

С.Я. Парижак

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
вул. Пекарська, 69 (Шімзерів, 1), Львів, 79010, Україна,
тел.: +38 (032) 275 49 66, e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ – НАДПРОДУЦЕНТІВ ФОРМАЛЬДЕГІДРЕДУКТАЗИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA* *POLYMORPHA*

Метою даної роботи було отримати рекомбінантні штами термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* надпродуцентів формальдегідредуктази (ФР), які можуть мати біоаналітичне використання. **Методи.** Дріжджі вироциували на синтетичному середовищі Беркгольдера (СБ) з наступним складом (у г/л): KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; зі стандартною кількістю мікроелементів та 0,05% (в/о) дріжджового екстракту. Джерелом вуглецю слугували 1% глюкоза (в/о) або 1% метанол (по об'єму). Загальні активності ферментів у безклітинних екстрактах визначали спектрофотометрично (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм за швидкістю утворення NADH – для алкогольдегідрогенази (АДГ) чи утилізації NADH – для ФР, при кімнатній (20–25 °С) температурі. Питому активність (ПА) для кожного ферменту (в мкмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ білка) розраховували за формулою: $\text{ПА} = \text{ПА}_{+\text{субстрат}} - \text{ПА}_{-\text{субстрат}}$, яка враховує неспецифічні фонові реакції. **Результати.** Сконструйовано плазмиду експресії p21Sc21, що містить ген *ADH1 Saccharomyces cerevisiae*, під контролем сильного конститутивного промотора гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAP1*) *H. polymorpha*. Дріжджові клітини *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*) трансформували методом електропорації. Відбір інтегрантів проводили за резистентністю до зеоцину. Наявність у геномі трансформантів рекомбінантної плазмиди, що містить ген *ADH1 S. cerevisiae*, перевіряли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). **Висновки.** Рекомбінантні штами характеризувались в 4–6 разів вищою активністю АДГ та в 2–3 рази вищою активністю ФР в безклітинних екстрактах порівняно з вихідним штамом. Стабільні трансформанти виявились резистентними до підвищених концентрацій формальдегіду (до 10 мМ) у ростовому метанольному середовищі.

Ключові слова: формальдегідредуктаза, метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha*, формальдегід, генно-інженерне конструювання.



Формальдегід (ФА) є універсальним природним метаболітом живих організмів і водночас дуже токсичною сполукою, у зв'язку з чим вивчення шляхів підтримання концентрації ФА в клітинах на безпечному рівні та детоксикації екзогенного ФА має важливе прикладне значення [7, 10].

Метилотрофні дріжджі можуть служити зручною моделлю для вивчення механізмів утилізації ФА, оскільки здатність до метаболізму одновуглецевих сполук є унікальною рисою цих нижчих еукаріотних організмів [11, 12]. У детоксикації ФА у дріжджів беруть участь певні ізоферменти алкогольдегідрогенази (АДГ). У пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* відомо 7 структурних генів даного ферменту: *ADH1–ADH7* [3, 6]. Продукт *Adh1p* – цитозольний ізофермент АДГ, який каталізує НАДН-залежне відновлення ацетальдегіду до етанолу і ФА до метанолу без участі глутатіону: $CH_2O + NADH(H^+) \rightarrow CH_3OH + NAD^+$ [5]. Цю реакцію, зворотно до дегідрогеназної, називають у випадку ФА, як субстрату, формальдегідредуктазною. Ізофермент АДГ *Adh1p* у *S. cerevisiae* гомологічний формальдегідредуктазі (ФР) метилотрофних дріжджів [2].

Метою роботи було сконструювати та охарактеризувати продуценти формальдегідредуктази на основі термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам NCYC 495 (*leu1-1*) термотолерантних метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* з колекції Інституту біології клітини НАН України; штам *S. cerevisiae* BY4742 (*MATaleu2-ΔOlys2-ΔOura3-ΔOhis3-ΔI*) люб'язно наданий д-ром Д. Беком (ун-т м. Балтімор, США); *Escherichia coli* DH5α (штам для конструювання та селекції рекомбінантних плазмід *φ80d lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*).

