



Możliwości doskonalenia cech technologicznych β -galaktozydazy oraz warunków jej mikrobiologicznej biosyntezy

Włodzimierz Bednarski, Jadwiga Kowalewska-Piontas

Instytut Biotechnologii Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Improvement of β -galactosidase Properties and Conditions for its Microbial Biosynthesis

Summary

We present examples of genetic modification of microorganisms capable of β -galactosidase synthesis. The technological characteristics as thermostability, high activity in a low temperature is improved. We also describe intensification of β -galactosidase secretion to the medium.

Key words:

β -galactosidase, lactose, thermostability, secretion, cloning, recombination.

1. Wprowadzenie

Obecność β -galaktozydazy stwierdzono w komórkach grzybów strzępkowych m.in. *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, w komórkach drożdży, np. *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* oraz w komórkach innych szczepów bakterii z rodzaju *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Aerobacter* oraz *Shigella* (1,2). β -galaktozydaza jest najczęściej enzymem wewnątrzkomórkowym o ciężarze cząsteczkowym od 90 000 do 850 000 daltonów. W zależności od rodzaju drobnoustrojów stosowanych do jej biosyntezy różni się właściwościami, np. optimum pH, temperatury, aktywnością oraz stabilnością. β -galakto-

Adres do korespondencji

Włodzimierz Bednarski,
Instytut Biotechnologii
Żywności,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Heweliusza 1,
10-718 Olsztyn.

biotechnologia

2 (49) 131-141 2000

zydadę stosuje się w technologii produkcji mleka bezlaktozowego z przeznaczeniem głównie dla niemowląt i dzieci nie tolerujących laktozy.

Ważnym kierunkiem zastosowania β -galaktozydazy jest hydroliza laktozy w serwatce lub permeacie pozostającym po ultrafiltracji mleka.

W nowoczesnych rozwiązaniach technicznych dominuje stosowanie β -galaktozydazy unieruchomionej na różnych nośnikach, np. szkle porowatym, celulozie lub żywicach syntetycznych (1,2). O wydajności immobilizacji β -galaktozydazy decydują jej właściwości, np. stabilność termiczna, tolerancja na zmiany kwasowości środowiska itp. (2). Postęp w inżynierii genetycznej sprawia, że istnieją możliwości doskonalenia cech osobniczych mikroorganizmów, producentów β -galaktozydazy z uwzględnieniem wymagań bioinżynieryjnych i technologicznych stosowania enzymów w skali przemysłowej (3-5).

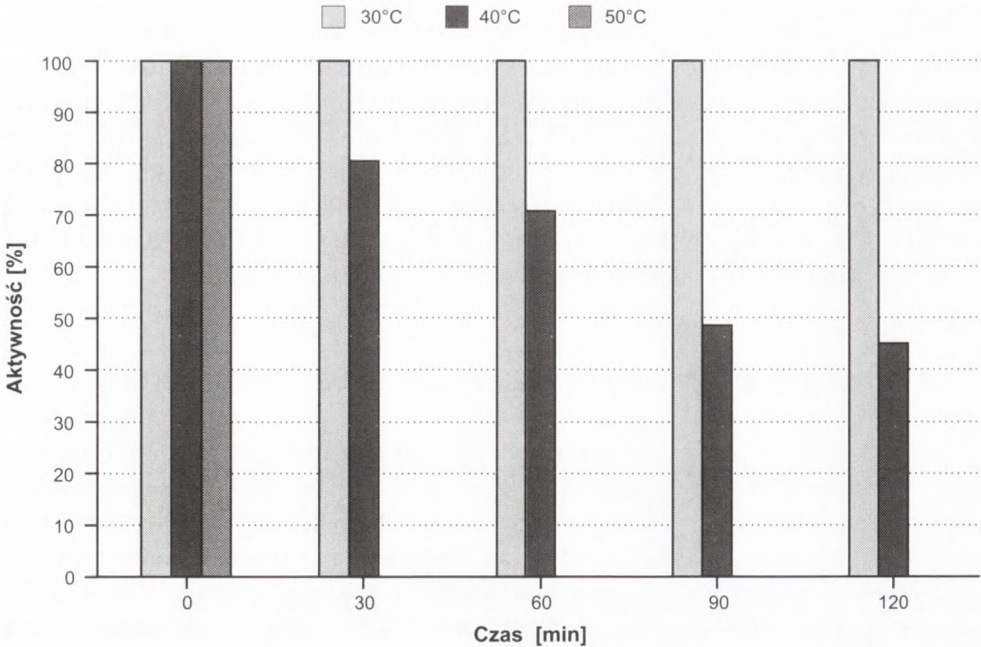
W opracowaniu na podstawie wyników badań innych autorów oraz częściowo własnych przedstawione będą przykłady potrzeb technologicznych i możliwości genetycznego doskonalenia mikroorganizmów syntetyzujących β -galaktozydazę oraz warunków jej biosyntezy.

