

Ekstrem Termofilik Mikroorganizmalar ve Biyoteknolojide Uygulama Olanakları(*)

Yrd. Doç. Dr. Sedat DÖNMEZ

A.Ü. Ziraat Fakültesi, T.Ü.T. Bölümü — ANKARA

1. Giriş

Mikrobiyologlar uzun yıllar, genellikle toprak, gıda ve hastalık etkeni mikroorganizmalarla ilgilenmişlerdir. Ancak son 20 yıldır, karasal ve deniz dibi volkanik ve jeotermal bölgeler, sıcak su kaynakları, kompost ve kömür yığınları gibi doğal ve kendiliğinden ısınmış bölgelerdeki mikroorganizmalarla da ilgilenmektedirler. Böyle bölgelerden alınan su ve toprak örneklerinden alışılmamış, yüksek sıcaklık derecelerinde gelişebilen mikroorganizmalar izole edilip tanılanmıştır. Bu bakterilerden bazılarının 45 - 75°C sıcaklıklarda optimum olarak geliştikleri, üst gelişme sınırlarının ise 80 - 100°C'ye kadar ulaşabildiği saptanmıştır (1, 2). Bu tip bakterilerin ilk örneklerinden biri 75°C ve daha yüksek sıcaklıklarda gelişebilen *Clostridium thermohydrosulfuricum*'dur (3,

4). Deniz dibi sıcak sediment ve su örneklerinden izole edilen ve optimum olarak 100°C' de gelişebilen *Pyrococcus furiosus* ile gelişme optimumu 105°C olan *Pyrodictium occultum* diğer örneklerdir (1, 2, 5). Son 10 yılda, doğal sıcak bölgelerdeki mikroorganizma popülasyonu üzerindeki çalışmalar artmıştır. Batı Pasifik'de, deniz gibi termal su ve sediment örneklerinden 250°C sıcaklığa kadar gelişebilen organizmaların bulunduğu açıklanmış ancak daha sonraki çalışmalarda bu sonucun yanlış uygulamalardan ileri gelen bulgular olduğu anlaşılmıştır (6, 7).

Yüksek sıcaklık derecelerinde gelişen bakteriler, taksonomik önem taşımamakla birlikte kardinal sıcaklık derecelerine göre kendi aralarında Tablo 1'deki gibi 5 grup altında toplanmaktadır (8).

Tablo 1. Sıcaklık isteklerine göre termofil bakterilerinin sınıflanması (8,16) Kardinal Sıcaklık (°C)

Teknik Terim	Min.	Opt.	Maks.
Termotolerant	< 30		
Fakültatif Termofil		≥ 45-55	≥ 45-65 (70)
İlımlı Termofil (Moderate Termofil)			< 45
Termofil	≥ 30-40	< 45	< 70-75
Ekstrem Termofil (Caldoactive)	≥ 40	≥ 65	≥ 70-90

Tablo 1'den anlaşılacağı gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilen ve termofil olarak isimlendirilen bakteriler mezobiyotik koşullarda aktif değildirler ve gelişmeleri için yüksek sıcaklık derecelerine gerek duymaktadırlar. Bunlardan, maksimum sıcaklık istekleri 70°C'den yüksek olanları bazı araştırmacılar «Caldoactive» bazıla-

rı ise «Ekstrem Termofil» bakteriler olarak adlandırmışlardır (9, 10).

Yüksek sıcaklık derecelerinde gelişen bakterilerin çoğu bilinen cins ve türlere dahildirler, ancak sınıflamalarında henüz belirsizlikler vardır. Önceleri bunlar prokaryotiklerin bir alt grubu olarak sınıflanmışlardır. Daha sonra, ekstrem termofillerin nükleotid dizileri ve bazı biyokimyasal özelliklerinin Eubakteriler ve Eukaryotlardan değişiklikler gösterdikleri sap-

*) 5. Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel Mikrobiyoloji (KÜKEM) Kongresinde Tebliğ olarak sunulmuştur.

