

ЛИПИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ИСТОЧНИК БИОТОПЛИВА

Представлены основные исследования и экспериментальные данные, направленные на поиск активных продуцентов липидов среди разных видов микроорганизмов, возможные пути оптимизации процесса липидообразования у наиболее перспективных штаммов. Показано, что поддерживаемые необходимые условия культивирования, можно управлять энзиматическим процессом образования липидов. Рассмотрено влияние на рост, развитие и биохимическую активность микроорганизмов состава среды, температуры, аэрации и окислительно-восстановительных условий. Изменение этих факторов влияло на биосинтетическую деятельность микроорганизмов, липогенную активность и на состав синтезируемых липидов. Способность дрожжей к липидообразованию, а также относительно быстрая возможность замены состава липидов и их количества с помощью направленного культивирования дает возможность сделать вывод, что полученные микробиологическим синтезом липиды могут быть источником биотоплива для производства в промышленных масштабах.

Ключевые слова: дрожжи, *Rhodotorula gracilis*, *Pichia apotata*, микробные липиды, биотопливо.

В настоящее время ведутся поиски новых источников получения липидов, в том числе и на технические нужды. Этим источником могут стать микроорганизмы, липиды которых после соответствующей обработки (рис. 1) пригодны для использования в различных отраслях промышленности, что позволит высвободить значительные количества масел животного и растительного происхождения [1].

В процессе культивирования микроорганизмов на различных средах получают три класса липидов: простые, сложные и производные липидов. Простые липиды – нейтральные жиры и воски. Нейтральные жиры (основные запасные компоненты клетки) – эфиры глицерина и жирных кислот, основную массу которых составляют триацилглицериды (моно- и диглицериды). Воски – эфиры жирных кислот или монооксикислот и алифатических спиртов с длин-

ной углеродной цепью, которые по структуре и свойствам близки к нейтральным липидам. Наибольшее количество нейтральных липидов синтезируют дрожжи и мицелиальные грибы. Продуцентами сложных липидов являются в основном бактерии [1–6].

Сложные липиды делятся на две группы: фосфолипиды и гликолипиды. Фосфолипиды (фосфоглицериды и сфинголипиды) входят в состав различных клеточных мембран. Их молекулы полярны, и при pH 7,0 фосфатная группа несет отрицательный заряд. Концентрат фосфолипидов находит применение в качестве антикоррозийной присадки к маслам и как добавка при флотации различных минералов. Гликолипиды в отличие от фосфолипидов не содержат молекулы фосфорной кислоты, но также являются сильнополярными соединениями за счет наличия в молекуле гидрофильных углеводных групп (остатков глюкозы, маннозы, галактозы и др.).

Как видно из рис. 2, наибольшую часть фракций различных микроорганизмов занимают триглицериды (около 75 %).

К производным липидов относят жирные кислоты, спирты, углеводороды, витамины Д, Е и К. Жирные кислоты представлены насыщенными и ненасыщенными с одной двойной связью кислотами нормального строения и четным количеством углеродных атомов (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая). Среди диеновых жирных кислот можно выделить линолевую. Двойные связи в ненасыщенных жирных кислотах микробных липидов часто располагаются так, что делят их на части, количество углеродных атомов в которых кратно трем.

Спирты, присутствующие в липидах, делятся на три группы: 1) спирты с прямой цепью; 2) спирты с β-ионовым кольцом, включающие витамин А и каротиноиды; 3) стеринны – компоненты неомыляемой части липидов (например эргостерин, облучение которого ультрафиолетовым светом позволяет получать витамин D₂).

