowli *C. entomaea* z 50 gdm^{-3} L-arabinozy uzyskano $33,0 \pm 0,9 \text{ gdm}^{-3}$ polioliu osiągając wydajność $0,66 \text{ gg}^{-1}$ w temperaturze 34°C i przy 200 rpm wytrząsarki. Natomiast drożdże *P. guilliermondii* w tych samych warunkach wytworzyły $31,5 \pm 0,8 \text{ gdm}^{-3}$ polioliu z wydajnością $0,63 \text{ gg}^{-1}$. W temperaturze 28°C te same szczepy produkowały arabitól z wydajnościami $0,56\text{-}0,57 \text{ gg}^{-1}$, a zatem nieco wyższymi od uzyskiwanych w tej pracy. W hodowlach prowadzonych na wytrząsarce przy 400 rpm efektywny czas biotransformacji był skrócony, ale drożdże *C. entomaea* wytwarzały polioli z mniejszą wydajnością wynoszącą $0,43 \text{ gg}^{-1}$ (po 1 dobie), zaś *P. guilliermondii* z wydajnością $0,58 \text{ gg}^{-1}$ (po 1,5 doby). Stosując szybkość wytrząsarki wynoszącą 200 rpm wspomniani badacze uzyskali najwyższe wydajności arabitolu – ok. $0,7 \text{ gg}^{-1}$ po 4 dobach dla *C. entomaea* i po 5 dobach dla *P. guilliermondii* w zależności od początkowego odczynu podłoża, którego pH wynosiło odpowiednio 5 i 4 (6). Fonseca i wsp. (4) w badaniach metabolizmu L-arabinozy stwierdzili, że drożdże *C. arabinofementans* PYCC 5603 wytwarzały z tej pentozy, w zależności od jej początkowego stężenia, zarówno etanol, jak i arabitól. Przy stężeniu 80 gdm^{-3} arabinozy w podłożu produkowały arabitól z wydajnością $0,63 \pm 0,06 \text{ gg}^{-1}$, zaś, gdy w podłożu było 20 gdm^{-3} pentozy, drożdże te wytwarzały etanol i tylko śladowe ilości arabitolu w warunkach umiarkowanego napowietrzania. Z kolei w pracach ze szczepem *P. guilliermondii* PYCC 3012 wykazano, że niezależnie od początkowego stężenia L-arabinozy wydzielal on L-arabitól do środowiska hodowlanego z wydajnością $0,47\text{-}0,58 \text{ gg}^{-1}$ podczas ograniczonego napowietrzania (4). Badane w prezentowanej pracy drożdże *P. guilliermondii* uzyskiwały nieco niższe wydajności ($0,4\text{-}0,43 \text{ gg}^{-1}$). Natomiast Girio i wsp. (7) uzyskali maksymalne stężenie $2,86 \text{ gdm}^{-3}$ L-arabitolu po 5 dobach hodowli *Debaryomyces hansenii* w podłożu zawierającym 35 gdm^{-3} L-arabinozy o pH 5,5, przy obrotach wytrząsarki 150 rpm, w temperaturze 30°C , uzyskując wydajność procesu na poziomie $0,1 \text{ gg}^{-1}$ i produktywność równą $0,003 \text{ g(xh)}^{-1}$.



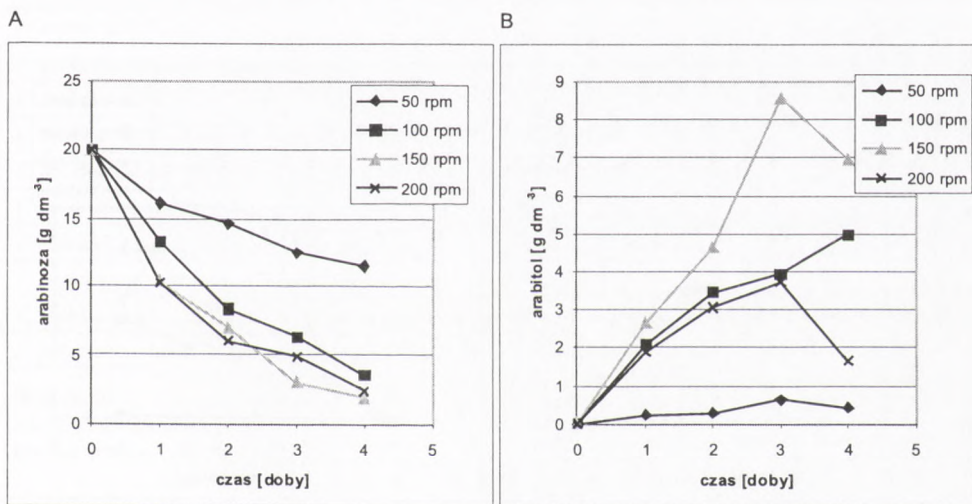
Rys. 1. Wpływ szybkości wstrząsania (rpm) na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *P. stipitis* CCY 39501.



