



Charakterystyka i oczyszczanie pozakomórkowych amylaz bakterii *Bacillus polymyxa B-20*

Anna Rodziewicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza, Wrocław

Characteristics and purification of *Bacillus polymyxa B-20* amylases

Summary

Bacillus polymyxa B-20 α - and β -amylase were purified using a combination of acetone fractionations, ion-exchange chromatography and ammonium sulfate precipitation. The α -amylase was purified 18-fold, to a specific activity of 1065 U mg⁻¹. The enzyme had an optimal temperature at 70°C and was stable up to 50°C in the presence of Ca⁺⁺. A purified enzyme displayed maxima for activity of pH 6,8 and was inhibited by 1 mM EDTA. Maltose is predominantly produced from starch. The β -amylase had pH optima at 5,6 (acetate buffer), temperature optima at 60°C, was stable at pH range of 5,0 to 7,5 at temperature up to 45°C. Enzyme activity was inhibited by sulfhydryl reagents such as pCMB and Hg⁺⁺. Both *B. polymyxa B-20*, α - and β -amylase are maltogenic enzymes.

Key words:

α -amylase, β -amylase, *Bacillus polymyxa*, purification, properties, polysaccharides.

1. Wstęp

Bakterie *B. polymyxa* syntetyzują wiele pozakomórkowych enzymów, spośród których największe znaczenie mają α -glukanohydrolazy. Do grupy tej należą α - i β -amylazy oraz pululanazy (1-4). Amylazy pochodzące z różnych szczepów *B. polymyxa* oczyszczano i charakteryzowano, a także klonowano geny odpowiedzialne za ich syntezę. Gen amylazy zawiera 3588 nukleotydów, które kodują białko prekursorowe złożone z 1161 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 130 kDa. Białko to wykazuje aktywność zarówno α - jak i β -amylazową i powstaje we wczesnej fazie syntezy enzymów, a także w obecności chymostatyny, która jest inhibitorem proteinaz (5,6). Prekursor

Adres do korespondencji

Anna Rodziewicz,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Norwida 25,
50-375 Wrocław;
e-mail:
arod@ozi.ar.wroc.pl

biotechnologia

1 (48) 189-198 2000

zawiera dwie duże domeny strukturalne i region węzłowy utworzony przez około 200 aminokwasów, podatny na działanie proteinaz, uczestniczących w tworzeniu podobnych form enzymów. Geny pozakomórkowej obojętnej proteazy i wewnątrzkomórkowej serynowej proteazy z *B. polymyxa*, klonowano w *E. coli*. Otrzymane enzymy miały zdolność rozszczepiania prekursora do α - i β -amylazy. Masa cząsteczkowa α -amylazy wynosiła 48 kDa, zaś β -amylazy występowały jako trzy izoenzymy różniące się masą: 70,5 i 42 kDa (7). α i β -amylazy z bakterii *B. polymyxa* zaliczane są do enzymów scukrzających skrobię, mają zatem duże znaczenie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

Celem pracy było wydzielenie, oczyszczenie i określenie właściwości amylaz pochodzących z płynu pohodowlanego szczepu bakterii *B. polymyxa B-20*, wydajnego producenta tych enzymów.

2. Materiał i metody

2.1. Mikroorganizm

Szczep bakterii *Bacillus polymyxa B-20* pochodził z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Zapasy kultur bakterii przechowywano na skosach z mąką kukurydzianą pod parafiną w temperaturze 4°C, oraz w postaci wysuszonych przetrwalników (8).

2.2. Warunki hodowli

Hodowle stacjonarne bakterii prowadzono w podłożu serwatkowym (8) w bioreaktorze AK 3-1 o objętości roboczej 0,75 dm³, w temperaturze 30°C przez dwie doby, (zybkosc mieszania 400 rpm, przepływ powietrza 1,6 vvm). Po zakończonej hodowli, bionasę oraz nierozpuszczalne składniki podłoża odwirowywano przy 4,5 tysiąca obrotów na minutę, a uzyskany supernatant stanowił materiał do dalszych badań.

