



# Metaboliczna inżynieria drobnoustrojów do konstruowania wydajnych producentów bioetanolu z lignocelulozy

Włodzimierz Sybirny<sup>1</sup>, Czesław Puchalski<sup>1</sup>, Andrzej Sybirny<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Rzeszów

<sup>2</sup>Instytut Biologii Komórki NAN, Lwów, Ukraina

## Metabolic engineering of microorganisms for construction of efficient bioethanol producers from lignocellulose

### Summary

In the review, the current state of the art, problems and perspectives in the development of the economically feasible production of fuel ethanol from a plant biomass (lignocellulose) are presented. The metabolic engineering of microorganisms directed to design the strains with the improved ability to alcoholic fermentation (expansion of a spectrum of fermenting substrates, increase in the fermentation rate and the yield of ethanol, tolerance to ethanol and the inhibitors present in lignocellulose hydrolyzates, thermotolerance, ability to simultaneous enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicelluloses together with alcoholic fermentations of hexoses and pentoses) are considered. The information about the new pilot plants on fuel ethanol production from lignocellulose, which were recently started up in Canada and Sweden is presented. Justification of carrying out the corresponding studies in Poland is discussed.

### Key words:

ethanol, biofuel, alcohol fermentation, lignocellulose, metabolic engineering.

### Adres do korespondencji

Włodzimierz Sybirny,  
Wydział  
Biologiczno-Rolniczy,  
Uniwersytet Rzeszowski,  
ul. Ćwiklińskiej 2a,  
35-601 Rzeszów.

---

**biotechnologia**

4 (79) 38–54 2007

## 1. Wstęp

Postępujący od kilku lat wzrost cen paliw jest skorelowany ze wzrostem cen ropy naftowej. Według prognoz, jej zapasy będą praktycznie wyczerpane około roku 2050 (1,2). Jednocześnie obserwuje się wzrastające zapotrzebowanie na energię,

zwłaszcza na paliwa płynne, wykorzystywane w silnikach spalinowych. Dlatego nie dziwi fakt, że w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie możliwościami wykorzystania odnawialnych surowców, w tym biomasy roślin jako prawie niewyczerpalnego odnawialnego źródła paliwa. Nasiona roślin oleistych mogą służyć jako surowiec do produkcji biodiesla, który w przyszłości może całkowicie zastąpić obecny olej napędowy otrzymywany z ropy naftowej. Podobnie etylina w przyszłości może być otrzymywana z biomasy (3-5).

Zasadniczym celem inżynierii metabolicznej producentów etanolu z lignocelulozy, która stanowi główny składnik strukturalny biomasy, jest konstruowanie drobnoustrojów zdolnych efektywnie fermentować chociażby główne cukry lignocelulozy: glukozę, inne heksozy i ksylozę. Z fermentacją glukozy i innych heksoz na ogół nie ma problemów. Trzeba jednak skonstruować szczepy, które mogłyby równie wydajnie fermentować ksylozę (i L-arabinozę), czyli poszerzyć zakres fermentowanych substratów. Znane są bakterie i drożdże zdolne do fermentacji glukozy i ksylozy. Są one jednak niedostatecznie odporne na etanol i wykazują niską wydajność fermentacji.

Istnieją dwa główne kierunki badań w zakresie ulepszenia obecnie znanych szczepów. Większość naukowców pracuje z tradycyjnymi producentami etanolu (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*), wprowadzając do nich geny metabolizmu ksylozy i arabinozy z innych organizmów. W ten sposób można polepszyć wydajność syntezy etanolu u tych gatunków. Inni próbują polepszyć parametry fermentacji heksoz i pentoz przez drobnoustroje, których – jak dotąd – nie wykorzystywano do przemysłowej produkcji alkoholu etylowego – bakterie *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, drożdże *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha* (patrz niżej).

Do tej pory nie została opracowana opłacalna technologia otrzymywania etanolu z lignocelulozy. W związku z tym, w wielu laboratoriach prowadzone są badania z udziałem różnych modyfikowanych genetycznie szczepów bakterii i drożdży. Pomimo że wydajność procesu jest większa u bakterii, drożdże wykazują szereg technologicznych zalet. Ich komórki są większe, dlatego łatwiej je oddzielić z hodowli i nie są one wrażliwe na fagolizę. Oprócz tego warto pamiętać, że człowiek wykorzystuje od stuleci drożdże do przemysłowej produkcji etanolu z konwencjonalnego surowca. W związku z tym istnieje doskonale opracowana technologia przemysłowa, która z pewnymi modyfikacjami może być zastosowana do produkcji etanolu z lignocelulozy z udziałem drożdży.

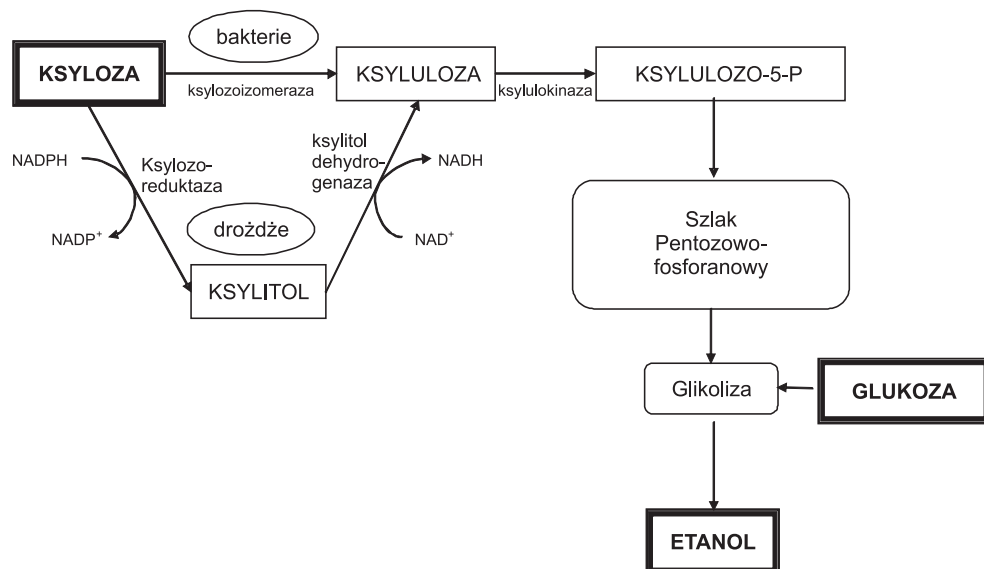
Celem naszego przeglądu jest przeanalizowanie obecnej wiedzy o szczepach mikroorganizmów zdolnych do alkoholowej fermentacji cukrów, wchodzących w skład lignocelulozy (głównie, pentoz D-ksylozy i L-arabinozy).

## 2. Inżynieria metaboliczna *S. cerevisiae*

### 2.1. Konstruowanie szczepów, które fermentują ksylozę na skutek ekspresji genów *P. stipitis*

Drożdże *S. cerevisiae* nie są zdolne do metabolizmu ksylozy, ale na podłożu z ksylozą w warunkach ograniczonego natlenienia produkują niewielkie ilości etanolu (6). Ksyluloza jest fosforylowana przez ksylulokinazę (gen *XKS1*) do postaci ksylulozo-5-fosforanu (7), który w beztlenowych reakcjach szlaku pentozowo-fosforanowego zostaje przekształcony do intermediatów glikolizy (fruktozo-6-fosforan, aldehyd 3-fosfoglicerynowy), które następnie mogą być przekształcone do etanolu (rys. 1). Naukowcy wprowadzili do genomu *S. cerevisiae* geny drożdży *P. stipitis*, które kodują enzymy przekształcające ksylozę na ksylulozę z nadzieją, że odpowiednie zrekombinowane szczepy będą efektywnie produkować etanol na podłożu z ksylozą. Rzeczywistość okazała się jednak bardziej skomplikowana.