tanmıştır. Özellikle membran lipitleri ve DNA-bağlı RNA-polimeraz yapılarının Eü- ve Prokaryotlar'dan değişiklikler göstermeleri nedeniyle bunlar 3. organizmalar grubu olarak sınıflanmış ve «Archaeobacter»ler olarak adlandırılmışlardır. Karasal ve deniz gibi, volkanik ve hidrotermal bölgelerin ilk «Archaik» zamanlardan beri var oldukları kabul edildiğinden ve pek çok ekstrem termofil bakterinin bu bölgelerden izole edilmiş olması nedeniyle, bunlara Archaeobacter'ler adı verilmiştir (1, 10, 11). Archaeobacter'ler bazı araştırmacılara göre Exstrem Halofiller, Metanogen'ler ve Sulfolobalesleri de içeren Thermoproteales'ler olarak 3. bazı araştırmacılara göre de Ekstrem Halofiller (Metanogenler'de dahil) ve Sulfolobales'ler (Thermoproteales'ler

dahil) olmak üzere iki grup yada Ordo altında toplanmışlardır (1, 11).

Exstrem termofilik bakterilerin beslenme durumları Tablo 2'de görüldüğü gibi mezofiliğe bakterilerinkine benzemektedir. Bunlar arasında fototrof (**Chloroflexus**), kemoototrof (**Methanobacterium thermoautotrophicum**), kemo-heterotrof (**Thermoanaerobium brockii**), hem heterotrof hemde ototrof olarak gelişebilen mikсотrof (**Sulfolobus acidocaldarius**) lara rastlanmaktadır, ancak moleküler mekanizma değişikdir (1, 10). Morfolojik olarak, bunlarda da mezofillerdeki gibi gram pozitif/negatif, spor oluşturan veya oluşturmayan, aerobik/anaerobik, asidofil veya notrofil, spiral, silindirik ve oval şekiller mevcuttur (1, 10).

Tablo 2. Bazı termofil bakterilerin maksimum gelişme sıcaklıkları ve Beslenme Özellikleri (10).

	Maksimum Gelişme Sıcaklığı (°C)	Beslenme Durumu
Aerobik ve Fakültatif Aerobikler		
<i>Bacillus stearothermophilis</i>	70-80	Kemoheterotrof
<i>B. acidocaldarius</i>	70	"
<i>B. caldotenax</i>	85	"
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	70	"
<i>Thermus aquaticus</i>	79	"
<i>Thermomicrobium roseum</i>	85	"
<i>Sulpholobus acidocaldarius</i>	85-90	Kemomiksotrof
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	70-83	Fototrof
<i>Synechococcus lividus</i>	70-7b	Fototrof
Meçburi anaerobikler		
<i>Clostridium thermocellum</i>	70	Kemoheterotrof
<i>C. thermohydrosulphuricum</i>	76	"
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	75	"
<i>Desulphovibrio thermophilus</i>	85	Kemomiksotrof
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	70-74	"
		Ototrof

Termofilik bakteriler, çok değişik enerji ve karbon kaynakları üzerinde gelişebilirler. Bunlar, doğada çok bulunan biopolimerler, şekerler, polipeptidler, aminoasitler, alkoller, karboksilik asitler, hidro karbonlar, aromatikler, CO, H₂ gibi gazlar ve kükürt gibi inorganik elementlerdir.

Pek çok organik bileşiği yıkıma uğratabilen termofilik anaerobik bakterilerin son ürünleri genel olarak; etil alkol, asetik, laktik ve bütirik asitlerle, metan, H₂ ve CO₂'dir.

2. Ekstrem Termofil Bakterilerin Teknolojik Özellikleri :

Termofilik bakteriler, yüksek gelişme ve metabolizma hızları, düşük hücre verimleri, yüksek stabilite v.b. özellikleri ile mezofilik bakterilere üstünlük sağlamaktadırlar (1, 12, 13).