2. Doskonalenie genetyczne mikroorganizmów syntetyzujących β -galaktozydazę

2.1. Biosynteza β -galaktozydazy aktywnej w szerokim zakresie temperatury

Producentami znanych handlowych preparatów β -galaktozydazy, stosowanych w hydrolizie laktozy w mleku lub w serwatce są mikroorganizmy mezofilne. Ich aktywność enzymatyczna w dużym stopniu zależy od temperatury. Najwyższy stopień hydrolizy laktozy uzyskuje się prowadząc proces w zakresie temperatur 30-60°C. Z naszych doświadczeń prowadzonych w skali przemysłowej wynika, że hydrolizę laktozy w mleku korzystniej jest ze względów technologicznych prowadzić w temperaturze około 10°C niż w 37°C. Zastosowanie przez nas preparatu β -galaktozydazy „Lactase” do hydrolizy laktozy w mleku ochłodzonym do 10°C wymagało około 24 godzin do uzyskania stopnia hydrolizy laktozy – minimum 80% (dane nie publikowane). Uwzględniając aspekty technologiczne oraz energochłonność procesu zwiększa się zainteresowanie preparatami β -galaktozydazy aktywnej w środowisku o temperaturze poniżej 20°C.

W poszukiwaniu mikroorganizmów syntetyzujących β -galaktozydazę spełniającą te wymagania uwagę zwrócono na drobnoustroje psychrotrofowe. Ostatnio opublikowano kilka prac dotyczących mikrobiologicznej biosyntezy β -galaktozydazy przez organizmy psychrotrofowe o wysokiej aktywności hydrolizy laktozy w mleku o temperaturze poniżej 10°C (6-8). Z badań Trimbura i wsp. (8) oraz Lovelanda i wsp. (6) wynika, że organizmami syntetyzującymi β -galaktozydazę aktywną w temperaturze



Rys. 1. Termostabilność β -galaktozydazy z modyfikowanego genetycznie szczepu *E. coli* B7. Enzym inkubowano w buforze Z w temp. 50, 40 i 30°C. Aktywność oznaczano testem z ONPG w 30°C. Opracowano na podstawie danych z pracy Trimbur i wsp. (8).

poniżej 10°C są trzy szczepy *Arthrobacter* wyizolowane z gleby, którą wcześniej spryskiwano serwatką. Szczepy te są względnymi tlenowcami, nie produkują kwasów w pożywce z glukozą, rozwijają się w temperaturze około 0°C, ale nie tworzą kolonii w temperaturze powyżej 30°C (8). β -galaktozydaza syntetyzowana przez *Arthrobacter* aktywnie hydrolizuje laktozę w mleku ochłodzonym do 8°C. Po szczegółowych badaniach właściwości β -galaktozydazy i genomu jej producenta przeprowadzono klonowanie genów β -galaktozydazy z *Arthrobacter* u bakterii *E. coli* JM109 i MC1061 (8). Modyfikowane genetycznie szczepy *E. coli* syntetyzowały β -galaktozydazę aktywną w środowisku o temperaturze od 4 do 60°C (8). Otrzymana β -galaktozydaza była stabilna termicznie. Jej aktywność nie zmieniała się podczas przetrzymywania w 30°C lub niższej (8).

Inkubacja β -galaktozydazy w środowisku o temperaturze 40°C przez 90 min doprowadziła do zredukowania jej aktywności o 50%. W środowisku o temperaturze 50°C całkowitą inaktywację β -galaktozydazy stwierdzono po 10 minutach (rys. 1).