2.3. Aktywność enzymatyczna

Aktywność amylaz badano metodą Fischera-Steina (9) w pH 5,6 (0,1 M bufor odczynowy) i pH 6,8 (0,1 M bufor fosforanowy), w temperaturze 25°C. Jednostka aktywności (JFS) wyrażała liczbę mikromoli maltozy utworzonej w czasie 1 minuty w odniesieniu do 1 cm³ płynu pohodowlanego lub 1 mg białka (aktywność właściwa). Aktywność proteinaz badano metodą Ansona (10) wobec kazeiny BDH w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0 proteinazy obojętne) lub w obecności 1 x 10⁻³ M EDTA (proteinazy alkaliczne). Jednostką aktywności (JA) wyrażała milimole tyrozyny utworzonej w czasie 1 min w temperaturze 30°C w optymalnym pH.

2.4. Zawartość białka

Białko oznaczano metodą Lowry (11) lub spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm (we frakcjach z kolumny).

2.5. Główne etapy oczyszczania amylaz

Etap 1. Wytrącanie enzymów z płynu pochowlanego

Precypitat białek enzymatycznych uzyskano poprzez wytrącenie ich z czterokrotnie zagęszczonego płynu pochowlanego za pomocą zimnego acetonu o stężeniu 75%.

Etap 2. Chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie

Białko enzymatyczne rozpuszczono w 0,01 M buforze Tris-HCl o pH 8,6 i наносono na kolumnę o wymiarach 125 x 15 mm napełnioną wymiennicem jonowym zrównoważonym tym samym buforem. Frakcje z kolumny wmywano skokowym gradientem stężeń buforu Tris-HCl o zmiennym pH: 0,01 M o pH 8,6; 0,1 M o pH 8,6; 0,1 M o pH 7,0. Końcowe frakcje (96-110) eluowano 0,3 M roztworem Tris-HCl o pH 6,8.

Etap 3. Frakcjonowanie siarczanem amonowym

Białko wysalano siarczanem amonowym po uzyskaniu 0,5 stopnia nasycenia roztworu. Następnie po odwirowaniu osad rozpuszczano w buforze Tris-HCl o pH 8,3 i dializowano przez noc wobec tego samego buforu.

Etap 4. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym – PAGE (12)

Rozdział przeprowadzono w układzie Davisa (żel 10%, bufor Tris-HCl, pH 8,3) w warunkach natywnych oraz po denaturacji w obecności SDS. Do wybarwienia stosowano Coomassie blue lub czerń amidową. W celu oznaczenia aktywności amylolitycznej, odpowiedni żel po rozdziale rozcierano w buforze fosforanowym o pH 6,0, a następnie po odwirowaniu, supernatant dodawano do substratu skrobiowego. Alternatywnie żel po rozdziale umieszczano w 0,5% roztworze skrobi, inkubowano przez 15 minut w 35°C, a następnie przenoszono go do roztworu jodu w jodku potasu.

2.6. Hydroliza polisacharydów

Hydrolizowano 10% roztwory polisacharydów w buforze octanowym o pH 5,6 w temperaturze 60°C przez 3 godziny. W uzyskanych hydrolizatach określano zawartość cukrów redukujących metodą DNS (13) oraz ilość dekstryn poprzez wytrącenie ich etanolem, a następnie hydrolizę do glukozy według metody Rauschera (14). Poziom glukozy i poszczególnych maltodekstryn oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.

2.7. Chromatograficzne oznaczanie produktów hydrolizy polisacharydów

Produkty hydrolizy: skrobi rozpuszczalnej, skrobi nierozpuszczalnej ziemniaczanej, amylozy, amylopektyny, glikogenu, dekstryn β -granicznych i pululanu, rozdzielano metodą HPLC przy użyciu kolumny supelcosil LC-NH₂ (25 x 0,46 cm) w układzie acetonitryl - woda (60 : 40) z szybkością przepływu 1 cm³ na minutę, z detektorem UV 190. Standardy o stężeniu 7,5 μ g/ μ l (w ilości 20 μ l) stanowiły: glukoza (G1), maltoza (G2), maltotrioza (G3), maltotetraoza (G4), maltopentaoza (G5), maltoheksaoza (G6), maltoheptaoza G7. Zawartość poszczególnych węglowodanów wyrażano ich procentowym udziałem, w odniesieniu do suchej substancji hydrolizatu.

2.8. Wpływ różnych czynników na aktywność amylaz

Oceniano wpływ związków, które mogą modyfikować aktywność metaloenzymów, oraz enzymów tiolowych: EDTA, pCMB, HgCl₂, CaCl₂, cysteiny. Wymienione związki miały końcowe stężenie 1 mM. Aktywność proteinaz modyfikowano EDTA i PMSF (1 mM). Badano także wpływ temperatury i odczynu środowiska na aktywność i stabilność oczyszczonych amylaz w zakresie pH 3,5-9,0 w temperaturze 30-80°C. Aktywność oceniano po 15-minutowej preinkubacji, zaś stabilność po 24 godzinach.