Istnieją dwie drogi przekształcania przez drobnoustroje ksylozy na ksylulozę. Bakterie posiadają enzym ksylozoizomerazę (izomeraza ksylozy), który bezpośrednio przetwarza ksylozę w ksylulozę (8). Drożdże natomiast najpierw redukują ksylozę do ksylitolu w wyniku reakcji katalizowanej przez reduktazę ksylozy (odpowiedni gen u *P. stipitis* oznacza się *XYL1*), a w następnej reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę ksylitolu (gen *XYL2*) ksylitol przekształca się w ksylulozę. U większości drożdży metabolizujących ksylozę, reduktaza ksylozy zależy od NADPH (drugim



Rys. 1. Schemat przekształcania ksylozy i glukozy do etanolu.

produktem reakcji jest NADP), a dehydrogenaza ksylitolu zależy od NAD (produktem reakcji jest NADH). Drożdże nie posiadają enzymu transhydrogenazy, który przekształcałby NADH (produkt pierwszej reakcji) do NADPH (substrat pierwszej reakcji), co prowadzi do tak zwanego niezbilansowania kofaktorów. Dlatego u większości drożdży zdolnych do fermentacji ksylolozy do etanolu, część ksylolozy przekształca się w ksylitol, który gromadzi się w podłożu (9,10). Jedyny gatunek drożdży, *Pichia stipitis*, praktycznie nie gromadzi ksylitolu w procesie fermentacji ksylolozy, dlatego właśnie ten szczep został wykorzystany jako źródło genów *XYL1* i *XYL2* do wprowadzenia w genom *S. cerevisiae* (11). Otrzymane transformanty wzrastały i słabo fermentowały ksylolozę, a dodatkowa nadekspresja genu, kodującego ksylulokinazę istotnie zwiększała produkcję etanolu (12,13). Jednocześnie w odróżnieniu od dzikich szczepów *P. stipitis*, transformanty *S. cerevisiae* gromadziły w podłożu ksylitol i produkowały znacznie mniej etanolu. Przyczyny tego zjawiska nie są całkiem znane. Przeprowadzono kilka serii badań w celu polepszenia fermentacji ksylolozy u zrekombinowanych szczepów *S. cerevisiae*. Udowodniono, że białkowa inżynieria genu *XYL1* reduktazy ksylolozy, która prowadzi do zmniejszenia powinowactwa do NADPH polepsza parametry alkoholowej fermentacji ksylolozy (14). Inne perspektywiczne podejście dotyczyło zmniejszenia puli wewnątrzkomórkowego NADPH wskutek defektu genów kodujących dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu lub dehydrogenazę 6-fosfoglukonianu, które są jednym z głównych źródeł tego koenzymu w komórce (15). Otrzymane szczepy wykazywały zwiększoną produkcję etanolu, ale ich wzrost był niewielki. Inne próby polepszenia efektywności fermentacji ksylolozy u *S. cerevisiae* polegały na nadekspresji czterech własnych genów nieoksydatywnej części szlaku pentozofosforanowego (izomeraza pentozofosforanowa, epimeraza pentozofosforanowa, transaldolaza, transketolaza) oraz delekcji genu reduktazy aldoz (16), lub nadekspresji tylko jednego heterologicznego genu transaldolazy z *P. stipitis* (17). Ciekawym rozwiązaniem okazał się sposób polepszenia parametrów fermentacji ksylolozy w wyniku wprowadzenia do drożdży piekarskich genów bakterii, które kodują fosfoketolazę (*Bifidobacterium lactis*) i fosfotransacetylazę (*Bacillus subtilis*) razem z genem pierwotniaka *Entamoeba histolytica* kodującego dehydrogenazę aldehydu octowego (18). Odpowiednie zrekombinowane szczepy okazały się zdolne do rozszczepienia ksylulozo-5-fosforanu do aldehydu 3-fosfoglicerynowego (bezpośredni prekursor etanolu) i acetylofosforanu, który pod wpływem heterologicznych fosfotransacetylazy i dehydrogenazy aldehydu octowego także przekształcał się w etanol. Interesujące, że transformanty *S. cerevisiae*, które otrzymały geny *P. stipitis* metabolizmu ksylolozy, mogły rosnąć tylko w warunkach tlenowych. Na drodze tzw. „inżynierii ewolucyjnej” za pomocą długotrwałej hodowli ciągłej wyjściowego zrekombinowanego szczepu w chemostacie na podłożu z ksylolozą w warunkach ograniczonego natleniania otrzymano szczep *S. cerevisiae* zdolny do wzrostu i fermentacji ksylolozy w warunkach beztlenowych (19). Jednak najlepsze zrekombinowane szczepy *S. cerevisiae* nie przewyższają albo mają gorsze wyniki fermentacji alkoholowej ksylolozy w porównaniu do dzikiego szczepu *P. stipitis* (10).

## 2.2. Ekspresja ksylozoizomerazy u *S. cerevisiae*

Inne podejście do konstruowania wydajnego producenta etanolu z ksylozy u *S. cerevisiae* polega na ekspresji genów bakteryjnej izomerazy ksylozy – enzymu, który nie potrzebuje koenzymów. W przypadku efektywnej ekspresji izomerazy ksylozy w komórkach drożdży problem niezbilansowania koenzymów nie powinien występować w ogóle, a zatem wydajność fermentacji alkoholowej mogłaby wzrastać. Jednak większość prób ekspresji genu izomerazy ksylozy z wielu prokariotycznych organizmów okazała się nieskuteczna. Zazwyczaj drożdżowe transformanty syntetyzowały odpowiednie białko, które było nieaktywne (8). Drożdże produkowały aktywny enzym i były zdolne do nieznacznej utylizacji ksylozy, przy maksymalnej aktywności ksylozoizomerazy w temperaturze 85°C, tylko w przypadku transformacji *S. cerevisiae* genem izomerazy ksylozy z termofilnej bakterii *Thermus thermophilus*. Natomiast w temperaturze optymalnej do wzrostu drożdży (30°C), nie stwierdzono aktywności enzymu (20). Niski poziom metabolizmu ksylozy u transformantów zależny był także od obecności u *S. cerevisiae* reduktazy aldoz, która redukuje ksylozę do ksylitolu, inhibitora izomerazy ksylozy. Otrzymano transformanty z delecją genu reduktazy aldoz (21) i przeprowadzono mutagenezę genu izomerazy ksylozy. Wykryto w ten sposób formy enzymów, które wykazywały bardzo niską aktywność enzymu w temperaturze 30°C (22). Otrzymane w wyniku tych manipulacji szczepy wykazywały lepszą fermentację ksylozy (8).

Inne podejście do ekspresji genów izomerazy ksylozy w komórkach *S. cerevisiae* bazuje na spostrzeżeniu, że grzyb beztlenowiec *Piromyces* sp. E2, podobnie do bakterii metabolizuje ksylozę poprzez izomerazę ksylozy, (23). Kuper i in. (24) wykazali, że gen izomerazy ksylozy z *Piromyces* sp. E2 ulega efektywnej ekspresji w komórkach drożdży, co pozwoliło transformantom słabo rosnąć na podłożu z ksylozą. Następnie z takich transformantów otrzymano szczepy, które zdecydowanie lepiej wzrastają na ksylozie i fermentują ją w tlenowych, a potem – w beztlenowych warunkach (25). Jednak szybkość utylizacji i fermentacji ksylozy była niska. Nadekspresja ksylulokinazy i czterech enzymów szlaku pentozofosforanowego (izomerazy pentozofosforanowej, epimerazy pentozofosforanowej, transaldolazy, transketolazy) istotnie polepszała wzrost i efektywność alkoholowej fermentacji ksylozy w warunkach beztlenowych (26). W hodowlach ciągłych w chemostacie przy zastosowaniu ciśnienia selekcyjnego (tzw. „inżynieria ewolucyjna”) otrzymano szczep, dla którego glukoza w mniejszym stopniu hamuje fermentację ksylozy (27). Otrzymane szczepy *S. cerevisiae* są przykładem pomyślnego wykorzystania różnych metod inżynierii metabolicznej przy konstruowaniu efektywnych szczepów przeznaczonych do wykorzystania w warunkach przemysłowych. Inny sposób udoskonalenia tych szczepów może polegać na ekspresji w komórkach *S. cerevisiae* bardziej efektywnych heterologicznych transporterów ksylozy, których aktywność nie jest hamowana przez glukozę.