Innym przykładem potwierdzającym możliwość genetycznego doskonalenia biosyntezy β -galaktozydazy aktywnej w temperaturach chłodniczych są wyniki badań Torres i Lee (7). Ich efektem jest sklonowanie genu β -galaktozydazy z *Lactobacillus sake* i wbudowanie do komórek *E. coli* DH 56 (7). W tym celu szczep *L. sake* ATCC

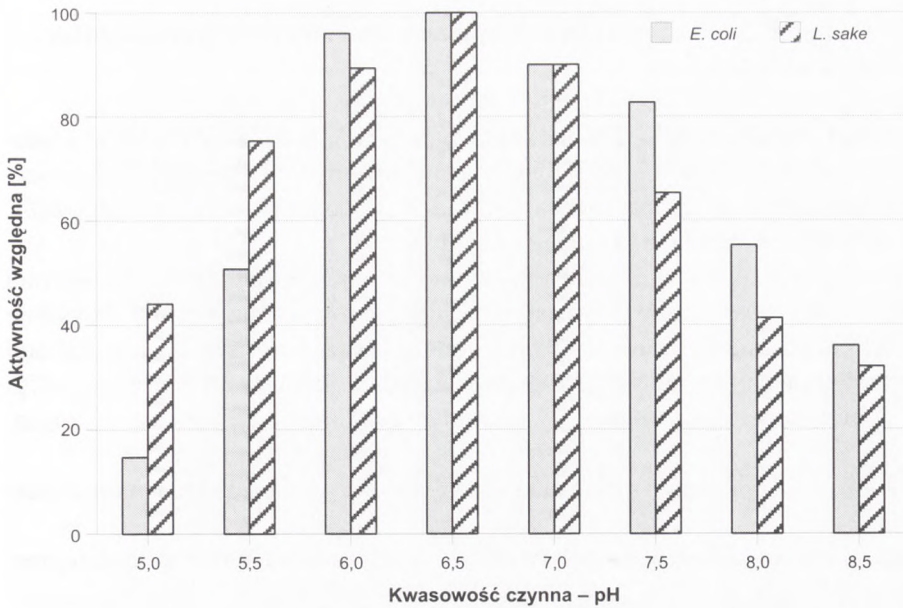
15521 hodowano w 30°C na podłożu MRS z glukozą lub laktozą. Chromosomalne DNA wyizolowano z *L. sake* metodą lizozym – proteinaza. Zastosowano wektor plazmidowy otrzymany metodą lizy alkalicznej i oczyszczony przez strącenie glikolem polietylenowym. Chromosomalne DNA z *L. sake* trawiono za pomocą enzymu restrykcyjnego San 3AT. Poszczególne frakcje DNA wydzielano stosując gradienty stężeń roztworów sacharozy. Wydzieloną frakcję odpowiadającą od 3 do 6 kb wiązano do DNA plazmidowego trawionego za pomocą Bam HI. Transformację rekombinowanych plazmidów prowadzono metodą z chlorkiem wapnia (7).