2.9. Wyznaczanie stałej Michaelisa-Menten

K_m wyznaczano dla kilku substratów w zakresie stężeń 1-10 mg/cm³. Reakcję enzymatyczną prowadzono w optymalnych warunkach działania enzymu (pH 6,8; 25°C; 5 min), a następnie wyliczano szybkość tworzenia maltozy (mM/dm³ min). W układzie współrzędnych wykreślano zależność odwrotności stężenia substratu (dm³/g) od odwrotności szybkości reakcji (min/dm³ mM). K_m i V_{max} wyliczano na podstawie odczytów z wykresu Lineweavera-Burka. Badanymi substratami były skrobie: rozpuszczalna, natywna ziemniaczana, pszena, kukurydziana, oraz amyloza i amylopektyna.

3. Omówienie wyników i dyskusja

Pozakomórkowe amylazy syntetyzowane przez bakterie *B. polymyxa* B-20 uzyskano na podłożu ze skrobią w warunkach hodowli stacjonarnej. Nieoczyszczony preparat amylaz wykazywał właściwości charakterystyczne zarówno dla α - jak i β -amylazy. Skrobię i inne polisacharydy zawierające wiązania α ,1-4-glikozydowe hydrolizował w granicach 22-39 DE, a głównym produktem hydrolizy była maltoza oraz maltodekstryny G3 - G6 (15).