### 2.3. Konstruowanie szczepów zdolnych do fermentacji L-arabinozy

Szczepy drobnoustrojów zdolne do alkoholowej fermentacji arabinozy nie zostały odnalezione w przyrodzie. Znane są natomiast bakterie, drożdże i grzyby, które mogą wykorzystywać tę pentozę jako jedyne źródło węgla i energii. Drogi metabolizmu arabinozy przez grzyby i bakterie są odmienne. Drożdże poddawano transformacji genami grzybów lub bakterii, które kodują enzymy katabolizmu arabinozy, w celu konstruowania zrekombinowanych szczepów *S. cerevisiae* zdolnych do fermentacji arabinozy. Wprowadzenie do drożdży dwóch genów grzybów kodujących L-dehydrogenazę arabinolu i reduktazę L-ksylulozy oraz genów reduktazy ksylozy i dehydrogenazy ksylitolu *P. stipitis* łącznie z nadekspresją własnego genu ksylulokinazy pozwoliło skonstruować szczepy *S. cerevisiae*, które są zdolne do wzrostu, lecz wykazują słabą fermentację L-arabinozy (28). Trzy geny *araBAD* operonu arabinozy z *Escherichia coli* zostały wprowadzone do genomu *S. cerevisiae*. Otrzymane w ten sposób transformanty wykazywały aktywności wszystkich trzech enzymów metabolizmu arabinozy, ale nie były zdolne do wzrostu na arabinozie (29). Pomyślniejsze, jak się okazało, były eksperymenty przeprowadzone przez grupę badaczy, którzy wprowadzili do genomu drożdży gen *ribA* *Bacillus subtilis*, geny *ribB*, *ribC* *E. coli* oraz wywołali nadekspresję własnego genu drożdży *GAL2* kodującego galaktozopermeazę, która przenosi do komórki także L-arabinozę. Otrzymany transformant był zdolny do słabego wzrostu na podłożu z arabinozą, jednak w wyniku „inżynierii ewolucyjnej” otrzymano szczep z lepszym wzrostem na tym cukrze. Wykazano, że nastąpiła zmiana struktury bakteryjnej L-rybulokinazy i derepresja drożdżowej transaldolazy (30).

Taki szczep był zdolny do fermentacji L-arabinozy znacznie efektywniej w porównaniu ze szczepem, do którego wprowadzono geny metabolizmu tego cukru z grzyba.

### 3. Inżynieria metaboliczna *Z. mobilis*

*Z. mobilis* wykorzystuje do przekształcenia glukozy na etanol szlak Entnera-Doudoroffa, który jest mniej korzystny energetycznie w porównaniu z glikolizą. Bakteria ta wykazuje znacznie wyższą w porównaniu do drożdży szybkość i wydajność procesu fermentacji glukozy (wydajność wynosi 97%) (31). Jednak organizm ten nie jest zdolny do metabolizmu pentoz. Dlatego do jego genomu zostały wprowadzone cztery geny *E. coli*, organizmu rosnącego na ksylozie: *xylA*, *xylB*, *talB*, *tktA*, które kodują odpowiednio izomerazę ksylozy, ksylulokinazę, transaldolazę i transketolazę. Otrzymany transformant wykazywał wzrost na ksylozie i aktywnie fermentował ten cukier zarówno w roztworach modelowych, jak i na podłożach zawierających hydrolizaty lignocelulozy (32). W celu skonstruowania szczepu *Z. mobilis* zdolnego do fermentacji L-arabinozy wprowadzono do niego pięć genów *E. coli*, *araA*, *araB*, *araD*,

*talB*, *tktA*, które kodują odpowiednio: izomerazę, kinazę, epimerazę, transaldolazę i transketolazę (33). Otrzymany szczep wykazał zdolność do wzrostu i fermentacji arabinozy do etanolu. Na bazie tych danych został skonstruowany szczep *Z. mobilis* zawierający siedem genów *E. coli* niezbędnych do metabolizmu ksylozy i arabinozy. Taki szczep efektywnie fermentował obydwie cukry – na podłożu z mieszaniną ksylozy i arabinozy wydajność produkcji etanolu wynosiła 82-84% (34). Jednak podczas fermentacji hydrolizatów lignocelulozy, zrekombinowany szczep fermentujący ksylozę i arabinozę okazał się bardziej wrażliwy na toksyczne produkty hydrolizatów w porównaniu do szczepów typu dzikiego (35).

#### 4. Inżynieria metaboliczna *E. coli* dla konstruowania etanologennych szczepów

Pałeczka okrężnicy – najlepiej zbadany organizm prokariotyczny, w ciągu ostatnich dekad stała się ważnym przemysłowym producentem heterologicznych białek i niektórych aminokwasów (36). Ten drobnoustrój jest zdolny do metabolizmu głównych cukrów wchodzących w skład hydrolizatów lignocelulozy oraz do tzw. heterofermentacji, której produktami są równe ilości etanolu, kwasów mlekowego, octowego i mrówkowego. Organizm ten charakteryzuje się niewielkimi wymaganiami pokarmowymi oraz jest stosunkowo odporny na etanol (toleruje 5% stężenie). Optymalne warunki fermentacji dla *E. coli* to: 35°C i pH 7,0 (4,5). Zadanie inżynierii metabolicznej dotyczy utworzenia tak zwanego etanologennego szczepu *E. coli*, który mógłby fermentować heksozy i pentozy lignocelulozy całkowicie do etanolu. Konstruowanie etanologennych szczepów *E. coli* było pierwszym przykładem pomyślnego zastosowania inżynierii metabolicznej i zostało przeprowadzane w kilku etapach. Zasadnicze etapy pracy polegały na klonowaniu genów *pdC* i *adhB* należące do *Z. mobilis*, które kodują dekarboksylazę pirogronianu i dehydrogenazę alkoholową pod wspólnym *PET* promotorem (tzw. *PET* operon), a następnie ich wprowadzeniu do chromosomu *E. coli* (37). W dalszej kolejności prowadzono selekcje transformantów *E. coli* metodami klasycznymi i delecję genu reduktazy fumaranu w celu wyeliminowania zdolności do utworzenia bursztynianu jako ubocznego produktu fermentacji. W wyniku tych doświadczeń otrzymano szczep KO11 o wysokiej aktywności dekarboksylazy pirogronianu i dehydrogenazy alkoholowej, który wytwarzał etanol jako jedyny produkt fermentacji heksoz i pentoz (38). Szczep ten posiadał zdolność do efektywnej fermentacji heksoz i pentoz w mieszaninie w hydrolizatach lignocelulozy (39) i uważany jest za jeden z najbardziej efektywnych szczepów zdolnych do fermentacji lignocelulozy (4,32). Otrzymano także mutanty szczepu KO11 ze zwiększoną odpornością na stężenie etanolu (40).