2.2. Otrzymywanie i charakterystyka rekombinowanej β -galaktozydazy

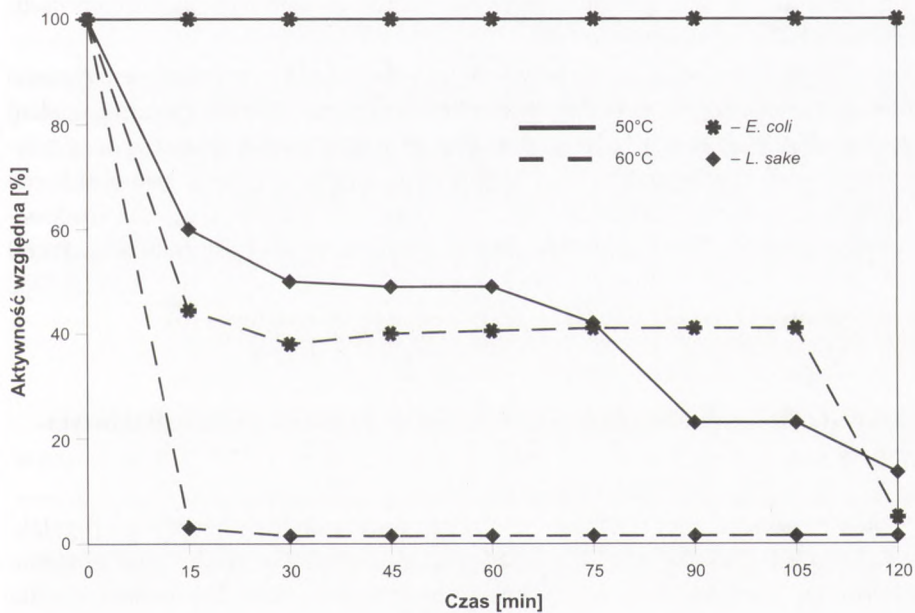
W badaniach Torres i Lee (7) doskonałe genetycznie komórki *E. coli* namnażano do późnej fazy logarytmicznej. Biomasę bakterii oddzielano przez wirowanie przy $1000 \times g/15$ min. Przemywano ją dwukrotnie 0,05 M buforem cytrynianu sodu – pH 6,5 i zawieszano w 10 ml tego buforu. Dezintegrację ścian komórkowych prowadzono w prasie French (American Instrument Co.) stosując ciśnienie 100 MPa. Zawiesinę rozerwanych komórek wirowano przy $1500 \times g/35$ min. W supernatancie oznaczano aktywność β -galaktozydazy stosując jako substrat ONPG. Za jednostkę aktywności przyjęto 1 μ mol o-nitrophenolu (ONP) powstającego w ciągu 1 minuty w 37°C. Białko enzymatyczne syntetyzowane przez doskonałe genetycznie komórki *E. coli* porównywano z enzymem otrzymanym z rodzicielskich komórek *L. sake* (7). Porównywane enzymy wykazywały podobne działanie w buforze fosforanowym w zakresie pH 5,5-8,5 przy czym optymalna kwasowość odpowiadała pH 6,5 (rys. 2).

Wpływ temperatury na aktywność enzymu przedstawiono na rysunku 3. Maksymalną aktywność stwierdzono w 50°C, w buforze fosforanu sodu o pH 6,5, a porównywane enzymy wykazywały około 15% aktywności w 10°C (7). Specyficzna aktywność rekombinowanej β -galaktozydazy z *E. coli* namnażanej na podłożu LB wynosiła 11,38 jednostek. Aktywność β -galaktozydazy z *L. sake* hodowanej na podłożu MRS z laktozą wynosiła 0,78 jednostek oraz tylko 0,15 jednostek z *L. sake* po hodowli na podłożu MRS z glukozą (7).

Preparaty β -galaktozydazy otrzymane z *L. sake* i z doskonałych genetycznie szczepów *E. coli* były stabilne podczas przetrzymywania w 40°C przez 120 minut. Porównanie aktywności β -galaktozydazy w 50 i 60°C wykazało, że rekombinowane białko enzymatyczne było bardziej stabilne od tego ze szczepu rodzicielskiego. Należy zaznaczyć, że β -galaktozydaza syntetyzowana przez *E. coli* charakteryzowała się wysoką aktywnością hydrolizy laktozy zarówno w 10°C jak i w 50-55°C (7). Można ją zatem stosować do hydrolizy laktozy w mleku przechowywanym w warunkach chłodniczych.



Rys. 2. Wpływ kwasowości czynnej na aktywność β -galaktozydazy z *L. sake* oraz modyfikowanego genetycznie *E. coli*. Opracowano na podstawie danych z pracy M. J. Torres i B. H. Lee (7).



Rys. 3. Porównanie termostabilności β -galaktozydazy z modyfikowanych genetycznie szczepów *E. coli* (*) i *L. sake* (◆). Surowe ekstrakty inkubowano w 50 i 60°C, a następnie oznaczano aktywność β -galaktozydazy w 37°C. Opracowano na podstawie danych z pracy M. J. Torres i B. H. Lee (7).