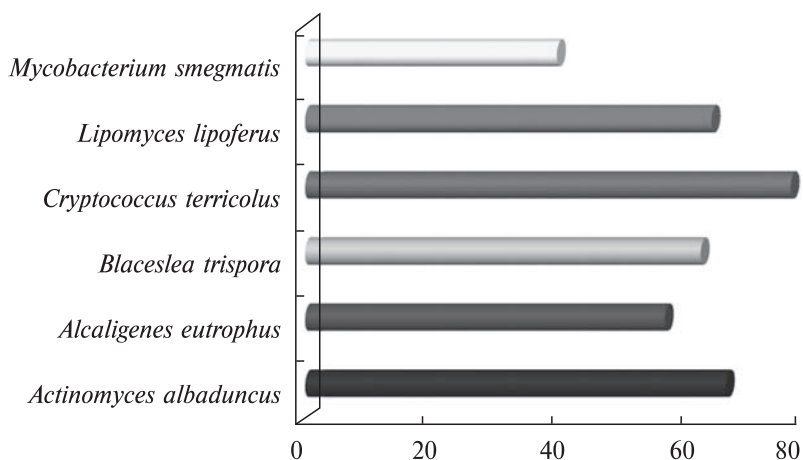


Рис. 1. Общее содержание липидов у некоторых микроорганизмов. По горизонтали – концентрация липидов, % от СВК (сухих веществ клетки)

Технологический процесс получения микробных липидов, в отличие от получения растительных жиров, включает стадию глубокого разрушения клеточной структуры и выделения липидов методом экстракции в неполярном растворителе. При этом получают одновременно два готовых продукта: микробный жир (биожир) и обезжиренный белковый препарат (биошрот). Но экстракционный способ извлечения жиров полярными растворителями очень взрыво- и пожароопасный. Поэтому сейчас отказываются от этого метода, пытаются найти альтернативу [1–6].

Некоторые липиды, получаемые из микроорганизмов, не имеют аналогов в растительных и животных клетках. Например, поли-β-гидроксibuтират (ПГБ) – это термопластичный полиэфир, состоящий из повторяющихся блоков (–CH(CH₃)–CH₂–CO–O–). Как установлено более 50 лет назад, он является резервным энергозапасующим соединением и накапливается самыми разнообразными микроорганизмами (например, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas* и *Rhizobium*). В некоторых условиях отдельные виды, в частности *Alcaligenes eutrophus* и *Azotobacter beijerinckii*, способны аккумулировать этот полимерный материал в таком количестве, что он составляет до 70 % их сухой массы (рис. 3).

Накоплению ПГБ внутри клеток при росте на углеводах или других источниках углерода, например метаноле, способствует недостаток

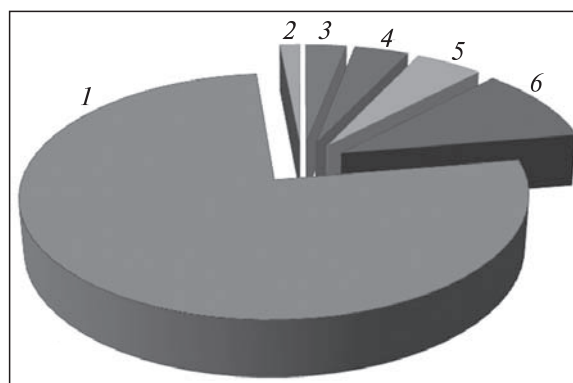


Рис. 2. Усредненный фракционный состав липидов микроорганизмов: 1 – триглицериды, 75 %; 2 – стеринные эфиры и воска, 2 %; 3 – фосфолипиды, 3 %; 4 – стерины, 4, %; 5 – моно- и диацилглицериды, 5 %; 6 – свободные жирные кислоты, 10 %

фосфора или азота. Поэтому образование этого полимера может быть одностадийным процессом, при котором лимитирующим фактором с самого начала роста является определенное питательное вещество. Процесс может быть и двухстадийным, когда микроорганизмы сначала растут в среде, содержащей достаточное количество питательных веществ, для накопления биомассы, а затем переводят в условия, где лимитирующим рост фактором служит какой-либо компонент среды, кроме углерода, что вызывает значительное повышение уровня внутриклеточного ПГБ. К накоплению ПГБ способны многие виды, но выход продукта и мо-