Gelişme sıcaklıklarının yüksek olması, substratın viskozitesini azaltmakta buna bağlı olarak fermantasyonda karıştırma etkinliği ve katı - sıvı ayırımı hızlanmaktadır. Yüksek sıcaklık derecelerinde, mezofilik koşullardakine göre reaksiyon hızındaki artış ile verimlilik bir dereceye kadar artmakta ancak bu artış Q₁₀ kuralına göre olmamaktadır (8). Isıtma işlemi soğutmaya göre daha ucuz ve kolay bir işlem olduğu için ekstrem termofillerin kütleli üretimlerinin (mass cultivation) mezofillere göre daha ucuz olacağı kesindir. Yüksek sıcaklıklarda gelişen mikroorganizmaların, gelişme ve reaksiyon hızları sıcaklık kontrolü ile yapılabilir gibi, kontaminasyon olasılığı da azalacaktır. Ekstrem termofil mikroorganizma ve enzimlerinin, yüksek stabilitelerinden ileri gelen kullanım sürelerinin uzunluğu, brim maliyette azalma gösterecektir. Bu özellik; immobilize hücre ve enzim sistemlerinde maliyete doğrudan etkili olmaktadır (8). Termofilik enzimler, oda sıcaklığında stabilitelerini kaybetmediklerinden, mezofilik enzim çalışmalarında olduğu gibi soğutulmuş odalara gerek duyulmayacaktır. Ayrıca termofilik enzimlerin deterjan ve organik çözücülere daha dayanıklı oldukları saptanmıştır (8, 14, 15). Yüksek sıcaklık, hem ürünün geri alınmasını hem de buharlaşabilen organik inhibitörlerin, kolayca ortamdan uzaklaşmasını sağlayacaktır. Bütün bunlardan başka, yüksek sıcaklık oksijenin besiyerindeki çö-

zünürlüğünü azaltacağından, anaerobik ortam oluşması kolaylaşacaktır. Ayrıca ekstrem termofillerin patojenik olmamaları da ayrı bir avantaj sağlamaktadır (8, 13, 16, 17).

3. Biyoteknolojik Uygulama Olanakları :

Ekstrem termofilik bakteriler, belirtilen teknik özellikleri ve çok geniş substrat spektrumlarından dolayı özellikle etanol, bazı asit, enzimler ve kimyasal maddelerin üretiminde kullanılabilirler. Bunlar aşağıda sırası ile incelenmiştir.

a. Etanol Üretimi :

Bakteriyel fermantasyonlarla etanol üretiminin mezofilik bakteri ve mayalara göre pek çok üstünlükleri vardır. Bazı ekstrem termofiller selülozu yıkıma uğratabildiği gibi, bazıları da delignifiye biyomasların hemiselülozik ve selülozik bileşenlerini doğrudan etanole fermente edebilirler. Ekstrem termofilik fermantasyon koşullarında, fermantasyon kontrolünün kolaylığı yanında fermantörlerden oluşan ürün, uygulaması olası vakumla kolay ve ucuz olarak alınabilmektedir (18). Zamanımızda biyoetanol üretiminde yaygın olarak maya'lar ve azda olsa *Zymomonas* bakterileri kullanılmaktadır. Ancak çok dar substrat aralığı, yüksek biomas verimi ve mezofilik koşullarda kontaminasyon olasılığının yüksekliği yüzünden, özellikle ligno selülozlu artıklardan etanol üretiminde ekstrem termofil bakterilerin kullanılmasını, bazı problemler çözülmürse olası kılacaktır. Bu amaçla denenen *Clostridium thermohydrosulfuricum* ve *Thermoanaerobacter ethanolicus* bakterileriyle laboratuvar ölçeğinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Bunlar pentoz ve hegzozlar yanında, asetik fosfat, asetik koenzim-A ve pirüvik asite kadar metabolize olabilen bütün maddelerden teorik olarak etanol üretebilmektedirler (16, 31, 32, 33, 37). Yapılan bir başka çalışmada bir selülitik ekstrem termofil *Clostridium thermocellum*'un hem *Clostridium thermohydrosulfuricum* hem de *Clostridium thermosaccharolyticum* karışık kültürleri ile üğütülmüş mısır koçanlarını, delignifiye edilmiş odun pentoz ve hegzozlarını aktif olarak etanole fermente etmişlerdir. Ayrıca monokültürlerinde hiç bir suş ksilanı fermente edemediği halde, karışık kültürler ksilan yanında glukanda parçalayabilmiş, kar-

şık kültürlerde verimlilik tekkültürlerin iki katı olmuştur (19, 20, 21, 22, 29).

Tablo 3'de bazı termofilik ve ekstrem termofilik bakterilerin etanol verimleri görülmektedir. *Cl. thermohydrosulfuricum* çözünür ve çözünmez nişastayı da fermente etme yetene-

ğindedir (30). Optimum gelişme sıcaklığı 68 - 70°C olan *Thermoanaerobacter ethanolyucus* ile glikoz'dan 1.72 - 1.90 mol. verimle etanol elde edilmiştir (13, 26). Bu oran *Cl. thermohydrosulfuricum* da 1.6 - 1.90 mol. olarak bildirilmiştir (4).