Podobne eksperymenty były przeprowadzane w celu pozyskania etanologennych szczepów z innej bakterii jelitowej *Klebsiella oxytoca*. Ten organizm, w odróżnieniu od *E. coli*, posiada zdolność do metabolizmu celobiozy, ksylobiozy i innych produk-

tów niepełnej hydrolizy polimerów lignocelulozy. Wprowadzenie do komórki tej bakterii *PET* operonu prowadziło do wytwarzania etanolu jako głównego produktu fermentacji lignocelulozy (41). Dodanie do komórki genu endoglukanazy z *Clostridium thermoaceticum* oraz genów wzmocnienia sekrecji białek z *Erwinia chrysantemi* prowadziło do syntezy i sekrecji enzymu zdolnego do hydrolizy celulozy (42).

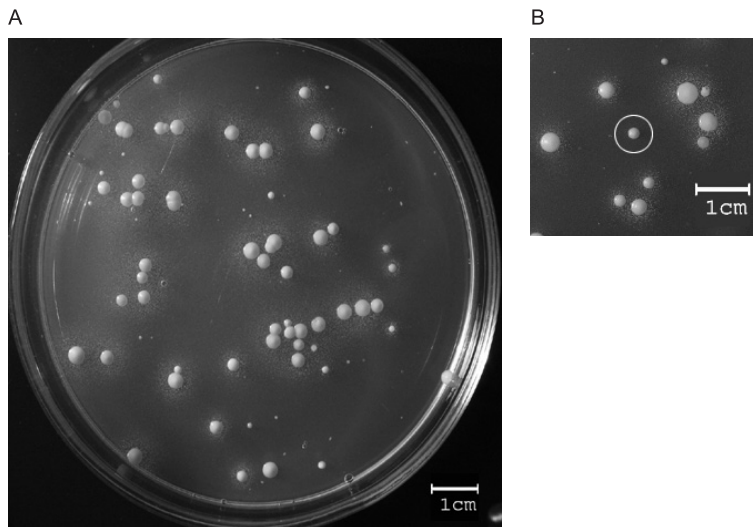
## 5. Inżynieria metaboliczna *P. stipitis*

*P. stipitis* w porównaniu do pozostałych szczepów drożdży najbardziej wydajnie fermentuje ksylozę do etanolu i praktycznie nie gromadzi ksylitolu (10,43). Wspomniano już, że dzikie szczepy *P. stipitis* nie ustępują pod względem efektywności fermentacji ksylozy najlepszym zrekombinowanym szczepom *S. cerevisiae*. W odróżnieniu od *S. cerevisiae*, *P. stipitis* nie posiada zdolności do wzrostu i fermentacji w całkowicie beztlenowych warunkach, a w warunkach tlenowych gatunek ten utlenia ksylozę do CO<sub>2</sub>. Dlatego dla osiągnięcia maksymalnej produkcji etanolu fermentację prowadzi się w warunkach ograniczonego napowietrzania. Ustalono, że delecja genu *CYC1*, który koduje cytochrom *c* prowadzi do osłabiania wzrostu szczepu na ksylozie, natomiast ilość wyprodukowanego etanolu nie ulega zmianie, tym samym wzrasta wydajność procesu fermentacji (44). *P. stipitis* zawiera alternatywną oksydazę, która jest wrażliwa na kwas salicylohydroksamowy i nie bierze udziału w fosforylacji oksydacyjnej. Udowodniono, że delecja genu alternatywnej oksydazy *STO1* prowadzi do zwiększenia produkcji etanolu i nie wpływa na wzrost organizmu (45).

Od niedawna badaniem fermentacji alkoholowej ksylozy u *P. stipitis* zajmują się pracownicy Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Rzeszowskiego. Została opracowana nowa auksanograficzna metoda oznaczania etanolu bezpośrednio na szalkach Petriego, co posłużyło do opracowania metody selekcji szczepów *P. stipitis* syntetyzujących zmniejszone lub zwiększone ilości etanolu na podłożu z ksylozą (46). Metoda polega na tym, że drożdże *P. stipitis* rosną na ksylozie jako jedynym źródle węgla i produkują etanol. Drożdże piekarskie *S. cerevisiae* nie są zdolne do utylizacji ksylozy, natomiast dobrze rosną na etanolu jako jedynym źródle węgla w warunkach napowietrzania. Kolonie drożdży *P. stipitis*, które fermentują ksylozę podczas wzrostu w mieszaninie z drożdżami piekarskimi na powierzchni podłoża zawierającego ksylozę, zabezpieczają wzrost drożdży piekarskich w postaci „strefy wzrostu” dookoła kolonii produkujących etanol. Im więcej etanolu wyprodukowano przez kolonie *P. stipitis*, tym większy był rozmiar strefy wzrostu *S. cerevisiae* wokół tej kolonii. Odwrotnie, brak wzrostu *S. cerevisiae* wokół kolonii mutantów *P. stipitis* świadczył o niezdolności odpowiednich kolonii do fermentacji ksylozy (rys. 2).

Na podstawie tej metody wyizolowano szczepy *P. stipitis* ze zmienioną zdolnością do produkcji etanolu. Kinetyka wzrostu biomasy i syntezy etanolu przez te szczepy na podłożu z ksylozą dokładnie pokazuje istotny wzrost (szczepy serii Z)