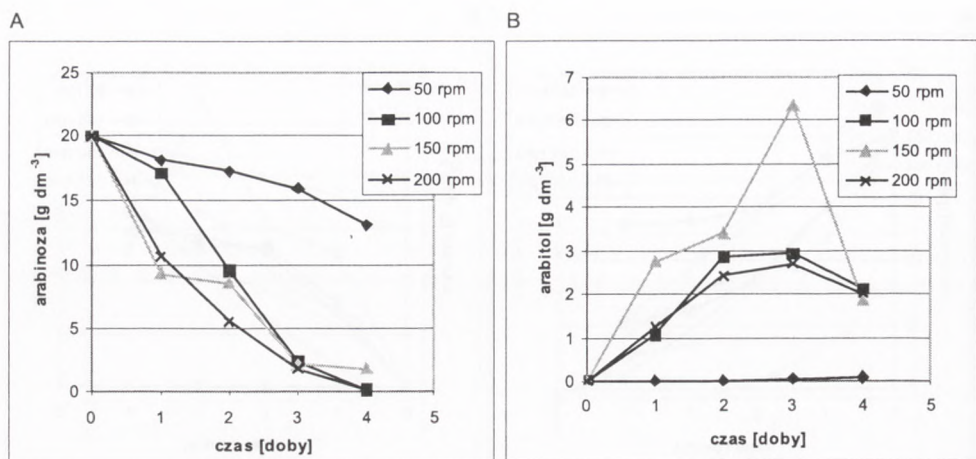
Rys. 2. Wpływ szybkości wstrząsania (rpm) na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *P. guilliermondii* DSM 70052.



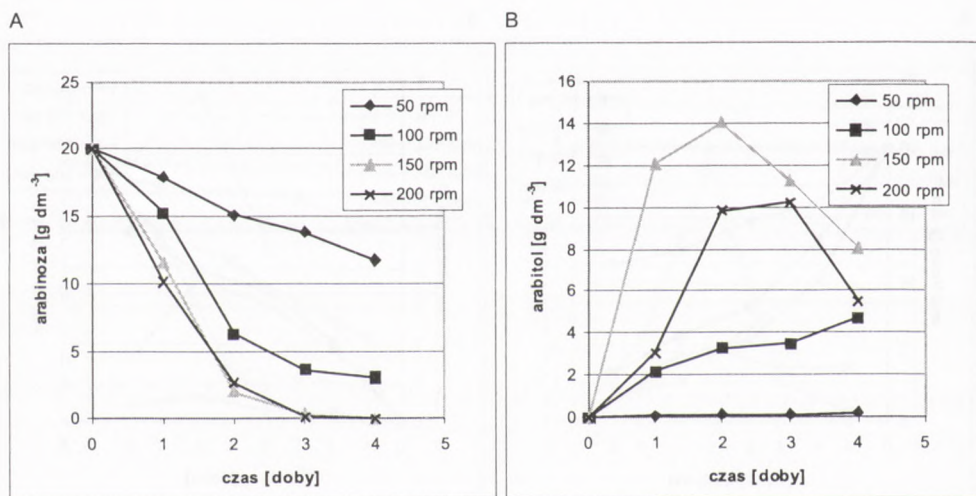
Rys. 3. Wpływ szybkości wstrząsania (rpm) na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *C. shehatae* 3504.



Rys. 4. Wpływ szybkości wstrząsania (rpm) na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *C. shehatae* ATCC 22984.



Rys. 5. Wpływ szybkości wstrząsania (rpm) na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *C. pseudotropicalis* IPF 65.



Rys. 6. Wpływ szybkości wstrząsania (rpm) na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *C. parapsilosis* DSM 70125.