Tablo 3. Bazı Ekstrem Termofil Bakterilerin Etanol Verimleri (mM Etanol/mM Tüketilen Glikoz)

Organizma	Verim	Kaynak
<i>Clostridium thermohydrosulphuricum</i>	1.60-1.90	16,17
<i>Thermoanaerobacter ethanolyucus</i>	1.90	34
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	0.95	35
<i>Cl. thermosaccharolyticum</i>	1.10	16
<i>Zymomonas mobilis</i> (syn. <i>anaerobica</i>)	1.90	38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.00	

Çok çeşitli substratlardan mayalarınkine yakın bir verimle etanol oluşturabilen ekstrem termofillerin, düşük etanol konsantrasyonunun toksik etkisi (% 2) ve zaman zaman oluşabilen önemli oranlardaki laktat dezavantajlarıdır (16). Yapılan çalışmalarda, % 8 etanol konsantrasyonunda gelişebilen *Clostridium thermohydrosulfuricum* mutantları elde edilmesine karşın bunların etanol üretim oranları düşük bulunmuştur (23). Ekstrem termofillerin fizyolojileri ve genetik yapıları henüz tam olarak bilinmediğinden laktat negatif mutantları elde edilememiştir. Sonuç olarak, fermantasyon teknolojisi ve genetik mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte yüksek oranlardaki etanole dayanıklı ve organik asit oluşturmayan yüksek verimli suş ve mutantların bulunması ile yakın gelecekte ekstrem termofil bakterilerin biyoetanol üretiminde kullanılabilecekleri umulmaktadır.

b. Organik Asitler Üretimi :

Termofilik etilalkol üretiminde oluşan yan ürünlerden en önemlisi asetik asittir. Miktarı, kültür koşullarına bağlı olarak değişmekte fakat oluşan etanol miktarını aşmamaktadır. *Clostridium thermoaceticum* asetik asit üretimi için en uygun ekstrem termofilik bakteridir. Homofermantatif olan bu bakteri 1 mol glikoz-

dan 3 mol asetik asit üretmektedir. Hegsozlar ve pentozları parçalayabilen *Cl. thermoaceticum*'un lignoselülitik artıkların hidroliz ürünlerinden 20 g/l. oranında asetik asit üretebildiği bildirilmiştir. Halen, son ürünün düşük konsantrasyonlardaki inhibisyon etkisi çözümlenmediğinden endüstriyel üretimde kullanılmaktadır (8). H_2/CO_2 metabolizması ile asetik asit üreten ekstrem termofil bakteriler üzerindeki çalışmalar ise sürdürülmektedir (17).

Diğer organik asitlerden, laktik ve butirik asitler de ekstrem termofil bakterilerin etanol fermantasyonu yan ürünleridir. *Thermobacterioides acetoethylicus* suşları dışında bütün etanol üreten ekstrem termofiller laktat oluşturmaktadırlar. *Thermoanaerobium brockii*'de verim kullanılan mol. glikoz esas alınarak 0.84 mol, selüloz ve nişastadan ise 1.52 mol olarak saptanmıştır. Endüstriyel üretimde kullanılabilen *Lactobacillus casei*'de ise bu oran 1.60 mol'dur. Ancak, ekstrem termofillerle endüstriyel olarak laktik asit üretimi henüz yapılmamaktadır (8, 17, 35).

c. Enzim Üretimi :

Spor oluşturan termofil bakterilerin, değişen oranlarda çeşitli enzimler ürettikleri öteden beri bilinmektedir (23).

Bu enzimlerden en önemlileri termostabil proteazlardır. *Bacillus thermoproteolyticus* suşundan izole edilen bir proteaz'ın 70°C'de ve 30 saatte aktivitesinin sadece % 14 ünü kaybettiği açıklanmıştır (8). Ancak bu bakteriye hiçbir kültür koleksiyonunda rastlanamamaktadır. *Bacillus licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* suşları da bu amaçla kullanılabilen diğer bakterilerdir. Optimum olarak 55°C'de gelişen *Thermoactinomyces vulgaris*'den elde edilen proteazın, 60 - 80°C arasında maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (8). Bir ekstrem termofil *Thermus* suşunun

ise 4 - 12 pH arasında 75°C'ye kadar aktif kalabilen proteaz ürettiği ve bu enzimin yarı ömrünün 80°C'de 30 saat olduğu açıklanmıştır (8).