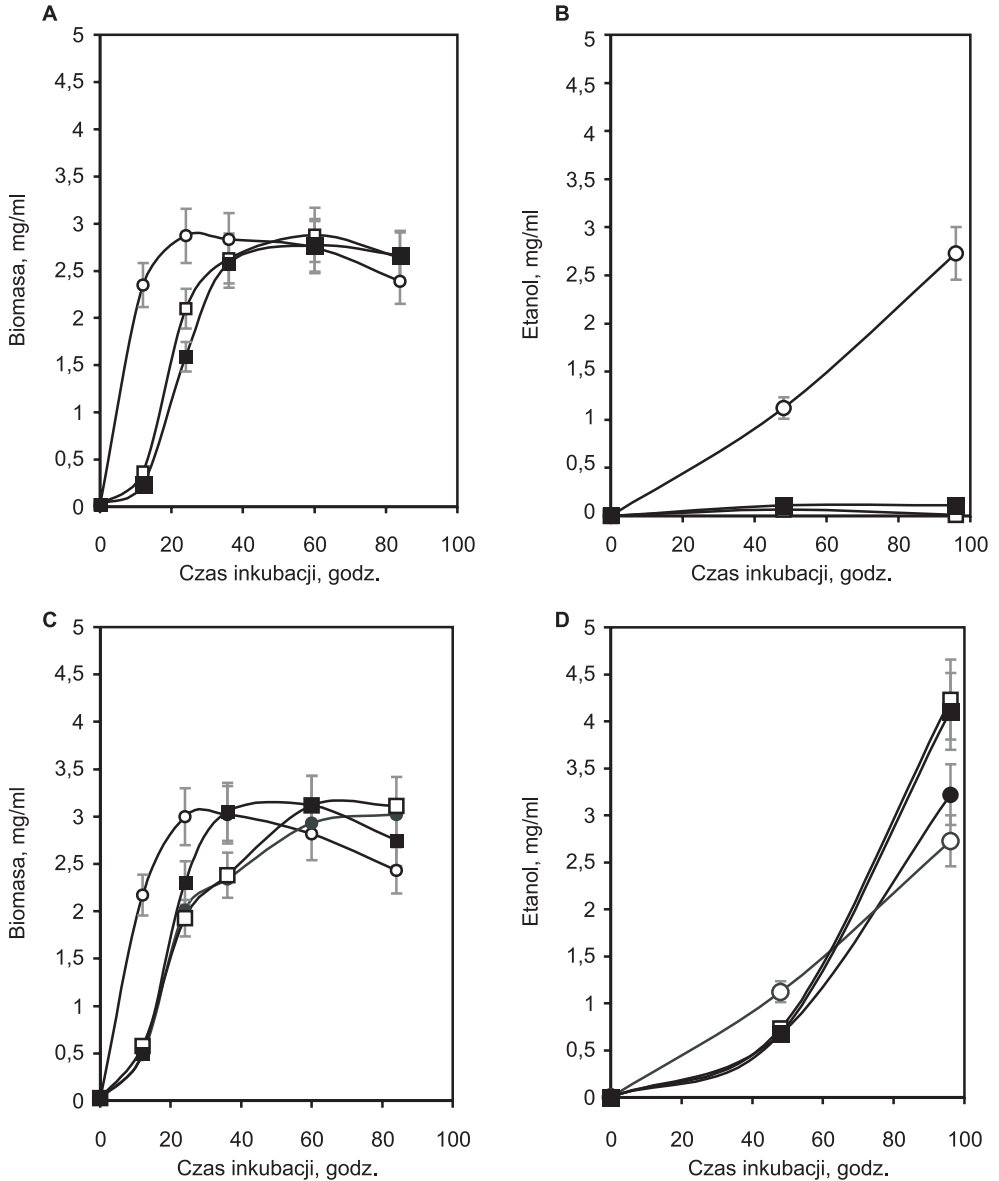


Rys. 2. Metoda analizy etanolu na szalkach Petriego. Strefy wzrostu (aureole) dookoła kolonii *P. stipitis* podczas hodowli na zestalonym podłożu z ksylozą w mieszaninie z komórkami drożdży piekarskich. A. Fotografia płytki Petriego zawierające zestalone podłoże z ksylozą (2%) w mieszaninie z komórkami drożdży piekarskich ( $10^6$  komórek/ml). Komórki *P. stipitis* były mutagenizowane przez UV, potem zaszczipione na podłoże z ksylozą po jego zestaleniu. Są widoczne aureole dookoła kolonii *P. stipitis*. B. Część płytki zawierająca kolonie *P. stipitis* (określona), która nie produkuje żadnych stref wzrostu (aureoli).

albo spadek (szcypy serii BZ) produkcji etanolu w porównaniu do szczepu dzikiego (rys. 3). Opracowana metoda pozwala efektywnie izolować mutanty produkujące różne ilości etanolu z ksylozy w porównaniu do szczepu typu dzikiego. Na podłożu z glukozą mutanty nie różniły się od szczepu typu dzikiego w zakresie kinetyki wzrostu, przy czym produkowały trzykrotnie mniej etanolu (rys. 4).

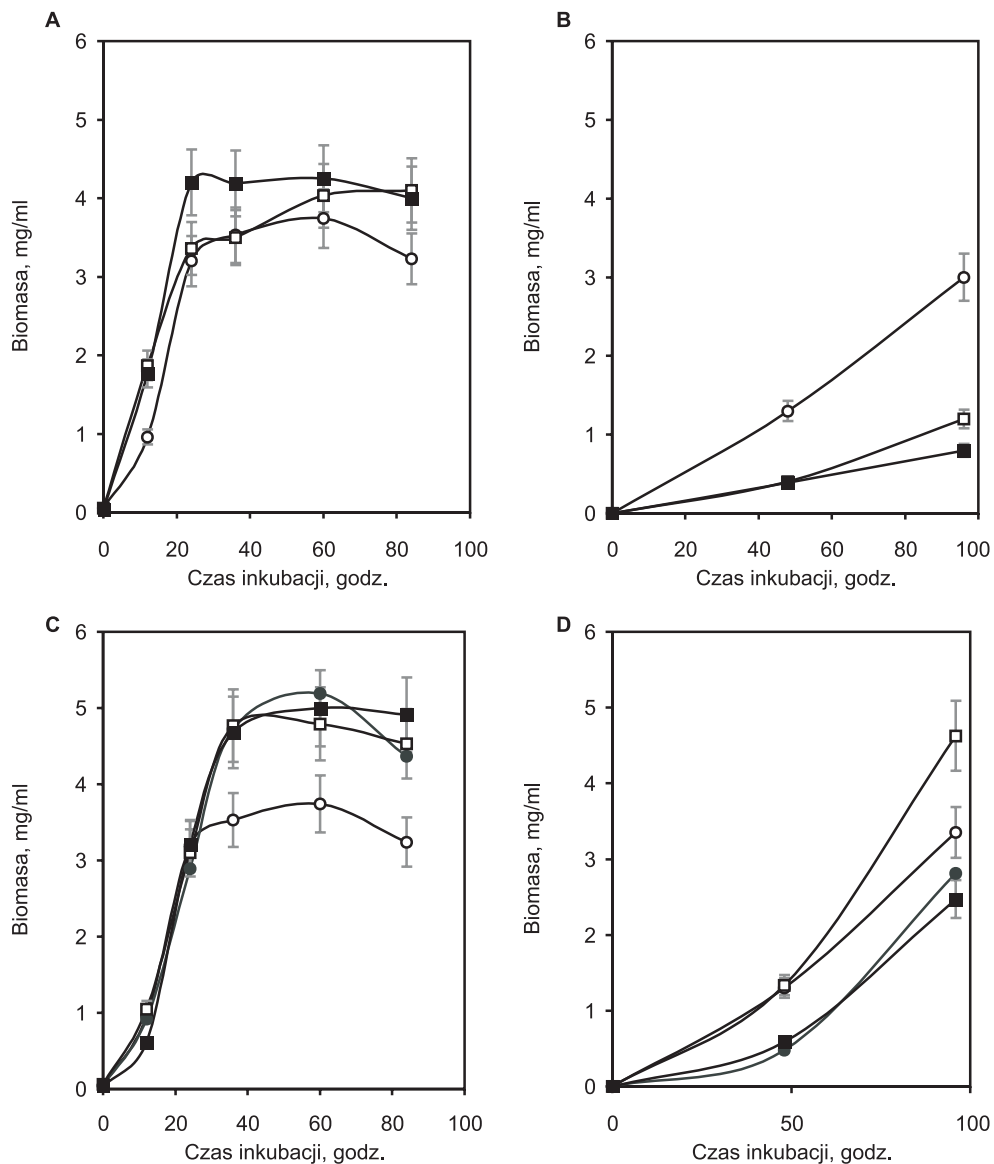
Wiadomo, że produkcja etanolu przez *P. stipitis* na podłożu z ksylozą zwiększa się w warunkach słabego napowietrzania. Jednak przyczyny takiego zjawiska nie są znane. Okazało się, że ograniczenie natleniania prowadzi do poważnego zwiększenia aktywności podstawowego enzymu fermentacji alkoholowej – dekarboksylazy pirogronianowej u drożdży *P. stipitis* w hodowlach z glukozą lub ksylozą (rys. 5). Na podstawie tych danych udowadnia się istotną rolę tlenu w regulacji syntezy enzymów glikolizy u *P. stipitis*. Jednak mechanizm tej regulacji nie jest znany. W celu identyfikacji regulatorowych genów, które uczestniczą w kontroli fermentacji alkoholowej opracowuje się metodę mutagenyzy insercyjnej u *P. stipitis* z wykorzystaniem wspomnianej metody analizy etanolu na szalkach Petriego (46). Schemat selekcji pokazano na rysunku 6.

Drożdże *P. stipitis* posiadają ogromny potencjał biotechnologiczny, dla których zastosowano metody genetyki klasycznej (47) i molekularnej (9). Obecnie zakończono pełne sekwencjonowanie genomu tego organizmu. Sklonowano wiele genów



Rys. 3. Wzrost biomasy (A, C) i produkcja etanolu (B, D) w podłożu z ksylozą (2%) szczepów *P. stipitis* dzikiego typu oraz mutantów gromadzących zmniejszone (A, B) lub zwiększone (C, D) ilości etanolu.