2.3. Doskonalenie mikroorganizmów w kierunku biosyntezy termostabilnej β -galaktozydazy

Termostabilność enzymów określa się jako zachowania ich aktywności w środowisku o temperaturze powyżej 60°C. Stosowanie enzymów w długotrwałych procesach technologicznych, które można prowadzić w temperaturze powyżej 60°C sprzyja wyeliminowaniu niepożądanego mikroflory.

Enzymy termostabilne w przeciwieństwie do termolabilnych można skuteczniej immobilizować i wielokrotnie stosować bez zmniejszania ich aktywności. Decyduje o tym większa stabilność termiczna białek podczas wiązania enzymów z nośnikami oraz w czasie reakcji enzymatycznych prowadzonych w temperaturze powyżej 60°C. W celu poprawienia termostabilności enzymów prowadzone są badania w kierunkach:

- stabilizacji odporności termicznej enzymów przy zastosowaniu metod chemicznych,
- poszukiwania i selekcji drobnoustrojów syntetyzujących enzymy bardziej termostabilne,
- doskonalenia właściwości mikroorganizmów, wydajnych producentów enzymów metodami inżynierii genetycznej.

Większość znanych preparatów β -galaktozydazy hydrolizuje laktozę w środowisku o temperaturze od 30 do 60°C. Aktywne, termostabilne preparaty β -galaktozydazy otrzymuje się np. z: *Aspergillus niger*, *Bacillus stearothermophilus*, *Streptococcus thermophilus*, lub *Thermus aquaticus* (9).

Źródłem termostabilnej β -galaktozydazy jest biomasa *Pyrococcus woesei*. Wysoka temperatura rozwoju około 100°C utrudnia hodowlę tego mikroorganizmu w skali przemysłowej. Z tego powodu sklonowano gen termostabilnej β -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* do *E. coli*. Wytworzona przez doskonalone genetycznie komórki *E. coli* β -galaktozydaza wykazuje maksimum aktywności w 93°C przy kwasowości środowiska odpowiadającej pH 5,4. Enzym charakteryzuje się dużą termostabilnością. Po 60 minutach inkubacji w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 5,4 w 95, 100, 105 i 110°C zachowuje odpowiednio 100, 57, 10 i 0,5% początkowej aktywności (6).

2.4. Biosynteza β -galaktozydazy o zwiększonej aktywności transgalaktozylacyjnej

W reakcji enzymatycznej hydrolizy laktozy powstają oligosacharydy α i β -galaktozylowe lub α i β -glukozytowe. Ich skład oraz zawartość w produktach enzymatycznej hydrolizy laktozy zależy od jej początkowego stężenia, czasu reakcji, źródła i postaci enzymu (10).

Do niedawna oligosacharydy uznawano za niepożądane składniki hydrolizatów. W obecnie dostępnych wynikach badań (1, 11) wskazuje się, że oligosacharydy β -galak-

tozylowe charakteryzują się właściwościami bifidogennymi, tj. zdolnością stymulowania rozwoju bakterii *Bifidobacterium bifidus* i niektórych szczepów *Lactobacillus* sp.

Wiadomo, że bakterie te są pożądane w przewodzie pokarmowym, a szczególnie w jelicie grubym. Korzystne oddziaływanie *Bifidobacterium bifidus* oraz *Lactobacillus acidophilus* polega na hamowaniu rozwoju mikroflory bakterii szkodliwych, np. *E. coli*, *Salmonella*, biosyntezie witamin, zmniejszeniu absorpcji amoniaku przez ścianę jelita, zwiększeniu przyswajalności jonów wapnia, magnezu i żelaza.

Terapeutyczne właściwości bakterii mlekowych spowodowały intensywny rozwój produkcji mlecznych napojów fermentowanych, np. mleka acidofilnego, biojogurtów itp. W 1998 r. przy współudziale autorów tego artykułu wdrożono technologię produkcji mleka, w którym przeprowadzono enzymatyczną hydrolizę laktozy, a po utrwaleniu techniką UHT wzbogacono je biomasą *Bifidobacterium*.

Z badań Roya i wsp. (12) wynika, że niektóre szczepy *Bifidobacterium* syntetyzują izoenzymy β -galaktozydazy o aktywności transgalaktozylacyjnej.