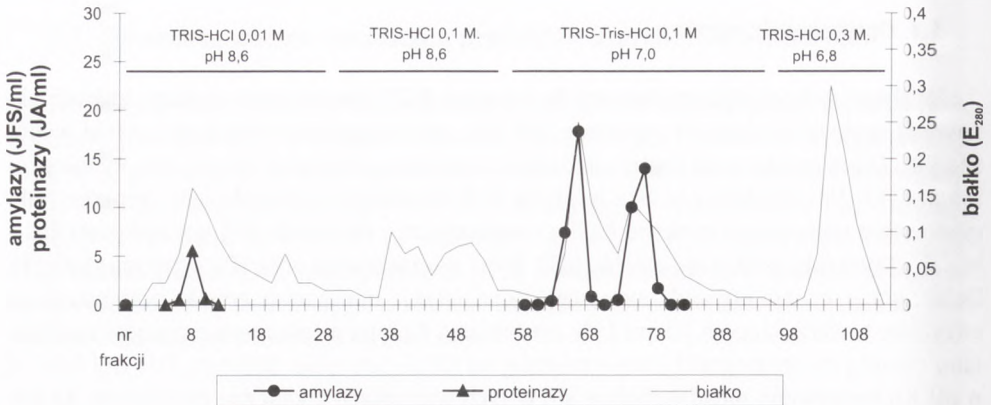
3.1. Oczyszczanie amylaz

W płynie pohodowlanym bakterii *B. polymyxa* B-20 obecne były amylazy, których aktywność scukrzająca była na poziomie 200 JFS, zaś aktywność upłynniania skrobi wynosiła 90 J. Obok amylaz znajdowały się także proteinyzyny alkaliczne (10 JA) oraz metaloproteinyzyny (1,8 JA). Amylazy zawarte w płynie pohodowlanym wyodrębniano poprzez frakcjonowanie acetonem. Uzyskane białko enzymatyczne stanowiło 28% początkowej ilości białek i zawierało większość amylaz (83% ilości początkowej) oraz 50% proteinyzyny (tab. 1). Dalsze oczyszczanie prowadzono w celu rozdzielenia mieszaniny amylaz oraz usunięcia enzymów towarzyszących jakimi były proteinyzyny. Badaną mieszaninę enzymów rozdzielano metodą chromatografii jonowymiennej na DEAE-celulozie. Buforem Tris-HCl 0,01 M o pH 8,6 wymywano nieadsorbujące się w tych warunkach alkaliczne proteinyzyny. Za pomocą 0,1 M buforu Tris-HCl o pH 7,0 eluowano dwie oddzielne frakcje amylaz. Pierwszy szczyt białkowy (frakcje 62-68) zawierał amylazę o właściwościach metaloenzymu, który w 85% był hamowany EDTA. Enzym ten nazwano „amylazą 1”. Drugi szczyt białkowy (frakcje 72-78) zawierał amylazę wrażliwą na pCMB, który hamował jej aktywność w 87%. Enzym ten został nazwany „amylazą 2” (rys. 1). Dalszemu oczyszczaniu poddano tylko frakcję amylazy 1. W tym celu z połączonych frakcji 64-67 wysalano ją siarczanem amonowym o stężeniu końcowym 50%. Uzyskana w tych warunkach amylaza 1, była osiemnastokrotnie oczyszczonym enzymem, którego aktywność specyficzna osiągnęła wysoką wartość 1065 JFS/mg białka (tab. 1). W dalszym etapie badań oczyszczoną amylazę 1, amylazę 2, oraz nieoczyszczony preparat (mieszaninę enzymów zawartych w precypitacie acetonowym) rozdzielano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. W nieoczyszczonym preparacie wykazano obecność pięciu pasm białkowych, z których pierwsze zidentyfikowano jako proteinyzyny, a kolejne cztery należały do amylaz (rys. 2). Oczyszczone frakcje amylazy 1 i amylazy 2 w obecności SDS tworzyły pojedyncze pasma, były zatem homogeniczne. Amylaza 1 poddana elektroforezie w warunkach natywnych, a następnie wypreparowana z żelu, zachowała aktywność 237 JFS.

Tabela 1

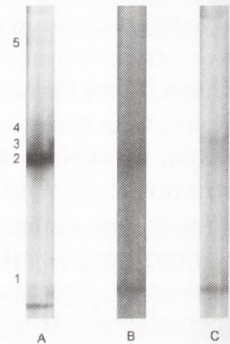
Główne etapy oczyszczania amylaz *B. polymyxa* B-20

Etap oczyszczania	Aktywność całkowita (JFS $\times 10^3$)	Białko całkowite (mg)	Aktywność specyficzna (JFS/mg)	Stopień oczyszczenia (krotność)	Wydajność oczyszczenia (%)
nieoczyszczony filtrat (zageszczony płyn pohodowlany)	89,37	1510,0	59,2	1,0	100,0
frakcjonowanie acetonem	74,08	426,2	173,8	2,9	82,8
DEAE-celuloza (fr. 62-68)	5,70	24,0	237,3	4,0	6,4
frakcjonowanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,53	3,4	1065,6	18,0	3,9



Rys. 1. Chromatografia jonowymienna nieoczyszczonego preparatu enzymatycznego z *B. polymyxa* B-20, na DEAE-celulozie.

Rys. 2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym nieoczyszczonego preparatu enzymatycznego (A), amylazy 1 (B) i amylazy 2 (C). Pasmo 1 proteinyzy, pasma 2 – 5 amylazy.



Amylazy z bakterii *B. polymyxa* tworzą wielopostaciowe formy, które powstają z jednego białka prekursorowego. Gen amylazy zawiera sekwencje kodujące β -amylazę w regionie 5', oraz sekwencje kodujące α -amylazę w regionie 3' (7). Taka wielopostaciowość amylaz występuje także u innych gatunków z rodzaju *Bacillus*: *B. circulans* (16), *Bacillus* sp. TS-23 (17,18), *Bacillus* sp. GM 8901 (19), *B. megaterium* i *B. subtilis* (20). *Bacillus* sp. TS-23 syntetyzuje pięć różnych form amylaz o aktywności α -amylazowej i pululanazowej. Nie wiadomo czy te amylopululanazy mają jedno czy dwa centra katalityczne. Bakterie *B. megaterium* i *B. subtilis* podobnie jak *B. polymyxa* zdolne są do równoczesnej syntezy α - i β -amylazy. W przedstawionych wynikach własnych badań sugeruje się, że amylaza 1, może być α -amylazą, a amylaza 2, β -amylazą. Na obecność β -amylazy w preparacie wskazuje też zdolność adsorbowania się jej na skrobi kukurydzianej. Jest to cecha charakterystyczna β -amylaz pochodzenia drobnoustrojowego, które adsorbują się na skrobi i ją trawią, w odróżnieniu od β -amylaz roślinnych, które na skrobi nie adsorbują się, ale mogą ją hydrolizować do maltozy (3).