Плазміди, використані в роботі: pBluescriptIIKS⁺ (2,9 т.п.н.) вектор загального призначення *E. coli* (*ori ColE1, Ap^R, lacZ'*); p21 (7,9 т.п.н.) вектор експресії у *H. polymorpha* з *GAP* промотором та *Zeo^R*, який забезпечує селекцію у дріжджах, сконструйований співробітницею Інституту біології клітини НАН України О. Ішук; pBlSc6 (4 т.п.н.) похідна pBluescriptIIKS⁺ з клонованим геном *ADH1 S. cerevisiae*; p21Sc21 (9,1 т.п.н.) похідна p21 з клонованим геном *ADH1 S. cerevisiae*. Дві останні (pBlSc6 та p21Sc21) було отримано в ході роботи.

Дріжджі вирощували на синтетичному середовищі Беркгольдера (СБ) з наступним мінеральним складом (у г/л): KH_2PO_4 – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 3,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $CaCl_2$ – 0,1. Залізо вносили у середовище у вигляді солі Мора в концентрації 0,2 мг/л, зі стандартною кількістю мікроелементів та 0,05% (в/о) дріжджового екстракту [2]. Джерелом вуглецю слугували 1% глюкоза (в/о) або 1% метанол (по об'єму). До середовища при необхідності додавали лейцин – до концентрації 40 мг/л. Агаризовані середовища містили 2% агару. Культури дріжджів вирощували у термо-



статах на чашках Петрі при температурі 30 °С. Культивування дріжджів в рідких середовищах здійснювали у пробірках або колбах об'ємом 250 мл на круговому шейкері (200 об/хв) за температури 30 °С (за 37 °С для термотолерантних штамів *H. polymorpha*). Оптичну густину дріжджових культур вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП, і, використовуючи калібрувальну криву, визначали їх суху біомасу в 1 мл середовища.

Безклітинні екстракти для визначення активності ферментів отримували як описано в роботі [1]. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі. Загальні активності ферментів у свіжих безклітинних екстрактах визначали спектрофотометрично (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм за швидкістю утворення НАДН — для АДГ чи утилізації НАДН — для ФР [2]. Питому активність (ПА) для кожного ферменту (в мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка) розраховували за формулою: $PA = PA_{+субстрат} - PA_{-субстрат}$, яка враховує неспецифічні фонові реакції.

Методи культивування бактерій *E. coli* та молекулярно-генетичні методи описані в [9]. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* проводили за допомогою набору Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції та лігазу використовували згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), з використанням Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) відповідно до інструкції виробника. Трансформацію дріжджових клітин проводили методом електропорації [4].

Результати та їх обговорення

Для підвищення виходу ФР із клітин метилотрофних дріжджів, було вирішено провести генно-інженерне конструювання штаму, здатного до надекспресії гена *ADH1*, який кодує ФР. Відомо, що продукт гена *ADH1* *S. cerevisiae* крім дегідрогеназних властивостей, володіє редуктазними, тому нами було вирішено клонувати даний ген для надекспресії у геномі дріжджів *H. polymorpha*. З метою конструювання плазмиди експресії, що містить ген *ADH1*, за допомогою ПЛР, використовуючи сконструйовані праймери (ScFor5' - (ATCATATGTCTATCCCAGAAACTCAA-3')/ScRev(5' - AGCGGCCGCATG

CCG GTAGAGGTGT-3') і хромосомну ДНК *S. cerevisiae* BY 4742 як матрицю ми ампліфікували відкриту рамку зчитування гена *ADH1* *S. cerevisiae*. Для полегшення ПЛР, хромосомну ДНК розщеплювали ферментом *Xba*I. Отриманий фрагмент величиною 1,2 т.п.н. клонували в плазмиду рBluescriptIIKS⁺ за допомогою T/A клонування. Як результат, отримано плазмиду рBlSc6. На наступному етапі роботи ген *ADH1* *S. cerevisiae*, фланкований сайтами рестрикції *Nde*I і *Not*I, субклонували у плазмиду інтегративного типу р21 під сильний конститутивний промо-



тор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAP1*) *H. polymorpha*. Плазмід р21 містить доміантний маркер стійкості до зеоцину *Zeo^R*, який забезпечує селекцію у дріжджах та ген *LEU2* *S. cerevisiae* як додатковий селективний маркер для ауксотрофного за лейцином штаму *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Одержану плазмід було названо р21ADH1Sc (рис. 1) [8]. Рестрикційний аналіз її підтвердив, що нами субклоновано фрагмент, який містить ген *ADH1* *S. cerevisiae*.