Ming Ni Hunga i wsp. (11) z przewodu pokarmowego dziecka wyizolowali szczep *Bifidobacterium infantis* HZ 96 wykazujący szczególne zdolności do syntezy oligosacharydów. W preparatach β -galaktozydazy z *B. infantis* HL 96 stwierdzili obecność 3 izoenzymów o różnym ciężarze cząsteczkowym i aktywności hydrolizy laktozy w różnym stopniu zależnej od temperatury i kwasowości środowiska. Poszczególne izoenzymy wykazują także różną aktywność transgalaktozylacji.

Przedmiotem dalszych badań Minga Ni Hunga i wsp. (11) było sklonowanie genu β -galaktozydazy z *Bifidobacterium infantis* HL 96 do *E. coli*. Enzymy BIG1 i BIG4 otrzymane z doskonalonych genetycznie szczepów *E. coli* porównywano z enzymami szczepu macierzystego. Okazało się, że β -galaktozydaza z *B. infantis* wykazywała maksimum aktywności w 40°C, podczas gdy enzymy BIG1 i BIG4 wykazywały odpowiednio maksimum aktywności w 50 i 40°C (5) (rys. 4). Różnice stwierdzono także w ocenie aktywności enzymów w zależności od kwasowości środowiska. Natywny enzym ze szczepu *Bifidobacterium infantis* wykazuje najwyższą aktywność w pH 7,5, a BIG1 i BIG4 odpowiednio w pH 7,5 i pH 8,0. Różnice dotyczą również aktywności specyficznej β -galaktozydazy (tab. 1).

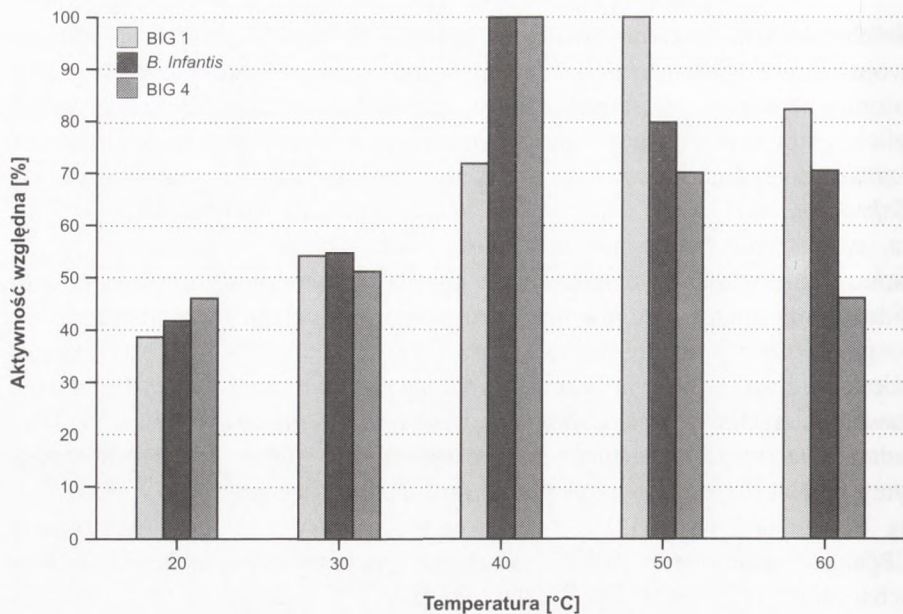
Tabela 1

Aktywność specyficzna natywnej i rekombinowanej β -galaktozydazy (11)

Szczep	Aktywność specyficzna*	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)
<i>B. infantis</i>	10,240	7,5	40
<i>E. coli</i> /pBIG1	18,163	7,5	40
<i>E. coli</i> /pBIG4	25,602	8,0	40

* Aktywność specyficzna: jednostka aktywności/mg białka

1 JA – odpowiada ilości enzymu uwalniającego 1 μ mol o-nitrofenolu z ONPG w czasie 1 min.



Rys. 4. Wpływ temperatury na aktywność β -galaktozydazy z *B. infantis* oraz z modyfikowanych genetycznie szczepów *E. coli*. Opracowana na podstawie danych z pracy Ming-Ni Hung i B. H. Lee (11).