Termofilik amilazlar'da önemli bir endüstriyel enzimdir. Bu enzim termofilik, *Bacillus caldolyticus* ve *Bacillus stearothermophilus*'lerden kullanılan substrata göre değişen oranlarda elde edilebilmektedir. Bazı mikrobiyel α - amilazların özellikleri Tablo 4'de görülmektedir. Tabloda görüldüğü gibi ekstrem termofil suşların α - amilazlarının optimumları mesofillerden en az 5°C daha fazladır.

Tablo 4. Mikrobiyal-amilazların bazı özellikleri (40).

Enzim Kaynağı	pH aralığı ^a	Sıcaklık (°C) ^b	Stabilite (°C) ^c
<i>Aspergillus oryzae</i>	4-6	55	50
<i>Bacillus subtilis</i> NA 64	5-7	55	50
<i>B. amyloliquefaciens</i> F	5-9	65	45
<i>B. stearothermophilus</i>			
Donk, B. Ş. 1 suşu	5-6	65	50
1503-4	5,4-6,1	55	55 (-Ca ⁺⁺) 60 (+Ca ⁺⁺)
<i>Bacillus</i> sp. 11-1 S	1,5-4,0	70	60
<i>B. acidocaldarius</i> 68	2-6	75	60
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	5-10	90	75

a) Yaklaşık % 80 aktivitenin gözleendiği pH aralığı

b) Normal deney koşulları altında maksimum aktivitenin gözleendiği sıcaklık

c) Enzimin 30 ısıtıldığında aktivitesinin % 90'ının ahkonduğu sıcaklık derecesi.

Son yapılan çalışmalarda, yeni izole edilen bir termofilik *Clostridium* suşundan 60°C ve 5 pH'da 5 gün daha uzun süre aktif kalabilen bir pullulanaz enziminin izole edildiği açıklanmıştır (24). *Thermoanaerobium* (TOK 6-BI) suşunda elde edilen ekstraselüler pullulanaz ise 80°C'de aktivitesini korumuş ve 80°C'den yüksekte denatüre olmuştur. Yarı ömrü ise, 90°C'de 5 dakikadır (39).

Termofilik selüloz'lar da önemli enzimlerden birisidir. *Clostridium thermocellum*'dan izole edilen selülaz'ın 70°C'de 45'den uzun süre stabilitesini koruduğu, bildirilmiştir (14, 36).

Cl. thermocellum selülazının termostabil ve bakterinin gelişme hızının yüksek olmasından dolayı selülaz üreten *Trichoderma viride* gibi mezofilik küflere göre, selülaz üretimi için daha uygundur.

Çok geniş bir substrat spektrumu olan *Thermoanaerobacter brockii* alkol dehidrogenazı'da önemli termostabil enzimlerdendir. Aktivitesini 60°C'ye kadar olan sıcaklıklarda bile koruyan bu enzim düz ve dallı zincirli alkollere olduğu kadar, linear ve siklik ketonlarda aynı derecede etkili olmuştur (25). Bu ekstrem termofil bakteri alkol dehidrogenazı, kolayca im-

mobilize edilmiş ve analitik amaçlarla kullanılan enzim elektrotlarında 2 haftadan uzun süre stabil kaldığı açıklanmıştır.

Thermoanaerobium ethanolycus alkol dehidrogenazı ise 95°C maksimum aktivite göstermiş, 70°C de 2 günden uzun süre stabil kalmış ve 80°C de çok az denature olmuştur (8). Bu enzim ticari olarak üretilmektedir.

Clostridium thermoace ticum hidrogenazının 95°C ye kadar olan sıcaklıklarda aktif kalmadığı bildirildiği **Methanobacterium thermoautotrophicum** hidrogenazının ise enzimlerle katalize edilen bazı ticari organik sentezlerde NAD (p) H regenerasyonu için kullanıldığı açıklanmıştır (8).