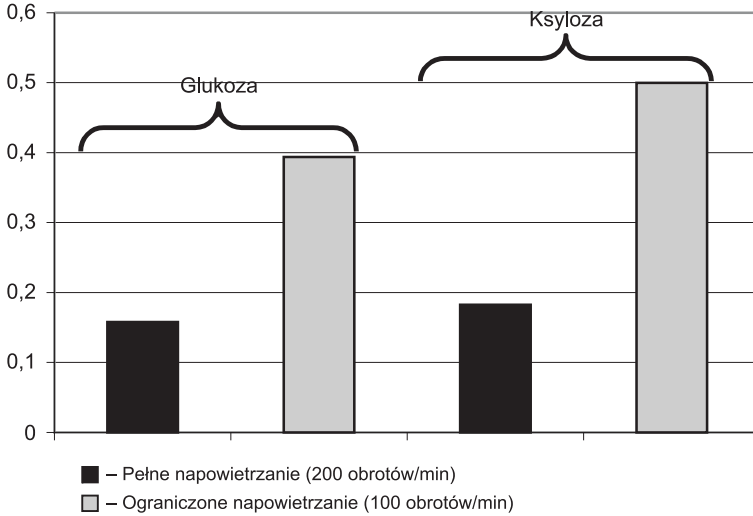
○ – szczep dziki, □ – szczepy BZ6 (A, B) i Z36 (C, D),  
 ● – szczep Z15 (C, D), ■ – szczepy BZ7 (A, B) i Z39 (C, D).



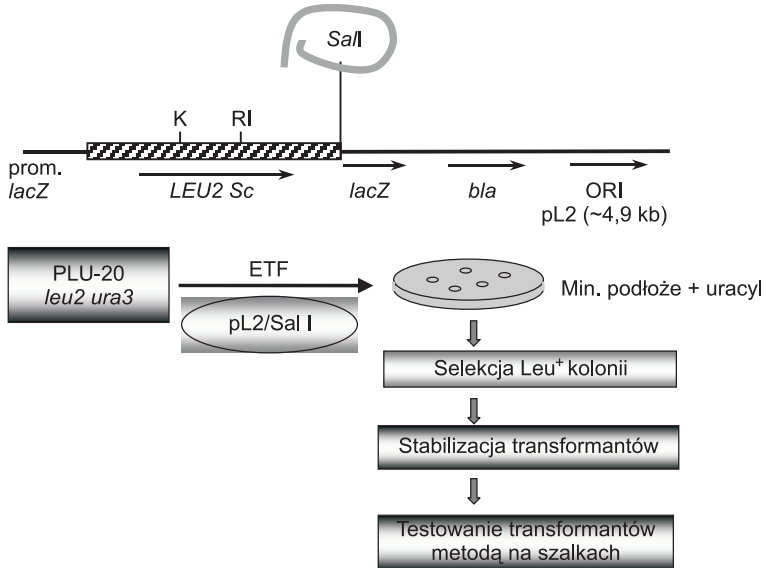
Rys. 4. Wzrost biomasy (A, C) i produkcja etanolu (B, D) w podłożu z glukozą (2%) szczepów *P. stipitis* dzikiego typu oraz mutantów gromadzących zmniejszone (A, B) lub zwiększone (C, D) ilości etanolu w podłożu z ksylozą.

○ – szczep dziki,  
● – szczep Z15 (C, D),

□ – szczepy BZ6 (A, B) i Z36 (C, D),  
■ – szczepy BZ7 (A, B) i Z39 (C, D).



Rys. 5. Aktywność dekarboksylazy pirogronianu (PDC) w komórkach dzikiego szczepu *P. stipitis* CBS6054 na podłożu z glukozą lub ksylozą w zależności od napowietrzania. Jednostki aktywności: U/mg białka (U, jednostki:  $\mu\text{moli} \times \text{mg białka}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ).



Rys. 6. Metoda mutagenazy insercyjnej komórek *Pichia stipitis*, PLU-20 – szczep wyjściowy, ETF – elektrotransformacja, pL2 – wektor inercyjny, Sal I – endononukleaza restrykcyjna.

tego gatunku oraz zbadano charakterystyki regulacji ekspresji niektórych z nich (10,43). Udowodniono, że ekspresja genu *ADH2*, który uczestniczy w tworzeniu etanolu aktywuje się w warunkach hipoksji (48). Jednak nadal mamy zbyt małą wiedzę o mechanizmach regulacji fermentacji ksylozy przez ten organizm i wciąż nie zidentyfikowano odpowiednich genów regulatorowych.

Wyizolowano także szereg innych gatunków drożdży zdolnych do alkoholowej fermentacji ksylozy, zwłaszcza *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Candida tenuis*, *Pichia segobiensis*, *Brettanomyces naardensis*. Należy podkreślić, że dla *P. tannophilus* opracowano już metody genetycznej transformacji i sklonowano kilka genów (43). Drożdże te charakteryzują się właściwościami podobnymi do *P. stipitis*, które są modelowym obiektem dla wszystkich pokrewnych drożdży fermentujących ksylozę. Wiadomo, że niektóre gatunki z rodzaju *Brettanomyces* wykazują niezwykle wysoką odporność na etanol, która może przewyższać odporność *S. cerevisiae*. Dlatego istotne jest opracowanie genetycznych metod analizy drożdży rodzaju *Brettanomyces* oraz identyfikacja genów odpowiedzialnych za wysoką odporność komórek właśnie tego gatunku na etanol.

## 6. Inżynieria metaboliczna termotolerancyjnych drożdży *Hansenula polymorpha*

Termotolerancyjne drożdże *H. polymorpha* są obiektem prowadzonych badań dotyczących molekularnych mechanizmów biogenezy i degradacji peroksyosomów (49-52), represji katabolicznej (53,54), mechanizmu odpowiedzi komórki eukariotycznej na czynniki stresu metabolicznego (55,56). Są one jednym z najbardziej popularnych obiektów do produkcji heterologicznych białek o znaczeniu medycznym (57-59). Do tych drożdży zastosowano dobrze znane metody genetyki klasycznej i molekularnej (60), znana jest całkowita sekwencja genomu (61). Drożdże te posiadają bardzo mocne, regulatorowe i konstytutywne promotory (57,58). Maksymalna temperatura wzrostu tego gatunku wynosi 50°C, i jest ona zaledwie o 10°C niższa w porównaniu do znanych eukariotycznych organizmów (62,63). Wiadomo od dawna, że drożdże te są zdolne do fermentacji glukozy do etanolu, jednak fermentacja ksylozy nie została zbadana. W przeprowadzonych przez nas badaniach udowodniono, że *H. polymorpha* jest zdolna do fermentacji glukozy, ksylozy, mannozy, maltozy i celobiozy do etanolu, natomiast galaktoza i L-arabinoza prawie wcale nie podtrzymują wzrostu tego gatunku drożdży (64). Optymalna temperatura fermentacji glukozy i ksylozy wynosi 37-40°C, możliwa jest również przy 45-48°C (65). Fermentacja przebiegała najbardziej aktywnie w warunkach umiarkowanego napowietrzania lub niedostatecznej ilości flawin, co prowadzi do defektów w oddychaniu komórkowym. *H. polymorpha* okazał się gatunkiem bardziej odpornym na toksyczne działanie etanolu w porównaniu do *P. stipitis*, i mniej odpornym w porównaniu do *S. cerevisiae* (64). Z wykorzystaniem wspomnianej auksanograficznej metody selekcji

wyizolowano mutanty *H. polymorpha* zdolne do zwiększonej produkcji etanolu na podłożu z ksylozą (46).