Для конструювання та ампліфікації плазмід на всіх етапах роботи було використано штам *E. coli* DH5α.

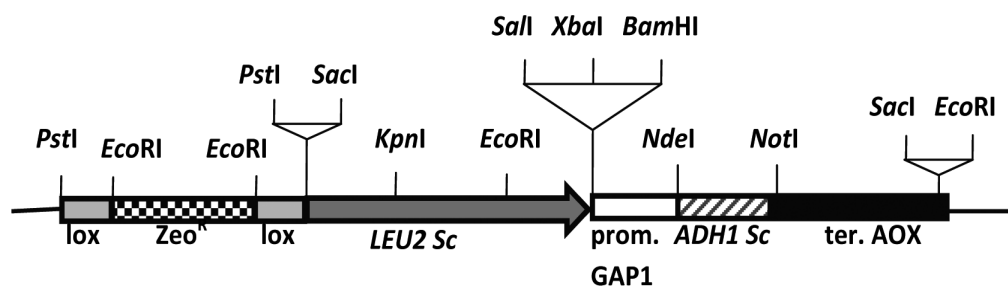


Рис. 1. Лінійна схема плазмід р21Sc21 (9,1 т.п.н.).

Фрагмент ДНК *S. cerevisiae*, що несе ген *LEU2*, позначено товстою сірою стрілкою; *GAP1* промотор *H. polymorpha* позначено незабарвленим відрізком; термінатор *AOX* *H. polymorpha* позначено товстим чорним відрізком; ген *ADH1* *S. cerevisiae* – товстою смугастою лінією; ген резистентності до зеоцину – товстою пунктирною лінією; *loxP* послідовності – товстими світло-сірими відрізками. Сайти рестрикції: *PstI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *NdeI*, *NotI*, *SacI*.

Fig. 1. Linear scheme of plasmid p21Sc21 (9.1 kb).

S. cerevisiae DNA fragment containing gene *LEU2* is marked as a thick grey arrow; promoter *GAP1* *H. polymorpha* gene is marked as a white segment; terminator *AOX* *H. polymorpha* as a thick black line segment; gene *ADH1* *S. cerevisiae* as a thick striped line; gene of resistance to zeocine as a thick dotted line; *loxP* sequences as thick light grey lines. Restriction sites: *PstI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *NdeI*, *NotI*, *SacI*.

Сконструйовану плазмід експресії р21ADH1Sc лінеаризували рестриктазою *BamHI* та трансформували за допомогою електропорації у штам *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Відбір трансформантів/інтегрантів проводили за резистентністю до зеоцину (за концентрації 150 мкг/мл) та відновленням лейцинової прототрофності. Середня ефективність трансформації становила $1,5 \times 10^3$ (число *Zeo^R*-трансформантів/мкг ДНК).

Відібрані штами стабілізували шляхом культивування в неселективних умовах протягом восьми-десяти генерацій з подальшим перенесенням на середовище з зеоцином. Наявність у геномі трансформантів рекомбінатної плазмід, що містить ген *ADH1* *S. cerevisiae*, тестували за допомогою ПЛР. За використання праймерів ScFor/ScRev і хромосомної ДНК стабільних трансформантів як матриці, отримано фрагмент очікуваної величини (~1,2 т.п.н.) (рис. 2).

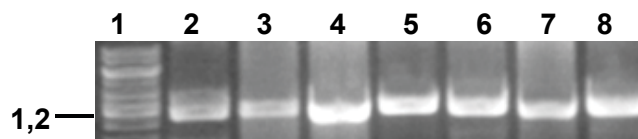


Рис. 2. Електрофореграми ПЛР-аналізу трансформантів штаму *H. polymorpha leu1-1* плазмідом р21Sc21.