Bunlardan başka, analitik testlerde kullanılan Glikokinaz ve Glikoz -6-P Dehidrogenaz üretiminde **Thermus thermophilus**; oksido-reduktazlar üretiminde **Caldaria acidophila**; stereospesifik asparaginaz üretiminde **Thermus T-391 suşu**; Metilaz üretiminde **Thermus thermophilus** veya diğer **Thermus** suşları kullanılabilir. Ancak endüstriyel olarak sadece bir kaçının üretildiği bilinmektedir (8).

d. Diğer Maddeler :

Etanol, enzimler ve organik asitlerden başka ekstrem termofillerden bir kaç, bazı kimyasal maddeler üretiminde kullanılmaktadır. Örneğin, ABD'de yaygın bir gıda katkı maddesi olarak kullanılan ve halen kimyasal sentezle elde edilen «Propandiol» (R (-) -1,2-Propanediol) ve aseton'un **Clostridium thermosaccharolyticum**'larla fermentasyonlarla elde edilebileceği bildirilmektedir (39).

Metan oluşumunun, 1980 yıllarına kadar mezofilik sıcaklıklarda olduğu sanılmış ancak hem metan oluşturmaları hemde gelişmeleri için maksimum sıcaklık isteği 97°C olan **Methanothermobacter feravidus**'un izole edilmesi, ayrıca deniz dibi su örneklerinde metan saptan-

ması bu fikrin doğru olmadığını ortaya koymuştur (27, 28). Buna karşın ekstrem termofil metanogenlerin kesin ototrofik olmaları (CO₂/H₂ yi enerji ve karbon kaynağı olarak kullanmaları) endüstriyel metan üretiminde uygulamalarını kısıtlamaktadır.

Pek çok uygulamaları yanında, ekstrem termofilik bakteriler metanolden tek hücre protein üretiminde enerji yoğun soğutma işlemine gerek göstermediği için uygulanabilirler; kömürden kükürtlü bileşiklerin ayrılmasında da bir ekstrem termofil Archaeobakter olan **Sulfolobus acidocaldarius**'in kullanılabilmesi, laboratuvar çalışmalarında ortaya konmuştur (8).

4. Sonuç :

Bütün bunlardan anlaşılacağı gibi ekstrem termofiller uygun özelliklerden dolayı biyoteknolojik üretimlerde kullanılabilirler.

Pek çok mezofil ve termofil bakteriden etanol, bazı organik asitler ve enzimler üretilebilmektedir. Buna karşın yeterli verim, bazı suşlarla elde edilebilmektedir. Ancak, bu derlemeden de anlaşılacağı gibi termofil ve ekstrem termofil bakterilerin asitler, enzimler ve özellikle çeşitli biyolojik kaynaklardan etanol üretme potansiyeli vardır. Etanol üretimi için en uygun mikroorganizmanın doğada saklı olduğu ve bu «süper bakterinin» ekstrem termofil olduğu sanılmaktadır.

Doğadaki ekstrem bölgelerden izole edilip tanımlanan ekstrem termofil bakterilerin fizyolojileri, genetiksel özellikleri ve regülasyon mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, yakın gelecekte bunların endüstriyel üretimlerde kullanımını arttıracaktır.

Ayrıca, fermentasyon teknolojisindeki yeni gelişmeler ve klasik genetik teknikler yanında; seleksiyon, mutasyon ve rekombinant DNA teknolojisi ile verimli ve uygun suşlarla, ekstrem termofillerin biyoteknolojik uygulamaları daha da yaygınlaşacaktır.