Tabela

Parametry procesu biotransformacji L-arabinozy do L-arabitolu przez drożdże w zależności od warunków hodowli

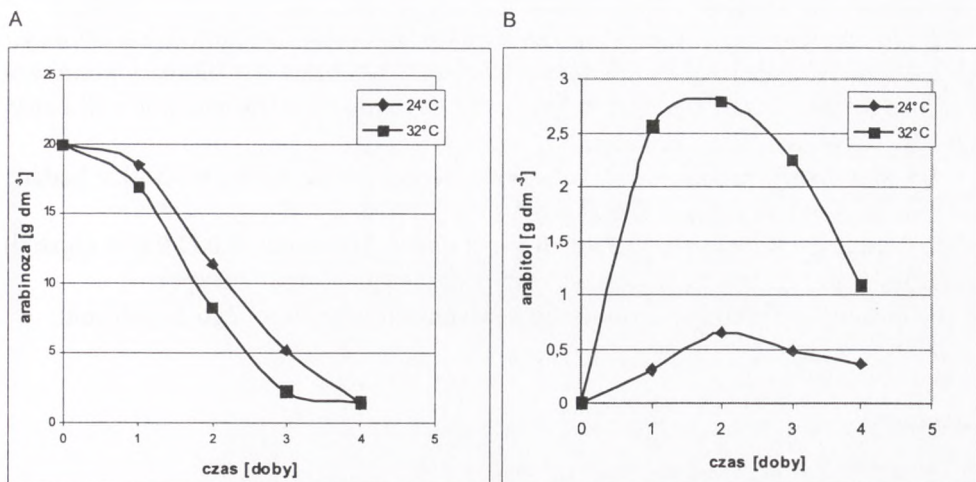
Szczep	Warunki	S_A [%]	Y_A [gg ⁻¹]	q_A [g(gxh) ⁻¹]	Y_B [gg ⁻¹]
<i>P. stipitis</i> CCY 39501	28°C, 50 rpm	26,00	0,23	0,004	0,58
<i>C. shebatae</i> ATCC 22984	28°C, 50 rpm	37,30	0,08	0,003	0,42
<i>C. pseudotropicalis</i> IPF 65	28°C, 50 rpm	35,00	0,008	0,0002	0,44
<i>C. parapsilosis</i> DSM 70125	28°C, 50 rpm	41,35	0,03	0,0006	0,45
<i>P. stipitis</i> CCY 39501	28°C, 100 rpm	57,4	0,21	0,005	0,45
<i>P. guilliermondii</i> DSM 70052	28°C, 100 rpm	36,3	0,25	0,007	0,42
<i>C. shebatae</i> 3504	28°C, 100 rpm	74,50	0,22	0,007	0,34
<i>C. shebatae</i> ATCC 22984	28°C, 100 rpm	82,00	0,30	0,009	0,37
<i>C. pseudotropicalis</i> IPF 65	28°C, 100 rpm	88,15	0,16	0,007	0,35
<i>C. parapsilosis</i> DSM 70125	28°C, 100 rpm	84,8	0,28	0,009	0,33
<i>P. stipitis</i> CCY 39501	28°C, 150 rpm	75,85	0,33	0,009	0,40
<i>P. guilliermondii</i> DSM 70052	28°C, 150 rpm	80,65	0,43	0,023	0,44
<i>C. shebatae</i> 3504	28°C, 150 rpm	82,50	0,33	0,013	0,39
<i>C. shebatae</i> ATCC 22984	28°C, 150 rpm	85,10	0,50	0,017	0,43
<i>C. pseudotropicalis</i> IPF 65	28°C, 150 rpm	89,60	0,35	0,014	0,35
<i>C. parapsilosis</i> DSM 70125	28°C, 150 rpm	90,05	0,78	0,036	0,46
<i>P. stipitis</i> CCY 39501	28°C, 200 rpm	91,85	0,24	0,007	0,35
<i>P. guilliermondii</i> DSM 70052	28°C, 200 rpm	80,35	0,40	0,015	0,46
<i>C. shebatae</i> 3504	28°C, 200 rpm	95,30	0,15	0,004	0,40
<i>C. shebatae</i> ATCC 22984	28°C, 200 rpm	75,60	0,25	0,008	0,40
<i>C. pseudotropicalis</i> IPF 65	28°C, 200 rpm	91,40	0,15	0,006	0,35
<i>C. parapsilosis</i> DSM 70125	28°C, 200 rpm	99,50	0,51	0,016	0,19
<i>C. shebatae</i> ATCC 22984	24°C, 150 rpm	43,5	0,07	0,003	0,45
<i>C. parapsilosis</i> DSM 70125	24°C, 150 rpm	68,25	0,13	0,007	0,36
<i>C. shebatae</i> ATCC 22984	32°C, 150 rpm	59,2	0,24	0,011	0,45
<i>C. parapsilosis</i> DSM 70125	32°C, 150 rpm	83,65	0,20	0,011	0,40