Доріжки: 1 – ДНК фага λ розщеплена рестриктазою *PstI* ($\lambda/PstI$) (розмір фрагмента подано в т.п.н.), 2–7 – трансформанти, 8 – позитивний контроль (хромосомна ДНК *S. cerevisiae* BY4742).

Fig. 2. Electrophoresis of the PCR assay of *H. polymorpha leu1-1* transformants with the plasmid р21Sc21.

Lines: 1 – DNA of phage λ digested with *PstI* ($\lambda/PstI$) (the fragment value is expressed in kb), 2–7 are transformants, 8 – positive control (chromosomal DNA of *S. cerevisiae* BY4742).

Інтегранти, що містили цю рекомбінантну конструкцію, вивчали на резистентність до ФА. Дослідили ріст вихідного штаму *H. polymorpha leu1-1* та його трансформантів у ростовому метанольному середовищі з концентраціями ФА 5, 8 та 10 мМ. Виявилось, що при інкубації дріжджів у присутності ФА протягом 3 діб ростова біомаса трансформантів була в 2 рази більшою, ніж вихідного штаму. Найбільша різниця в біомасі спостерігалась при 8 мМ і 10 мМ ФА.

Щоб переконатися, що підвищена резистентність до ФА зумовлена активністю ФР, отримані трансформанти і вихідний штам вирощували на середовищі з 1% глюкозою (Glc) та ФА. У присутності Glc синтез НАД⁺ і глутатіон-залежної формальдегіддегідрогенази, якій належить основна роль у дисиміляції і детоксикації ФА у дріжджів, є репресований, тому детоксикація ФА здійснюється за іншим механізмом. Ймовірно, саме за участю ФР, яка каталізує відновлення ФА до менш токсичного метанолу. Як видно з рис. 3, отримані трансформанти за таких умов вирощування виявилися більш резистентними до ФА.

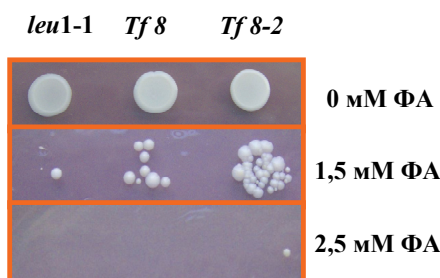


Рис. 3. Резистентність вихідного штаму *H. polymorpha leu1-1* і трансформантів (*Tf 8* та *Tf 8-2*) до ФА при рості на середовищі з 1% Glc (наносили по 4 мкл суспензії з A_{540} 0,27).

Fig. 3. Resistance of parental strain *H. polymorpha leu1-1* and transformants (*Tf 8* and *Tf 8-2*) growing in the medium with 1% Glc (add 4 μ l of suspension with A_{540} 0,27) to FA.

Відібрані рекомбінантні штами характеризувались в 4–6 разів вищою активністю АДГ та в 2–3 рази вищою активністю ФР в безклітинних екстрактах порівняно з реципієнтним штамом *H. polymorpha leu1-1*. Активності АДГ та ФР у інтегрантів зростали синхронно, але не в однаковій мірі (рис. 4).