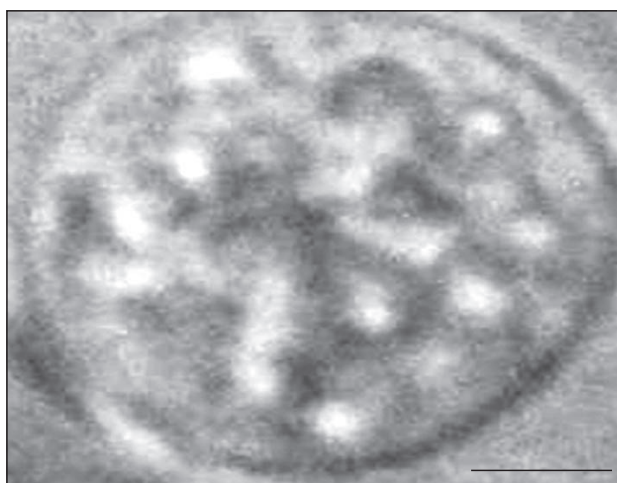


Рис. 3. Дрожжевая клетка *Candida utilis* с липидными включениями (бар – 1 мкм)

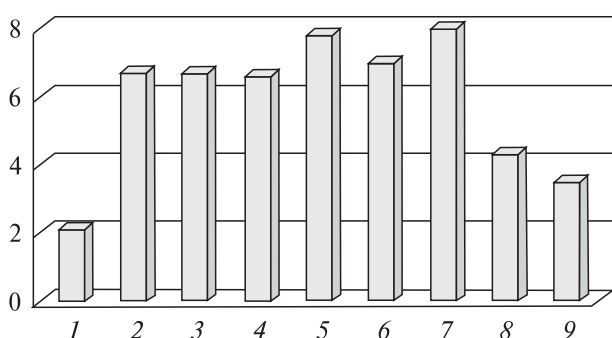


Рис. 4. Штаммы дрожжей с повышенным синтезом липидов: по вертикали – жировой коэффициент, ед.; по горизонтали: 1 – *Candida valida* Y-691; 2 – *Candida utilis* L-35; 3 – *Pichia anomala* M-1; 4 – *Pichia polymorpha* V-1; 5 – *Pichia anomala* L-1; 6 – *Rhodotorula glutinis* K-1; 7 – *Rhodotorula gracilis* SK-4; 8 – *Saccharomyces cerevisiae* M-5; 9 – *Saccharomyces uvarum* H-7

лекулярная масса синтезируемого полимера у них обычно недостаточны для использования этих организмов в промышленном производстве. Необходимо, чтобы содержание ПГБ в биомассе составляло не менее 30–40 % (по весу), а молекулярная масса полимера была порядка 200000–300000. Поскольку ПГБ образуется в виде внутриклеточных гранул, его экстрагируют из микроорганизмов после разрушения клеток. Предпочтительным методом его очистки служит экстракция растворителями типа галогенированных углеводов, например 1,2-ди-

хлорэтаном. Альтернативный подход к получению полимера в пригодном к использованию виде состоит в прессовании в формах или экструзии высушенных клеток самого микроорганизма с содержанием ПГБ по весу не менее 50 %. Для получения композиции, пригодной к созданию предметов определенной формы, клетки разрушают и при необходимости смешивают с нужным количеством экстрагированного полимера. Один из технологических подходов к изменению полимерных свойств ПГБ предусматривает изменение состава гомополимера *in situ*. Этот резервный энергетический материал является простым полиэфиром мономера ρ -гидроксипропаната. Однако сейчас установлено, что во многих случаях он представляет собой более сложный гетерополимер разных жирных β -гидроксикислот. Следовательно, состав этого полимера можно менять в процессе роста микроорганизма, например добавлением пропионовой кислоты к культуральной среде: таким способом в образующийся сополимер вводятся остатки β -гидроксипропаната. Это в свою очередь изменяет реологические свойства полимера.