*H. polymorpha* wykorzystuje ten sam szlak metabolizmu ksylozy co inne drożdże fermentujące ksylozę, przy czym zawiera zależną od NAD(P)H reduktazę ksylozy oraz zależną od NAD dehydrogenazę ksylitolu (66). Zbadano zdolność *H. polymorpha* do ekspresji bakteryjnej izomerazy ksylozy w odróżnieniu od *S. cerevisiae*. W tym celu geny *XYL1* i *XYL2-A*, które kodują reduktazę ksylozy oraz jeden z izozymów dehydrogenazy ksylitolu zostały wyeliminowane w wyniku delekcji, a uzyskane w ten sposób szczepy utraciły zdolność do wzrostu na ksylozie. Transformacja tych delecyjnych szczepów bakteryjnymi genami *xylA*, które kodują izomerazy ksylozy u *E. coli* i *Streptomyces coelicolor* przywracała zdolność transformantów do wzrostu i fermentacji ksylozy. Transformanty wykazywały wysoką aktywność izomerazy ksylozy, która sięgała 25% aktywności tego enzymu dla wyjściowych szczepów bakteryjnych (65,66). To pierwsze doniesienie o pomyślnej ekspresji bakteryjnej izomerazy ksylozy w komórkach drożdży. Można się spodziewać, że następne badania w dziedzinie inżynierii metabolicznej alkoholowej fermentacji ksylozy u *H. polymorpha* (amplifikacja limitujących genów glikolizy oraz pentozofosforanowego szlaku, genów, które odpowiadają za odporność na podwyższoną temperaturę i etanol, delekcja jeszcze jednego genu dehydrogenazy ksylitolu) pozwoli skonstruować szczepy, które będą przewyższały zdolnością do fermentacji ksylozy wszystkie dotąd poznane organizmy. Maksymalna temperatura fermentacji u *H. polymorpha* (48-50°C) powinna po raz pierwszy umożliwić łatwe przeprowadzenie procesu SSF (ang. *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, to znaczy jednoczesnego scukrzania i fermentacji glukozy i ksylozy), ponieważ jest to temperatura zbliżona do optymalnej dla działania celulaz i hemicelulaz. Wadą *H. polymorpha* jest niezdolność do fermentacji galaktozy i L-arabinozy. Dlatego dalsze badania powinny polegać na wprowadzeniu do tego organizmu genów z innych organizmów, które umożliwią aktywną fermentację wszystkich głównych cukrów lignocelulozy. Dotąd całkowicie nie jest znana odporność *H. polymorpha* na toksyczne produkty (aldehydy, fenole, kwasy: octowy i mrówkowy), które gromadzą się w hydrolizatach lignocelulozy po hydrolizie kwasem siarkowym. Jednak w warunkach enzymatycznej hydrolizy ilość takich produktów może być niewielka. Jeszcze jednym ważnym kierunkiem przyszłych badań powinna być ekspresja genów, które kodują celulazy, amylazy i hemicelulazy u *H. polymorpha*, w celu konstruowania szczepów zdolnych do alkoholowej fermentacji lignocelulozy bezpośrednio po jej wstępnej obróbce. Sprzyja temu fakt, że organizm ten jest zdolny do produkcji sporych ilości obcych białek.

## 7. Przemysłowa produkcja paliwowego etanolu z lignocelulozy

W ciągu ostatnich lat rozpoczęto eksploatację co najmniej dwóch fabryk pilotażowych do produkcji paliwowego etanolu z odpadów roślinnych. Taki etanol może

być wykorzystany jak jedyne paliwo lub dodatek do paliwa (benzyny) w silnikach samochodowych. W grudniu 2004 r. rozpoczęto przemysłową produkcję eksperymentalną w fabryce w Ottawie (Kanada), która jest wspólnym przedsięwzięciem firm Iogen (znany producent celulolitycznych enzymów), Petro-Canada i Royal Dutch Shell z roczną produkcją 100 mln l etanolu (5). Surowcem do otrzymywania etanolu jest słoma kukurydzy i pszenicy oraz gałęzie drzew. Kanadyjska firma w procesach fermentacyjnych wykorzystuje szczepy *S. cerevisiae* skonstruowane przez grupę N. Ho (Purdue University, West Lafayette, USA) oraz *P. stipitis*, który zostanie testowany jak organizm fermentujący. W 2005 r. została uruchomiona fabryka do produkcji paliwowego etanolu w Omskoldsvik (Szwecja) z trocin jako surowca (5). Ukazała się również informacja o planach uruchomienia fabryki przeróbki odpadów lignocelulozowych z trzciny cukrowej w Brazylii. Istniejące fabryki obecnie nie są rentowne, ale ich działalność pozwoli na opracowanie nowej technologii przemysłowej produkcji etanolu paliwowego z lignocelulozy, oraz pozwoli określić czynniki warunkujące opłacalność produkcji.

## 8. Badania w dziedzinie otrzymania etanolu z roślinnej biomasy w kraju

Istnieje pilna potrzeba wykorzystywania alternatywnych źródeł energii, a zwłaszcza płynnego paliwa. W kraju produkuje się znaczne ilości etanolu i występują rezerwy zwiększenia tej produkcji, która może być wykorzystywana jako dodatek do benzyny. Jednak istniejąca baza surowcowa (cukier, skrobia) nie pozwala znacząco zwiększyć produkcję paliwowego etanolu. Dlatego opracowanie technologii otrzymania etanolu z lignocelulozy (odpady roślinne) ma ogromne znaczenie ekonomiczne. Wymaga to jednak kompleksowych badań w dziedzinie mikrobiologii, inżynierii metabolicznej, biochemicznej i technologii chemicznej.

Obecnie badania w dziedzinie otrzymania paliwowego etanolu z lignocelulozy, zwłaszcza inżynierii metabolicznej drożdży *P. stipitis* oraz termotolerancyjnych drożdży *H. polymorpha* prowadzone są w kilku ośrodkach naukowych w kraju (46,65-69). Zostały skonstruowane unikatowe szczepy, które mają perspektywę zastosowania w celu otrzymania paliwowego etanolu w najbardziej nowoczesnym procesie jednoczesnego scukrzania i fermentacji (proces SSF).

Interesy kraju wymagają jak najszybszego dofinansowania prac badawczych, prowadzonych przez zespoły złożone z wielu specjalistów (biochemików, mikrobiologów, inżynierów i ekonomistów), które doprowadzą do opracowania przemysłowej technologii produkcji etanolu z lignocelulozy.

### Literatura

1. Campbell C. J., Laherrere J. H., (1998), Scientific American, 3, 78-83.
2. Monique H., Faaij A., van den Broek R., Berndes G., Gielen D., Turkenburg W., (2003), Biomass Bioenergy, 25, 119-133.
3. Jeffries T. W., (2005), Nature, 23, 40-41.

4. Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 17-34.
5. Lin Y., Tanaka S., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Dec. 6, 1-16.
6. Maleszka R., Schneider H., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, 228, 22-30.
7. Deng X. X., Ho N. W., (1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 193-199.
8. Hahn-Hagerdal B., Wahlbom C. F., Gardonyi M., van Zyl W. H., Cordero Otero R. R., Jonsson L. J., (2001), *Adv. Biochem. Eng.*, 73, 53-84.
9. Jeffries T. W., Shi N. Q., (1999), *Adv. Biochem. Eng.*, 65, 117-161.
10. Jeffries T. W., Jin Y.-S., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 495-509.
11. Kötter P., Ciriacy M., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 776-783.
12. Ho N. W., Chen Z., Brainard A. P., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1852-1859.
13. Jin Y.-S., Ni H., Laplaza J. M., Jeffries T. W., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 495-503.
14. Jeppsson M., Bengtsson O., Franke K., Lee H., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M. F., (2006), *Biotechnol. Bioeng.* (in press).
15. Jeppsson M., Johansson B., Ruhdal-Jensen P., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M. F., (2003), *Yeast*, 20, 1263-1272.
16. Karhumaa K., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M. F., (2005), *Yeast*, 22, 359-368.
17. Jin Y.-S., Alper H., Yang Y.-T., Stephanopoulos G., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8249-8256.
18. Sonderegger M., Schumperli M., Sauer U., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2892-2897.
19. Sonderegger M., Sauer U., (2003), *Environ. Microbiol.*, 69, 1990-1998.
20. Walfridsson M., Bao X., Anderlund M., Lilius G., Bulow L., Hahn-Hagerdal B., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4648-4651.
21. Träff K. L., Otero Cordero R. R., van Zyl W. H., Hahn-Hagerdal B., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5668-5674.
22. Lönn A., Gardonyi M., van Zyl W. H., Hahn-Hagerdal B., Otero R. C., (2002), *Eur. J. Biochem.*, 269, 157-163.
23. Harhangi H. R., Akhmanova A. S., Emmens R., van der Drift C., de Laat W. T., van Dijken J. P., Jetten M. S., Pronk J. T., Op den Kamp H. J., (2003), *Arch. Microbiol.*, 180, 134-141.
24. Kuyper M., Harhangi H. R., Stave A. K., Winkler A. A., Jetten M. S., de Laat W. T., den Ridder J. J., Op den Camp H. J., van Dijken J. P., Pronk J. T., (2003), *FEMS Yeast Res.*, 4, 69-78.
25. Kuyper M., Winkler A. A., van Dijken J. P., Pronk J. T., (2004), *FEMS Yeast Res.*, 4, 655-664.
26. Kuyper M., Hartog M. M. P., Toirkens M. J., Almering M. J. H., Winkler A. A., van Dijken J. P., Pronk J. T., (2005a), *FEMS Yeast Res.*, 5, 399-409.
27. Kuyper M., Toirkens M. J., Diderich J. A., Winkler A. A., van Dijken J. P., Pronk J. T., (2006), *FEMS Yeast Res.* (in press).
28. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttila M., (2003), *FEMS Yeast Res.*, 3, 185-189.
29. Sedlak M., Ho N. W., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 16-24.
30. Becker J., Boles E., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4144-4150.
31. Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M., Picataggio S., (1995), *Science*, 267, 240-243.
32. Bothast R. J., Nichols N. N., Dien B. S., (1999), *F. Biotechnol. Progr.*, 15, 875.
33. Deanda K., Zhang M., Eddy M., Picataggio S., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4465-4470.
34. Zhang M., Chou Y., Picataggio S., Finkelstein M., (1998), *Patent USA* 5, 843, 760.
35. Lawford H. G., Rousseau J. D., (2003), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 105-108, 457-469.
36. Gellissen G., (Ed.), *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems*, 1<sup>st</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
37. Ingram L. O., Conway T., Clark D. P., Sewell G. W., Preston J. F., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2420-2425.
38. Ohta K., Beall D. S., Mejia J. P., Shanmugam K. T., Ingram L. O., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 893-900.
39. Ingram L. O., Gomez P. F., Lai X., Moniruzzaman M., Wood B., Yomano L. P., York S. W., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 204-214.
40. Yomano L. P., York S. W., Ingram L. O., (1998), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 132-138.



41. Brooks T. A., Ingram L. O., (1995), *Biotechnol. Progr.*, 11, 619-625.
42. Zhou S., Ingram L. O., (1999), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 600-607.
43. Jeffries T. W., Jin Y.-S., (2000), *Adv. Appl. Microbiol.*, 47, 221-268.
44. Shi N. Q., Davis B., Sherman F., Cruz J., Jeffries T. W., (1999), *Yeast*, 15, 1021-1030.
45. Shi N. Q., Cruz J., Sherman F., Jeffries T. W., (2002), *Yeast*, 19, 1203-1220.
46. Grabek-Lejko D., Ryabova O. B., Oklejewicz B., Voronovsky A. Y., Sybirny A. A., (2006), *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 934-940.
47. Melake T., Passoth V. V., Klinner U., (1996), *Curr. Microbiol.*, 33, 237-242.
48. Passoth V., Cohn M., Schafer B., Hahn-Hagerdal B., Klinner U., (2003), *Yeast*, 20, 39-51.
49. Stasyk O. V., Sybirny A. A., (2003a), *Proceeding of T. Shevchenko Scientific Society (Lviv)*, 10, 271-283.
50. Stasyk O. V., Nazarko T. Y., Stasyk O. G., Krasovska O. S., Warnecke D., Nicaud J.-M., Cregg J. M., Sybirny A. A., (2003), *Cell Biol. Intern.*, 27, 947-952.
51. Dunn W. A., Jr., Cregg J. M., Kiel J. A. K. W., van der Klei I. J., Oku M., Sakai Y., Sybirny A. A., Stasyk O. V., Veenhuis M., (2005), *Autophagy*, 1, 75-83.
52. Nazarko T. Y., Sybirny A. A., *Ukr. Biochem. J., (Kyiv)*, 77, 16-25. Stasyk O. V., Sybirny A. A., (2003b), *Microbiol. J., (Kyiv)*, 65, 84-103.
53. Stasyk O. V., Sybirny A. A., (2003b), *Microbiol. J. (Kyiv)*, 65, 84-103.
54. Stasyk O. V., Stasyk O. G., Komduur J., Veenhuis M., Cregg J. M., Sybirny A. A., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 8116-8125.
55. Ubiyovk V. M., Nazarko T. Y., Stasyk O. G., Sohn M. J., Kang H. A., Sybirny A. A., (2002), *FEMS Yeast Res.*, 2, 327-332.
56. Ubiyovk V. M., Blazhenko O. V., Gigot D., Penninckx M. J., Sybirny A. A., (2006), *Cell Biol. Intern.*, 30, 665-671.
57. Gellissen G., (Ed.), (2002), *Hansenula polymorpha. Biology and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 347.
58. Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J. M., Berardi E., Veenhuis M., van der Klei I., (2005), *FEMS Yeast Res.*, 5(11), 1079-1096.
59. Krasovska O. S., Stasyk O. G., Stasyk O. V., Kordium V. A., Vozianov O. F., Sybirny A. A., (2006), *Biotechnol. Bioeng.* (in press).
60. Lahtchev K., Semenova V. D., Tolstorukov I. I., van der Klei I., Veenhuis M., (2002), *Arch. Microbiol.*, 177, 150-158.
61. Ramezani-Rad M., Hollenberg C. P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U., Gellissen G., (2003), *FEMS Yeast Res.*, 4(2), 207-215.
62. Reinders A., Romano I., Wiemken A., de Virgilio C., (1999), *J. Bacteriol.*, 181, 4665-4668.
63. Middelhoven W. J., (2002), in: Ed. Gellissen G., *Hansenula polymorpha. Biology and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1-7.
64. Ryabova O. B., Chmil O. M., Sybirny A. A., (2003), *FEMS Yeast Research*, 3, 157-164.
65. Sybirny A. A., Abbas C. A., Ryabova O. B., Ishchuk O. P., Verba O. V., Dmytruk K. V., Stasyk O. V., Voronovsky A. Y., (2006), *Proc. of Bioenergy Conference, Tomar, Portugal, (March)*.
66. Voronovsky A. Y., Ryabova O. B., Verba O. V., Ishchuk O. P., Dmytruk K. V., Sybirny A. A., (2005), *FEMS Yeast Research*, 5, 1055-1062.
67. Cytrynska M., Wojda I., Jakubowicz T., (1995), *J. Basic Microbiol.*, 35, 367-373.
68. Kordowska-Wiater M., Targoński Z., (2001), *Acta Microbiol. Pol.*, 50, 291-299.
69. Kordowska-Wiater M., Targoński Z., (2002), *Acta Microbiol. Pol.*, 51, 345-352.