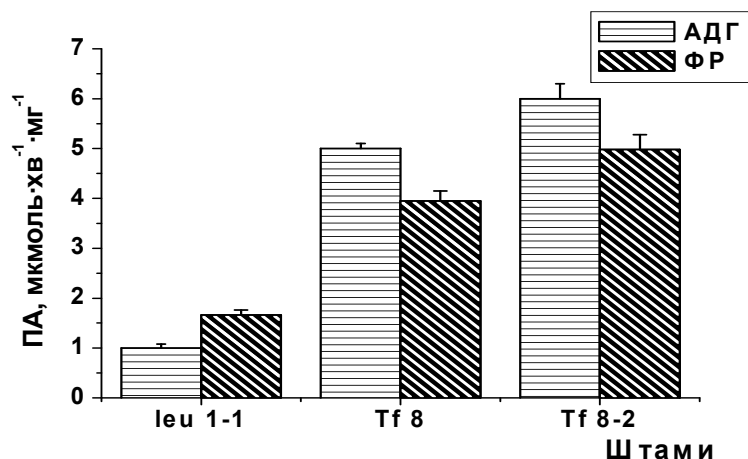


Рис. 4. Питомі активності АДГ і ФР в безклітинних екстрактах штамів *H. polymorpha leu1-1* та його трансформантів *Tf 8*, *Tf 8-2*, вирощених на середовищі з 1% Glc.

Fig. 4. Activities of ADH and FR in the cell-free extracts of *H. polymorpha leu1-1* and its transformants *Tf 8*, *Tf 8-2* strains, grown in the medium with 1% Glc.

У результаті виконання роботи отримано рекомбінантні штами термотолерантних метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* з підвищеною продукцією формальдегідредуктази. Показано, що одержані трансформанти, резистентні до підвищених концентрацій формальдегіду — до 10 мМ. Сконструйовані штами є перспективними організмами для біоремедіації, для використання в цілях аналітичної біотехнології, а також можуть служити джерелом виділення та очистки ФР та АДГ.

Автор висловлює подяку канд. біол. наук Ю.В. Ребцю за допомогу у проведенні експериментальної частини роботи, а також проф. М.В. Гончару за забезпечення фінансової підтримки даної роботи.

С.Я. Парижак

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,
ул. Пекарская, 69 (Шимзеров, 1), Львов, 79010, Украина,
тел.: +38 (032) 275 49 66, e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ – СВЕРХПРОДУЦЕНТОВ ФОРМАЛЬДЕГИДРЕДУКТАЗЫ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

Реферат

Целью данной работы было получить рекомбинантные штаммы термотолерантных метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* сверхпродуцентов формальдегидредуктазы (ФР), которые могут иметь биоаналитическое использование. **Методы.** Дрожжи выращивали на синтетической среде Беркгольдера следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; со стандартным содержанием микроэлементов и 0,05% (в/о) дрожжевого экстракта. Источником углерода служили 1% (в/о) глюкоза или 1% метанол (по объему). Активности ферментов в бесклеточных экстрактах определяли спектрофотометрически (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм по скорости образования НАДН – для алкогольдегидрогеназы (АДГ) – или его потребления для формальдегидредуктазы (ФР), при комнатной (20–25 °С) температуре. Активность (А) для каждого фермента (в мкмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка) вычисляли по формуле: $A = A_{+\text{субстрат}} - A_{-\text{субстрат}}$, учитывающей неспецифические фоновые реакции. **Результаты.** Сконструирована плазида экспрессии p21Sc21, содержащая ген ADH1 *Saccharomyces cerevisiae*, под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP1) *H. polymorpha*. Дрожжевые клетки *H. polymorpha* NCYC 495 (leu1-1) трансформировали методом электропорации. Отбор интегрантов осуществляли по устойчивости к зеоцину. Наличие в геноме трансформантов рекомбинантной плазмиды, содержащей ген ADH1 *S. cerevisiae*, проверяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). **Выводы.** Рекомбинантные штаммы характеризовались в 4–6 раз высшей активностью алкогольдегидрогеназы (АДГ) и в 2–3 раза высшей активностью формальдегидредуктазы в бесклеточных экстрактах по сравнению с исходным штаммом. Стабильные трансформанты оказались резистентными к повышенным концентрациям формальдегида (до 10 мМ) в ростовой метанольной среде.

Ключевые слова: формальдегидредуктаза, метилотрофные дрожжи *Hansenula polymorpha*, формальдегид, генно-инженерное конструирование.