Появление на рынке синтезируемых микробами гетерополимеров ПГБ вряд ли окажет существенное влияние на индустрию пластмасс; однако полезные свойства этого полимера, особенно его подверженность биодegradации, могут способствовать его применению в ряде областей.

Для промышленного использования важное значение имеет способность активно накапливать липиды. Этой способностью обладают немногие микроорганизмы, в первую очередь дрожжи. Процесс образования липидов у большинства дрожжей состоит из двух четко разграниченных стадий. Первая стадия характеризуется быстрым образованием белка в условиях усиленного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением липидов (в основном глицерофосфатов и нейтральных жиров). Для второй стадии характерно прекращение роста дрожжей и усиленное накопление липидов (в основном нейтральных).

Типичными липидообразователями являются дрожжи *Cryptococcus terricolus*. Они могут синтезировать большое количество липидов (до 60 % от сухой массы) в любых условиях [8].

Из других липидообразующих дрожжей промышленный интерес представляют дрожжи *S. guilliermondii*, утилизирующие алканы. Они синтезируют в основном фосфолипиды. Накапливают большие количества липидов и активно развиваются на углеводных субстратах (на мелассе, гидролизатах торфа и древесины) также дрожжи видов *Lipomyces lipoferus* и *Rhodotorula gracilis*. У этих видов дрожжей липогенез сильно зависит от условий культивирования. Эти продуценты накапливают значительные количества (до 70 %) триацилглицеридов [9].

Микроскопические грибы пока не имеют большого распространения в получении липидов, хотя жир грибов по своему составу близок к растительному. Выход жиров у *Asp. terreus*, например, на углеводных средах достигает 51 % от сухих веществ клетки (СВК). Липидный состав грибов представлен в основном нейтральными жирами и фосфолипидами. В природе наиболее распространены такие липидообразователи, как *Rhodotorula* и *Pichia*. Они могут продуцировать липиды в пределах 30–40 % от СВК.

В результате скрининга дрожжевых культур продуцентов липидов (рис. 4) были отобраны штаммы с повышенным липогенезом [10]. Эффективность синтеза липидов определяли по жировому коэффициенту.

Важно отметить, что накопление липидов микроорганизмами в больших количествах не является нормой для клетки, это скорее ответ на стрессовую ситуацию [11–13]. Процесс липидообразования можно условно разделить на две стадии, в которой первой является сбалансированный рост микроорганизмов в среде со всеми необходимыми питательными веществами, на второй же стадии – собственно липогенеза (накопления липидов) один из источников питания лимитирует, в том числе и O_2 . Ряд авторов [14–18] утверждают, что кислород способствует процессам липидообразования. В результате исследований установлено, что для максимального накопления биомассы и липидов скорость аэрации разная [14]. От интенсивности аэрации зависит синтез фосфоглицеридов, жирных кислот и триацилглицеридов. При недостаточной аэрации липиды содержат в 4 раза меньше триацилглицеридов, в 2 раза больше фосфоглицеридов и в 8 раз

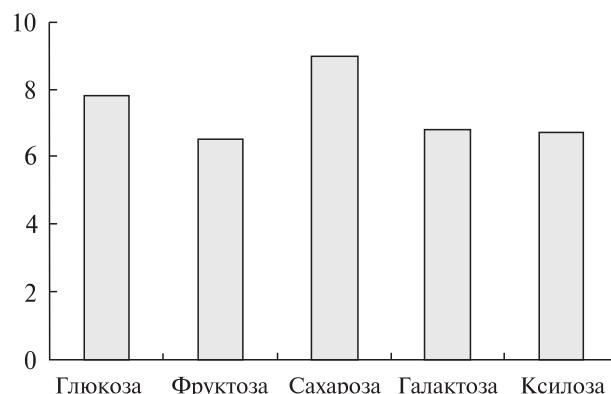


Рис. 5. Синтез липидов *Rhodotorula gracilis* SK-4 на средах с разными моносахаридами: по вертикали – концентрация липидов, г/л