Objaśnienia: S_A – stopień zużycia arabinozy przypadający na maksymalne stężenie arabitolu [%], Y_A – wydajność arabitolu obliczona dla maksymalnego stężenia polioliu [gg⁻¹], q_A – produktywność arabitolu [g(gxh)⁻¹], Y_B [gg⁻¹] – wydajność biomasy obliczona dla maksymalnego stężenia biomasy [gg⁻¹].

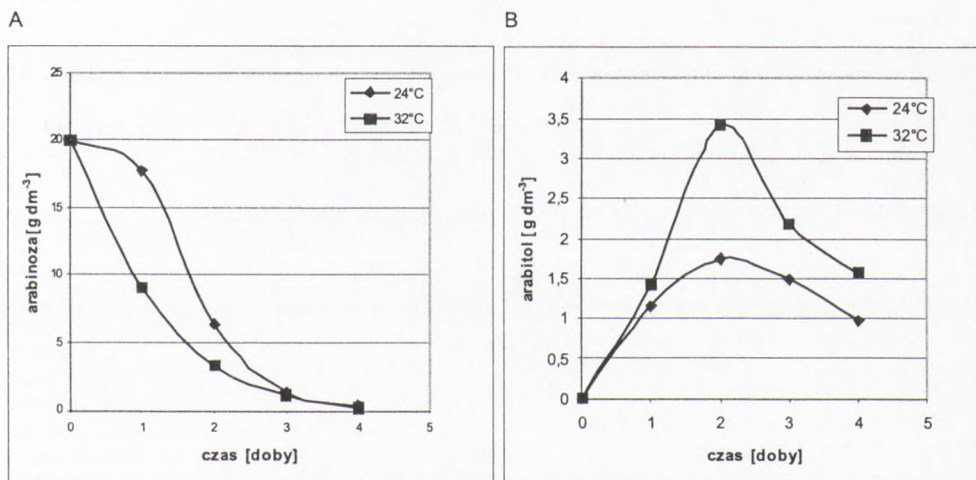
W prezentowanych badaniach proces biotransformacji przebiegał znacznie wolniej przy szybkości wytrząsania 50 i 100 rpm, gdzie maksymalne stężenia arabitolu wynosiły odpowiednio $1,18 \text{ gdm}^{-3}$ (*P. stipitis* CCY 39501) i 5 gdm^{-3} (*C. shehatae* ATCC 22984) (rys. 1B, 4B). Dwa szczepy, tj. *P. guilliermondii* DSM 70052 i *C. shehatae* 3504 w ogóle nie produkowały L-arabitolu przy najniższej szybkości wstrząsania (rys. 2B i 3B). W hodowlach badanych szczepów drożdży obserwowano spadek odczynu podłoża hodowlanego, który zależał od szybkości zużywania cukru. W hodowlach prowadzonych przy szybkościach obrotów wytrząsarki 150 i 200 rpm pH było zbliżone do 3 lub poniżej tej wartości, co mogło wpływać niekorzystnie na aktywność drożdży i ograniczać wydajności arabitolu. Saha i Bothast (6) badając wpływ kwasowości podłoża na produkcję arabitolu przez badane drożdże *Pichia* i *Candida* również zaobserwowali spadek aktywności drożdży przy pH 3.