UDC 579.222:577.152.1:577.218:661.727.1

S.Ya. Paryzhak

Lviv Danylo Halytsky National Medical University,
69, Pekarska str. (1, Shimzeriv str.), Lviv, 79010, Ukraine, tel.: +38 (032)275 49 66,
e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

CONSTRUCTION OF METHYLOTROPHIC YEAST *HANSENULA POLYMORPHA* STRAINS OVERPRODUCING FORMALDEHYDE REDUCTASE

Summary

The aim of the presented work was to obtain recombinant strains of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* overproducing formaldehyde reductase (FR) which could be used bioanalytically. **Methods.** The yeast cells were grown in a synthetic Burkholder medium containing the following (g/l): KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; CaCl_2 – 0.1; with the standard content of trace elements and 0.05% (wt/vol) yeast extract. 1% (wt/vol) glucose or 1% methanol (vol/vol) served as the sources of carbon. Enzyme activities in the cell-free extracts were determined by spectrophotometry (Shimadzu-UV-1650) at 340 nm by the rates of NADH formation for alcohol dehydrogenase (ADH), or NADH uptake for formaldehyde reductase (FR) at room temperature (20–25 °C). The activity (A) for each enzyme (in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) was calculated by the formula: $A = A_{+\text{substrate}} - A_{-\text{substrate}}$, taking into account the nonspecific background reactions. **Results.** We constructed the expression plasmid p21ADH1Sc contained ADH1 *Saccharomyces cerevisiae* gene under the strong constitutive promoter of the *H. polymorpha glyceraldehyde* 3-phosphate dehydrogenase gene (GAP1). *H. polymorpha* NCYC 495 (leu1-1) yeast cells were transformed by electroporation. Selection of the integrants was carried out in accordance with their resistance to zeocine. Presence of the recombinant plasmid, containing the ADH1 *S. cerevisiae* gene, in genome of transformants was checked using polymerase chain reaction (PCR). **Conclusions.** Recombinant strains were characterized by 4–6 times higher activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and 2–3 times higher activity of FR in cell-free extracts, compared to the parental strain. Stable transformants have elevated resistance to formaldehyde (up to 10 mM) in methanol containing medium.

Key words: formaldehyde reductase, methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, formaldehyde, gene-based construction.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Демків О.М., Парижак С.Я., Красовська О.С., Стасик О.В., Гайда Г.З., Сибірний А.А., Гончар М.В. Конструювання штамів — над-продуцентів формальдегіддегідрогенази метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, № 6. — С. 525—530.
2. Демків О.М., Парижак С.Я., Ищук Е.П., Гайда Г.З. Гончар М.В. Активности ферментов катаболизма формальдегида у рекомбинантних штаммов *Hansenula polymorpha* // Микробиологія. — 2011. — Т. 80, № 3. — С. 301—307.
3. De Smidt O., du Preez J.C., Albertyn J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review // FEMS Yeast Res. — 2008. — 8, № 7. — P. 967—978.
4. Faber K.N., Haima P., Harder W., Veenhuis M., Geert A.B. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* // Curr. Genet. — 1994. — 25. — P. 305—310.
5. Grey M., Schmidt M., Brendel M. Overexpression of *ADH1* confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. — 1996. — 29. — P. 437—440.
6. Leskovic V., Trivic S., Pericin D. The three Zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. — 2002. — 2. — P. 481—494.
7. Lu K., Collins L.B., Ru H., Bermudez E., Swenberg J.A. Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia // Toxicol. Sci. — 2010. — 116. — P. 441—451.
8. Paryzhak S., Shchoholeva M., Rebets Y., Gonchar M. Construction of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strains overproducing formaldehyde reductase // 12th International Congress on Yeasts (Kyiv, 11-15 August, 2008). — Kyiv, 2008. — P. 269.
9. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning, a laboratory manual. — 3rd ed. — Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, 2001. — 450 p.
10. Tang X., Bai Y., Duong A., Smith M.T., Li L., Zhang L. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects // Environment. International. — 2009. — 35, № 8. — P. 1210—1224.
11. Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism // Chemical Record. — 2005. — 5, № 6. — P. 367—37.
12. Yurimoto H., Oku M., Sakai Y. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis [Electronic resource] // Int. J. Microbiol. — 2011. — Online article available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/101298>.

Стаття надійшла до редакції 15.07.2013 р.