W szczegółowej analizie białek enzymatycznych wykazano, że poszczególne izoenzymy β -galaktozydazy obecnej w komórkach *Bifidobacterium infantis* są kodowane przez różne geny i dlatego ich ekspresja w komórkach *E. coli* przebiega niezależnie. W ten sposób wytłumaczyć można różnice w ocenie właściwości otrzymanych rekombinantów. W ocenie praktycznej przydatności β -galaktozydazy z doskonalonego szczepu *E. coli* należy zwrócić uwagę na różnice w warunkach ich namnażania w porównaniu do szczepu macierzystego. Namnażanie biomasy *Bifidobacterium* jest znacznie trudniejsze do przeprowadzenia w skali przemysłowej.

Doskonalenie genetyczne szczepów *E. coli* prowadzące do przejęcia genów β -galaktozydazy z genomu *Bifidobacterium infantis* daje szanse uruchomienia przemysłowej produkcji preparatów β -galaktozydazy o zwiększonej aktywności transgalaktozylacyjnej, a następnie ich zastosowanie do hydrolizy laktozy w mleku przeznaczonym do produkcji napojów fermentowanych z udziałem mikroflory o właściwościach terapeutycznych.

3. Intensyfikacja sekrecji β -galaktozydazy wewnątrzkomórkowej

W otrzymywaniu β -galaktozydazy syntetyzowanej przez drobnoustroje ważnym procesem jednostkowym jest jej wydzielenie z komórki. W tym celu niezbędne jest rozbitcie ścian komórkowych, a następnie oddzielenie i oczyszczenie białek enzymatycznych.

Metody dezintegracji ścian komórkowych oraz wydzielanie białek są energochłonne i w dużym stopniu rzutują na koszty produkcji preparatów enzymatycznych. Jedną z możliwości wyeliminowania tego etapu jest namnażanie drobnoustrojów wydzielających białka enzymatyczne na zewnątrz komórek. Okazało się, że proces wydzielania białek enzymatycznych z komórki można intensyfikować dodając do pożywki niektóre aminokwasy (13). Intensyfikujący wpływ dodatku glicyny do podłoża na zewnątrzkomórkowe uwalnianie β -galaktozydazy z komórek *E. coli* stwierdził Ikura i wsp. (14).

W badaniach Grones i wsp. (13) otrzymano genetycznie modyfikowane szczepy *Acetobacter pasteurianus* oraz potwierdzono możliwości uwalniania syntetyzowanej β -galaktozydazy na zewnątrz komórek pod wpływem aminokwasów dodawanych do pożywki. W tym celu *A. pasteurianus* hodowano na trzech różnych pożywkach dodatkowo wzbogaconych w laktozę – 1% oraz glicynę – 1% (13). Korzystny wpływ obecności glicyny w pożywce na uwalnianie β -galaktozydazy przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Wpływ składników podłoża hodowlanego na uwalnianie β -galaktozydazy (JA/mg białka) przez *A. pasteurianus* namnażanego na podłożu M z dodatkiem i bez dodatku 1% glicyny (13)

Podłoże	Przyrosty biomasy <i>A. pasteurianus</i>		Aktywności β -galaktozydazy JA/mg białka			
	absorbancja A ₆₀₀		zewnątrzkomórkowa		wewnątrzkomórkowa	
	12 h	36 h	12 h	36 h	12 h	36 h
LB						
bez laktozy	1,3	1,9	5	7	42	21
1% laktozy	2,1	2,3	11	10	1170	1890
1% glicyny	0,6	2,2	45	233	2510	4540
YPG						
bez laktozy	1,7	1,9	5	8	23	54
1% laktozy	1,8	1,9	7	6	573	593
1% glicyny	1,9	2,1	20	30	267	505
M						
bez laktozy	1,2	1,3	3	10	46	21
1% laktozy	1,7	1,9	7	2	340	52
1% glicyny	1,7	1,2	59	494	262	190

W wynikach otrzymanych w badaniach przeprowadzonych przez Grones i wsp. (13) potwierdza się możliwości doskonalenia technologii pozyskiwania β -galaktozydazy. Okazało się, że uwalnianie enzymów wewnątrzkomórkowych można intensyfikować dobierając skład pożywki. Prawdopodobnie dodawana glicyna zwiększa sekrecję enzymu wewnątrz komórek oraz powoduje zmiany w przepuszczalności

ścian komórkowych bakterii i w efekcie zwiększa się wydzielanie β -galaktozydazy na zewnątrz komórek.