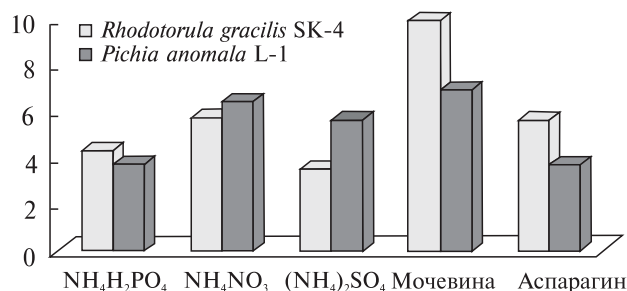


Рис. 6. Липидообразование и рост дрожжей на разных источниках азота: по вертикали – концентрация липидов, г/л

больше жирных кислот, чем при нормальной аэрации [15]. При интенсификации аэрации возрастает степень ненасыщенности липидов и увеличивается относительное количество всех групп ненасыщенных кислот. Так, для синтеза

Таблица 1. Влияние скорости аэрации среды на накопления биомассы и синтез липидов у *Rhodotorula gracilis* SK-4, г/л

Скорость аэрации, г O_2 /л·ч ⁻¹	Биомасса	Липиды
0,6	8	4
1,2	10	6
2	12	8
2,6	14	8,5
3,2	15	9,0
6	16	9,5
12	13	12
20	12	10

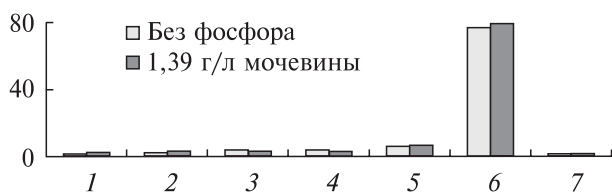


Рис. 7. Фракционный состав липидов дрожжей под действием фосфатов: по вертикали – количество, %; по горизонтали: 1 – фосфолипиды; 2 – не идентифицировано; 3 – стерины; 4 – моно- и диглицериды; 5 – жирные кислоты; 6 – триглицериды

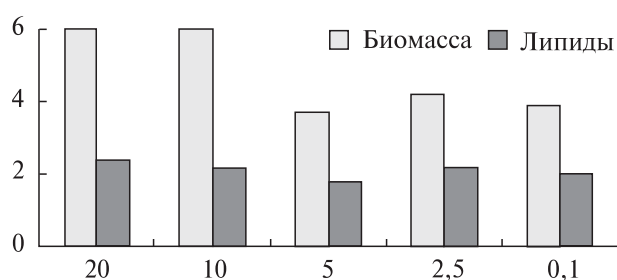


Рис. 8. Рост и липидообразование дрожжей (по вертикали, г/л) на разных концентрациях ионов магния; по горизонтали – концентрация сульфата магния, г/л

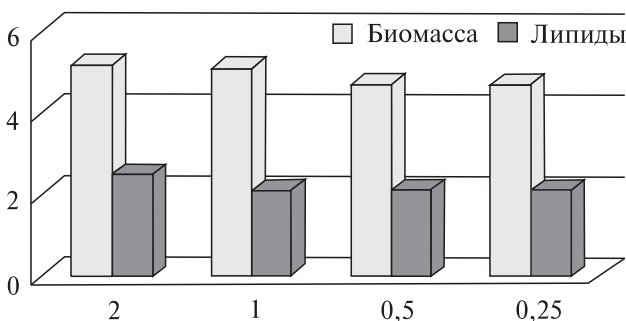


Рис. 9. Рост и липидообразование дрожжей (по вертикали, г/л) на разных концентрациях ионов калия; по горизонтали – концентрация хлористого калия, г/л

биомассы у *Rhodotorula gracilis* SK-4 максимальная скорость растворения кислорода составляет 6 г O_2 /л·ч⁻¹, а для получения липидов – 12 г O_2 /л·ч⁻¹ [14] (табл. 1).