3.2. Ogólne właściwości badanych amylaz

W przedstawionych wynikach badań pokazano, że α -glukanohydrolazy pochodzące ze szczepu *B. polymyxa B-20* są mieszaniną kilku amylaz, z których dwie poddano dalszym badaniom. Oczyszczona amylaza 1, wykazała optymalną aktywność w buforze fosforanowym o pH 6,8 w temperaturze 70°C, w obecności Ca^{++} i była całkowicie hamowana EDTA (tab. 2). Frakcja amylazy 2, miała najwyższą aktywność w buforze octanowym o pH 5,6 w temperaturze 60°C, w obecności cysteiny. Jony rtęci i pCMB hamowały jej aktywność w granicach 74-87%, przy czym był to proces odwracalny przy niższym stężeniu inhibitora (0,1 mM) oraz wyższym aktywatora (4 mM cysteiny). Według badań innych autorów cząsteczka β -amylazy z *B. polymyxa* posiada 3 reszty cysteiny w pozycjach: 83, 91, 323, które mogą reagować z odczynnikami sulfhydrylowymi. Jednak żadna z tych reszt bezpośrednio nie uczestniczy w katalizie i wiązaniu substratu, co wykazano poprzez uzyskanie mutantów, u których reszty cysteiny poddano substytucji waliną lub seryną. Ubytek aktywności pod wpływem czynników sulfhydrylowych spowodowany jest chemiczną modyfikacją reszt cysteiny, zaś mutacja punktowa cysteiny w pozycji 83 powodowała też zmianę struktury (21). Bezpośrednio w katalizie β -amylazy może uczestniczyć Glu 163, na co wskazuje wrażliwość tej reszty na α -EPG (2,3-epoksypropylo α -D-glukopiranoza), która ją estryfikuje. Również w katalizie α -amylazy pochodzącej z *B. subtilis* (*Taka-amylase A*) bezpośrednio uczestniczą aminokwasy kwaśne Asp. 269, który stabilizuje przejściowy jon karbonyowy, oraz Glu 208, który jest donorem protonu. Sugeruje się także udział His 180 w wiązaniu substratu (22). Zasadniczą rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej α -amylazy pełnią jony Ca^{++} , które wiążą domeny strukturalne A i B, przez co stabilizuje się miejsce wiążące substrat, oraz centrum aktywne. Udowodniono, że Ca^{++} utrzymuje trójwymiarową strukturę enzymu, zapobiega jej rozluźnieniu co jest ważne dla zachowania jego termostabilności (5 mM Ca^{++}) (23).

Tabela 2

Właściwości amylazy 1 i amylazy 2, bakterii *B. polymyxa B-20*

	Amylaza 1	Amylaza 2
optymalne pH	6,8	5,6
optymalna temperatura	70°C	60°C
stabilność pH	5,6-8,0	5,0-7,5
termostabilność	50°	45°
inhibicja	EDTA – 100%	pCMB – 87,4% Hg ⁺⁺ – 74,2%
aktywacja	Ca ⁺⁺ – 47%	cysteina – 42,3%

3.3. Właściwości hydrolityczne amylazy 1

Przy użyciu amylazy 1, hydrolizowano różne polisacharydy o budowie liniowej i rozgałęzionej. We wszystkich hydrolizatach dominującym produktem była maltoza (57-87% w s.s.). Maltoheksaoza (G6), którą wytwarzają α -amylazy upłynniające, była nieobecna lub była w ilościach śladowych. Zawartość glukozy i pozostałych maltodekstryn G3-G5 była znacznie niższa i zależna od rodzaju substratu (tab. 3). Dekstryny β -graniczne i pululan były hydrolizowane w małym stopniu do G1 i G2, co dowodzi, że badany enzym rozszczepiał wiązania α ,1-4-glikozydowe, a nie α ,1-6-glikozydowe. Ponadto w czasie trwania hydrolizy, na jej początku powstawały mniejsze maltodekstryny, a następnie kosztyn G5 i G6 tworzyły się G2 i G3 (dane nie publikowane). Zbadano też specyficzność substratową badanej amylazy 1 względem: amylozy, amylopektyny i różnych rodzajów skrobi (ta. 4). Najwyższe powinowactwo (małą wartość K_m) wykazano wobec skrobi kukurydzianej, skrobi rozpuszczalnej i amylozy (1,81; 2,0; 2,5 g/dm³) oraz najniższe wobec natywnej skrobi ziemniaczanej (10 g/dm³).