KAYNAKLAR

1. STETTER, K. O., *Naturwissenschaften* 72 291 (1985).
2. STETTER, K. O., : *Nature* 300, 258 (1982).
3. HOLLAUS, F. and SLEYTER, U. : *Arch. Microbiol.* 86, 129 (1972).
4. WIEGEL, J., LJUNGDAHL, L. G. and RAWSON, J. R. : *Bacterol.* : 139, 800 (1979).
5. FIALA, G. and STETTER, K. O. : *Arch. Microbiol.* 145, 56 (1986).
6. BAROSS, J. A. and DEMING, J. W. : *Nature* 300, 423 (1983).
7. TRENT, J.D. CHASTAIN, R. A. : *Nature* 307, 437 (1984).
8. SONNLEITNER, B. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. Microbial Activities.* Ed. A. FIECHTER. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Toronto, 1983.
9. BELKIN, S. and JANNASCH, H. W. : *Arch. Microbiol.* 141, 181 (1985).
10. ZEIKUS, J. G. : *Enzyme Microbiol. Technol.* 1, 243 (1979).
11. GARRETT, R. A. : *Nature* 318, 233 (1985).
12. ZEIKUS, J. G., BEN-BASSAT, A., THOMAS, K. Ng. and LAMED, R. J. *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals.* Ed. A. HOLLAENDER, and R. RABSON, P. ROGERS, A. SANPIETRO, R. VALENTINE, R. WOLFE. Plenum Press. New York and London, 1981.
13. ESSER, K. and KARSCH, T. : *Process Biochem.* 19, 116 (1984).
14. AIT, N., CREUZET, N. and CATTANEO, J. : *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 90 (2), 537 (1979).
15. TAGUCHI, H., MACHIDA, M., MATSUZAWA, H. and OHTA, T. : *Agric. Biol. Chem.* 49 (2), 359 (1985).
16. WIEGEL, J. : *Experientia* 36, 1434 (1980).
17. ZEIKUS, J. G. : *Ann. Rew. Microbiol.* 34, 423 (1980).
18. CYSEWSKI, G. R. and WILKE, C. R. : *Biotech. Bioeng.* 20, 1421 (1978).
19. WANG, D., COONEY, C. L., WANG, S., GORDON, J. and WANG, G. Y. : *Proc. 2nd. Ann. Symp. Fuels Biomass* 11, 1978.
20. THOMAS, K. NG., BEN-BASSAT, A. and ZEIKUS, J. G. : *App. Env. Microbiol.* 41 (6), 1337 (1981).
21. THOMAS, K. Ng., BEN-BASSAT, A. and ZEIKUS, J. G. : *Proc. Conf. Fundam. Microbial. Process.* Octob. 29, 1979.
22. SADDLER, J. N. and CHAN, M. K-H. : *Can. J. Microb.* 30, 212 (1984).
23. LOWITT, R. W., LONGIN, R. and ZEIKUS, J. G. : *App. Env. Microbiol.* 48 (1), 171 (1984).
24. ANTRANIKIAN, G., HERZBERG, C. and GOTTSCHALK, G. : *App. Env. Microbiol.* 53 (7), 1668 (1987).
25. LAMED, R. J., KEINAN, E. and ZEIKUS, J. G. : *Enzym. Microbiol.* : 3, 144 (1981).
26. CAMERON, D. C. and COONEY, C. L. : *Bio/Technology* 4, 651 (1986).
27. ZEIKUS, J. G., BEN-BASSAT, A. and HEGGE, P. W. : *J. Bacteriol.* 4, 651 (1986).
28. WINTER, J. and WIEGEL, J. : *Forum Mikrobiologie* 4, 202 (1981).
29. ZERTUCHE, L. and ZALL, R. R. : *Biotech. Bioeng.* 24, 57 (1987).
30. PARKINEN, E. and KORHOLA, M. : *Proc. Third Eur. Cong. on Biotech.* 11-223 (1984).
31. LACIS, L. S. and LAW FORD, H. G. : *J. Bacteriol.* 163 (3), 1275 (1985).
32. WEIMER, P. J. : *Arch. Microbiol.* 143, 130 (1985).
33. KANNAN, V. and MUTHARASAN, V. : *Enzym. Microb. Technol.* 7, 87 (1985).
34. WIEGEL, J. and LJUNGDAHL, L. G. : *Arch. Microbiol.* 128, 343 (1981).
35. ZEIKUS, J. G., HEGGE, P. W. and ANDERSON, M. A. : *Arch. Microbiol.* 122, 41 (1979).
36. REYNOLDS, P. H. S., SISSONS, C. H., DANIEL, R. M. and MORGAN, H. W. : *App. Env. Microbiol.* 51 (1), 12 (1986).
37. GERMAIN, P., TOUKOUROU, F. and DONADUZZI, L. : *App. Microbiol. Biotech.* 24 300 (1986).
38. FEIN, J. E., LAW FORD, H. G., LAW FORD, G. R., ZAMMADSKI, B. C. and CHARLEY, R. C. : *Biotech. Letters* 5, 19 (1983).
39. PLANT, A. R., CLEMENS, R. M., DANIEL, R. M. and MORGAN, H. W. : *Appl. Microbio. Biotechnol.* 26, 427 (1987).
40. WASSERMAN, B. P. : *Food Technology* 38 (2), 78 (1984).