Липиды, синтезируемые бактериями, различны по своему составу, так как включают в основном сложные липиды, тогда как нейтральные жиры составляют незначительную часть биомассы. При этом бактерии произво-

дят разнообразные жирные кислоты (содержащие от 10 до 20 атомов углерода), что важно для промышленного получения специфических жирных кислот. Основную роль в процессе биосинтеза липидов играют различные штаммы дрожжей. Они используют те же источники сырья, что и для получения кормового белка, причем от ценности углеродного питания зависят выход биомассы, количество и состав синтезируемых липидов. Для обеспечения направленного биосинтеза липидов в питательной среде употребляются легко ассимилируемые источники азота [14].

На сдвиг биосинтеза в сторону образования липидов или белка влияет соотношение углерода и азота в среде (рис. 6). Так, повышение концентрации азота вызывает снижение липидообразования, а недостаток азота при обеспеченности углеродом ведет к понижению выхода белковых веществ и высокому процентному содержанию жира [19–21].

Установлено, что оптимальное соотношение N:C тем меньше, чем труднее для дрожжей источник углерода. Обычно для углеводородного сырья соотношение N:C = 1:30, а для углеводного – 1:40. Накопление липидов возможно только при наличии в среде фосфора. При его недостатке источники углерода используются не полностью, а при избытке накапливаются нелипидные продукты. Из безазотистых минеральных солей на рост и накопление липидов дрожжами наиболее сильное влияние оказывали фосфаты. Нормальный ход накопления липидов возможен только при наличии в среде определенных доз усвояемого фосфора. Однако в зависимости от свойств дрожжей-липидообразователей оптимальная концентрация фосфора в среде может быть различной. Недостаток фосфора в среде приводил к неполному использованию сахара среды, избыток же менял направление процесса в сторону усиления нелипидной фазы роста дрожжей (рис. 7). Исследование синтеза липидов у *Rh. gracilis* SK-4 показало [22], что повышение концентрации в среде фосфора подавляло включение ацетата- C^{14} в жирные кислоты и неомыляемые липиды. Такое действие фосфорных солей можно объяснить их ролью в метаболических процессах дрожжевой клетки. Недостаток фосфора в среде влиял на процес-

сы синтеза белка. Обильное снабжение фосфором способствовало повышенному синтезу белка, а недостаток — усилению липидообразования.

Таким образом, в известной степени действие фосфатов на липогенез дрожжей аналогично действию солей азота: избыток угнетает, а недостаток стимулирует процессы биосинтеза липидов. Однако повышение количества липидов в дрожжах при недостатке фосфора гораздо меньше, чем при недостатке азота.

Воздействие остальных элементов среды (микро- и макроэлементов) сказывается на интенсивности роста дрожжей и скорости утилизации источника углерода, что влияет и на количество накопленных липидов, но не на их качество [1].

Исследования показали, что магний не оказывает заметного влияния на липогенез дрожжей, хотя на степени использования редуцирующих веществ среды и накопления биомассы дрожжей добавление в среду сернокислого магния оказывало положительное влияние (рис. 8). Наибольшее количество липидов в процентах к сухим веществам клеток синтезировали дрожжи при добавлении 2,5 г/л сернокислого магния. Внесение больших количеств сернокислого магния (20 и 10 г/л) приводило к заметному торможению синтеза липидов дрожжами [1].