4. Podsumowanie

W opracowaniu przedstawiono przykłady doskonalenia cech technologicznych β -galaktozydazy metodą klonowania genów do genomów mikroorganizmów zdolnych do wydajnej biosyntezy tego enzymu. Szczególną uwagę zwrócono na możliwości biosyntezy β -galaktozydazy aktywnej w szerokim zakresie temperatury od 10 do 55°C.

Otrzymywanie i stosowanie termicznie tolerancyjnych preparatów β -galaktozydazy umożliwi urozmaicenie technologii produkcji mleka bezlaktozowego. Możliwa będzie hydroliza laktozy w mleku przechowywanym w warunkach chłodniczych. Biosynteza β -galaktozydazy stabilnej termicznie ułatwi jej immobilizowanie.

W technologii napojów mlecznych fermentowanych zwraca się dużą uwagę na ich oddziaływanie prozdrowotne. Jest ono związane z obecnością w napojach aktywnych komórek *Bifidobacterium* i *Lactobacillus acidophilus*. Ich rozwój jest stymulowany obecnością oligosacharydów β -galaktozytowych, które są produktami ubocznymi enzymatycznej hydrolizy laktozy. Zdolność uwalniania oligosacharydów β -galaktozytowych w dużym stopniu zależy od właściwości β -galaktozydazy. W artykule przedstawiono przykłady potwierdzające możliwości otrzymywania β -galaktozydazy wykazujących te zdolności.

Zwrócono także uwagę na możliwości doskonalenia warunków biosyntezy β -galaktozydazy oraz uzupełnienia składu pożywki w aminokwasy stymulujące sekrecję białek enzymatycznych na zewnątrz komórek. Wskazano na możliwości otrzymywania preparatów β -galaktozydazy z pominięciem dezintegracji ścian komórkowych mikroorganizmów hodowanych metodą ciągłą.

Przedstawione przykłady świadczą wyraźnie o postępie w biosyntezie β -galaktozydazy o cechach technologicznych umożliwiającym wdrażanie nowych technologii przetwarzania mleka lub serwatki.

Literatura

1. Kowalewska-Piontas J., (1993), Przegl. Mlecz., (8), 197-200.
2. Poznański S., Kowalewska J., Bednarski W., Rejs A., (1975), Post. Biochem., 21, 437-443.
3. Herman R. E., Mc Kay L. L., (1986), Appl. Environmental Microbiol., 52(1), 45-50.
4. Horiuchi Jun-ichi, M. Komasa, H. Miyakawa M., Kishimoto, Haruo Momose, (1994), Biotechnol. Letters, 16 (2), 113-118.
5. Tran Lam-Son Phan, L. Szabo, L. Fülöp, L. Orosz, T. Sik, A. Holczinger, (1998), Current Microbiol., 37, 39-43.
6. Loveland J., Gutshall K., Kasmir J., Prema P., Brenchley J. E., (1994), Appl. Environmental Microbiol., 60 (1), 12-18.

7. Torres M. J., Lee B. H., (1995), *Biotechnol Letters*, 17 (7), 673-698.
8. Trimbur D. E., Gutshall K. R., Prema P., Brenchley J. E., (1994), *Appl. Environmental Microbiol.*, 60. (12), 4544-4552.
9. Maciuńska J., Synowiecki J., (1998), *Materiały XXIX Sesji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN*, Olsztyn.
10. Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (1986), *Post. Biochem.*, 32, 469-484.
11. Ming-Ni Hung, Lee B. H., (1999), *Biotechnol. Letters*, 20 (7), 659-662.
12. Roy D., Berger J., Reuter G., (1994), *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 55-70.
13. Grones J., Bencova K., (1994), *Folia Microbiol.*, 39 (2), 99-104.
14. Ikura Y., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2747-2753.