W następnym etapie badań najefektywniejsze szczepy: *C. shehatae* ATCC 22984 i *C. parapsilosis* DSM 70125 wykorzystano do produkcji L-arabitolu w temperaturach 24 i 32°C, stosując szybkość wstrząsania równą 150 rpm. Okazało się, że w hodowlach prowadzonych w obu tych temperaturach drożdże produkowały mniejsze ilości L-arabitolu niż w badanej wcześniej temperaturze 28°C. Proces asymilacji pentozy przebiegał nieco wolniej i uzyskano zdecydowanie niższe stężenia L-arabitolu: o $5,77 \text{ gdm}^{-3}$ w hodowli *C. shehatae* i o $10,58 \text{ gdm}^{-3}$ w przypadku *C. parapsilosis* w temp. 32°C (rys. 7A i B, 8A i B). Stężenia polioliu w cieczach pochodzących z hodowli drożdży *C. shehatae* i *C. parapsilosis* inkubowanych w temp. 24°C były niższe odpowiednio o $7,92 \text{ gdm}^{-3}$ i o $12,23 \text{ gdm}^{-3}$ w stosunku do hodowli w temp. 28°C (rys. 7B i 8B). Wydajności i produktywności uzyskane przez te szczepy w hodowlach prowadzonych w 32°C osiągnęły wartości $0,2-0,24 \text{ gg}^{-1}$ i $0,011 \text{ g(gxh)}^{-1}$, w temperaturze 24°C były jeszcze niższe (tab.). Natomiast w badaniach Saha i Bothast (6) drożdże *C. entomaea* i *P. guilliermondii* w zakresie temperatur 22-34°C nie wykazały znacznych różnic w swojej aktywności.

Stwierdzono, że stężenie arabitolu zmniejszało się po zużyciu arabinozy, co można interpretować jego wtórną asymilacją, gdyż stężenie biomasy drożdży wciąż rosło. Podobne obserwacje poczynili Saha i Bothast (6), Girio i wsp. (7) oraz Fonseca i wsp. (4).



Rys. 7. Wpływ temperatury na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *C. shehatae* ATCC 22984.



Rys. 8. Wpływ temperatury na asymilację L-arabinozy (A) i produkcję arabitolu (B) przez *C. parapsilosis* DSM 70125.

4. Wnioski

1. Najwyższe stężenia, wydajności i produktywności L-arabitolu uzyskano w hodowli *Candida parapsilosis* DSM 70125.

2. W temperaturze 28°C uzyskano największe wydajności L-arabitolu z arabinozy.

3. Szybkość asymilacji L-arabinozy przez drożdże i przyrosty biomasy komórkowej na ogół zwiększały się wraz ze wzrostem szybkości wstrząsania hodowli i zwykle były najwyższe przy 200 rpm.

4. L-arabitol był produkowany w najwyższych stężeniach przez wszystkie badane szczepy podczas hodowli wstrząsanych przy 150 rpm.

5. Najwyższe wydajności (0,33-0,78 g g⁻¹) i produktywności (0,009-0,016 g(gxh)⁻¹) L-arabitolu osiągnięto stosując szybkość wstrząsania równą 150 rpm.

6. Badane drożdże były zdolne do reasymilacji wytworzonego L-arabitolu.

Literatura

1. Saha B. C., (2000), *Biotechnol. Adv.*, 18, 403-423.
2. www3.cbe.iastate.edu/nsfbioren/presentations/Shanks_ISU.pdf
3. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttillä M., (2003), *FEMS Yeast Res.*, 3, 185-189.
4. Fonseca C., Spencer-Martins I., Hahn-Hägerdal B., (2007a), *Appl. Microb. Biotech.*, 75, 303-310.
5. Fonseca C., Romão R., Rodrigues de Sousa H., Hahn-Hägerdal B., Spencer-Martins I., (2007b), *FEBS Journal*, 274, 3589-3600.
6. Saha B. C., Bothast R. J., (1996), *Appl. Microb. Biotech.*, 45, 299-306.
7. Girio F. M., Amaro C., Azinheira H., Pelica F., Amaral-Collação M. T., (2000), *Biores. Technol.*, 71, 245-251.
8. Dien B. S., Kurtzman C. P., Saha B. C., Bothast R. J., (1996), *Appl. Bioch. Biotech.*, 57-58 233-242.
9. Kurtzman C. P., Dien B. S., (1998), *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 237-243.
10. Zakaria A., (2001), *EJB Electr. J. Biotech.*, 4, 2, 0717-3458.
11. McMillan J. D., Boynton B. L., (1994), *Appl. Bioch. Biotech.*, 45-46, 569-584.