Добавление солей калия приводило к некоторому улучшению степени использования РВ среды и повышению общего выхода дрожжевой биомассы (рис. 9). Вместе с тем ионы калия оказывали положительное влияние и на биосинтез дрожжами липидов. По своему действию введение в среду калия аналогично введению магния. Не оказывая непосредственного влияния на липогенез дрожжей, ионы калия и магния в известной мере влияли на степень использования углерода и азота среды, а также на скорость накопления дрожжевой биомассы. В свою очередь это способствовало некоторому увеличению общего выхода липидной продукции дрожжей [22–24].

На фракционный состав синтезируемых липидов оказывают другие условия культивирования — pH и температура (рис. 10). Повышение pH среды ведет к увеличению содержания фосфоглицеридов и жирных кислот при одно-

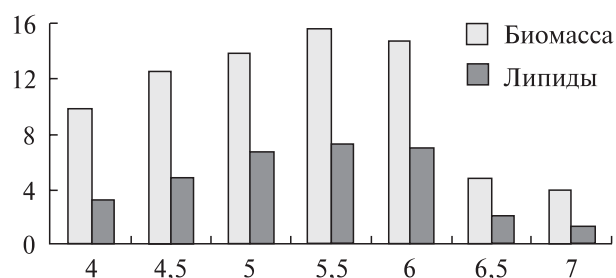


Рис. 10. Синтез биомассы и липидов дрожжей (по вертикали, г/л) на разных pH среды (по горизонтали)

временном снижении количества триацилглицеридов [1].

Оптимальные температуры роста и липидообразования для клеток совпадали, причем содержание липидов не зависело от температуры культивирования. Однако регулируя температуру, можно создавать разные соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидных мембран (табл. 2).

Следует отметить, что не все микроорганизмы могут быть продуцентами липидов. Среди более 1000 видов дрожжей только 25 могут накапливать свыше 20 % (в сухой биомассе) липидов. Для грибов этот показатель еще ниже, среди более 60 000 видов только 50 способны к накоплению липидов [16].

Способность дрожжей к липидообразованию и сравнительно быстрая возможность изменения количества и состава липидов с помощью направленного культивирования позволяют предполагать, что получение липидов микробиологическим синтезом с использованием отходов промышленности и продуктивных штаммов — направление перспективное и экономически выгодное.

Таблица 2. Влияние температуры культивирования на рост и липидообразование *Rhodotorula gracilis* SK-4, г/л

Температура, °С	Биомасса	Липиды
25	13	6
28	14	7,2
31	14,5	8,0
34	16	8,5
37	13,5	9,5
40	12	8

A. Tkachenko, O. Tigonova, S. Shulga

State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: Shulga5@i.ua

MICROBIAL LIPIDS AS A SOURCE FOR BIOFUEL

This review presents the main directions and experimental data to search among the different species of yeast – active producers of lipids and the ways to lipidogenesis process optimization in the most promising strains. It was shown that enzymatic processes course can be directed with maintaining the necessary cultivation conditions. The influence on the growth, development and biochemical activity of microbial medium composition, temperature, aeration and oxidation-reduction conditions was considered. These factors changing have affected the microorganisms biosynthetic activity, lipidogenic yeasts activity and synthesized lipids composition. Lipidogenic yeasts ability and relatively rapid ability on changing the amount and composition of lipids by the direct cultivation leads to the conclusion that lipids obtained by microbial synthesis can be a source of commercial raw materials for biofuel.

А.Ф. Ткаченко, О.О. Тигунова, С.М. Шульга

ЛІПІДИ МІКРООРГАНІЗМІВ ЯК ДЖЕРЕЛО ДЛЯ БІОПАЛИВА

Представлено основні напрямки досліджень і експериментальні дані, направлені на пошук активних продуцентів ліпідів серед різних видів дріжджів, та шляхи оптимізації процесу ліпідоутворення у найбільш перспективних штамів. Показано, що підтримуючи необхідні умови культивування, можна керувати ходом ензиматичних процесів. Розглянуто вплив на ріст, розвиток та біохімічну активність мікроорганізмів складу середовища, температури, аерації та окислювально-відновних умов. Зміна цих факторів впливала на біосинтетичну діяльність мікроорганізмів, ліпогенну активність дріжджів та склад ліпідів, що синтезуються ними. Властивість дріжджів до ліпідоутворення та відносно швидка можливість змінення кількості та складу ліпідів за допомогою направленою культивування дає змогу зробити висновок про те, що отримані мікробіологічним синтезом ліпіди можуть слугувати джерелом сировини для одержання біопалива в промислових масштабах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ткаченко А.Ф., Тигунова Е.А., Шульга С.М. Микробные липиды – альтернативный источник сырья для биотоплива // Микробиология і біотехнологія. – 2012. – 3. – С. 17–33.

2. Carioca J.O.B. Biofuels : Problems, challenges and perspectives // Biotechnol. J. – 2010 – 5. – P. 260–273.
3. Hirsch R.L., Bezdek R., Wendling R. Peaking of world oil production and its mitigation // AIChE J. – 2006. – 52 – P. 2–8.
4. Kerr R.A. Climate change : Global warming is changing the world // Science – 2007. – 316. – P. 188–190.
5. Олійничук С., Кизюн Г., Шиян П., Сосницький В. Сучасні й перспективні технології виробництва біопалив на світовому ринку. Харчова і переробна промисловість. – 2009. – 6, № 358. – С. 11–13.
6. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. – К.: Наук. думка, 2010. – 328 с.
7. Залашко М.В. Биосинтез липидов дрожжами. – М.: Наука и техника, 1971. – 216 с.
8. Asselineau J., Lederer E. Chemistry and metabolism of bacterial lipids // Lipid metabolism. – New York, 1960. – 200 p.
9. Губарев Е.М. Основные процессы обмена веществ у микробов. М.: Мир, 1961. – 165 с.
10. Шульга С.М., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Е. и др. Биосинтез липидов дрожжами *Rhodotorula gracilis* // Биотехнология – 2010. – 3, № 3. – С. 58–65.
11. Ганбаров Х.Г., Абдулгамидова С.М. Изучение внутривидовых морфо-культуральных изменений дрожжевых грибов, хранившихся в коллекции культур // Весн. Бакин. гос. ун-та. Сер. биол. наук. – 2007. – 1. – С. 42–46.
12. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Изв. высш. учеб. заведений. Поволжский регион. – 2009. – 4. – С. 99–121.
13. Лукин А.А. Экспериментальные исследования диссоциации у *Bacillus brevis* var. G.-B. : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1965. – 20 с.
14. Shulga S.M., Tkachenko A.F., Beyko N.E. Biosynthesis of lipids by the yeast *Rhodotorula gracilis* // BioMicroWord 2009 (Lisbon, 2–4 Dec., 2009). – P. 385.
15. Шульга С.М., Тигунова О.О., Ткаченко А.Ф. та ін. Вплив ліофільного висушування на життєздатність дріжджів *Pichia anomala* // Біотехнологія. – 2011. – 4, № 4. – С. 83–86.
16. Rattray J.B., Schibeci A., Kidby D.K. Lipids of yeasts // Bacteriol Rew. – 1975. – 39, № 3. – P. 197–231.
17. Hall M.J., Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage

- continuous culture // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1977. – **33**, № 3. – P. 577–584.
18. Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. – 160 с.
19. Ratledge C., Wynn J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2002. – **51**. – P. 1–44.
20. Alvarez H., Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – **60**. – P. 367–376.
21. Meng X., Yang J., Xu X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms // *Renewable Energ.* – 2009. – **34**. – P. 1–5.
22. Van Hamme J.D., Ward O.P. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas sp.* strain JA5-B45 and *Rhodococcus sp.* stain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – **67**, № 10. – P. 4874–4879.
23. Steen E., Kang Y., Bokinsky G. et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass // *Nature*. – 2010. – **463**. – P. 559–562.
24. Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – **80**. – P. 749–756.

Поступила 15.07.13