Tabela 3

Zawartość maltodekstryn w hydrolizatach polisacharydów otrzymanych z udziałem amylazy 1 *B. polymyxa* B-10

Badany substrat	Wartość DE hydrolizatu	Zawartość węglowodanów w hydrolizatach (% w s.s.)							
		*G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	Dekstryn G n
amyloza	24	6,0	75,0	9,3	5,2	0,7	0	0	3,3
amylopektyna	7	25,1	60,9	3,9	0,8	0,3	0	0	9,3
glikogen	18	12,1	69,7	0	6,4	0	0	0	11,3
dekstryny, β -graniczne	4	7,9	84,1	0	0	0	0	0	8,3
pululan	0,8	4,9	68,1	0	0	0	0	0	27,3
skrobia nierozpuszczalna	31	2,4	87,3	0,9	3,3	2,6	0,7	0	2,5
skrobia rozpuszczalna	39	5,1	56,8	6,5	18,3	4,2	4,6	Ślad	4,3

*G – jednostka glukozy

Tabela 4

Wartości stałej Michaelisa-Mentena, oraz szybkości maksymalnej reakcji dla amylazy 1 *B. polymyxa* B-20

Badany substrat	K_m (g/dm ³)	V_{max} (mM/dm ³ min)
skrobia rozpuszczalna	2,0	40,0
skrobia natywna ziemniaczana	10,0	100,0
skrobia kukurydziana	1,81	30,3
skrobia pszenna	5,0	76,9
amyloza	2,5	22,2
amylopektyna	4,16	38,5

4. Wnioski

W przedstawionych wynikach badań potwierdzono wcześniejsze sugestie, że na podstawie ogólnych właściwości enzymatycznych (warunków aktywności i stabilności, oraz wrażliwości na inhibitory), a także hydrolitycznych (rodzaj hydrolizowanych wiązań glikozydowych, oraz nagromadzenia produktów hydrolizy), enzym nazywany amylazą 1, może być zaliczony do α -amylaz, a amylazą 2, do β -amylaz. Wszystkie przytoczone dane pozwalają na wyciągnięcie ogólnego wniosku, że pozakomórkowe amylazy uzyskane ze szczepu *B. polymyxa B-20* są mieszaniną α - i β -amylazy i należą do enzymów maltogenicznych. Enzymy te mają podstawowe znaczenie w uzyskiwaniu syropów maltozowych, które są ważne w przemyśle spożywczym, farmacji i przemyśle fermentacyjnym. Ponadto mogą być wykorzystane do otrzymywania rozgałęzionych oligosacharydów, co jest wysoce perspektywiczne w technologii żywności.

Wykaz stosowanych skrótów

- rpm – szybkość obrotów mieszadła (min^{-1})
- vvm – szybkość przepływu powietrza ($\text{dm}^3/\text{dm}^3/\text{min}$)
- DE – równoważnik glukozowy (*dextrose equivalent*)
- DNS – kwas 3,5-dinitrosalicylowy
- SDS – siarczan dodecyłu
- EDTA – kwas etylenodiaminoczerooctowy
- PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu
- PCMB – p-chlorortęciobenzoesan
- DEAE-celuloza – O-(dietyloaminoetylo)celuloza

Literatura

1. Fogarty W. M., (1983), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 1, *Microbial amylases*, Ed. W. M. Fogarty, London, N.Y., 1-92.
2. Mohandass C. M., Chandrasekaran M., (1994), *Ind. J. Experiment. Biol.*, 32, 912-913.
3. Sohn Ch. B., Lee S. M., Kim M. H., Ko J. H., Kim K. S., Chang J. E., Ahn Y. K., Kim Ch. H., (1996), *J. Food Sci.*, 61, 230-234.
4. Castro G. R., Santropiero L. M. D., Sineriz F., (1992), *Appl. Biochem., Biotechnol.*, 37, 227-233.
5. Kawazu T., Nakanishi Y., Uozumi N., Sasaki T., Yamagata H., Tsukagoshi N., Uda S., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 1564-1570.
6. Uozumi N., Saukari K., Sasaki T., Takekawa S., Yamagata H., Tsukagoshi N., Uda S., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 375-382.
7. Takekawa S., Uozumi N., Tsukagoshi N., Uda S., (1991), *J. Bacteriol. Nov.*, 173, 6820-6825.
8. Rodziewicz A., Wojtatowicz M., (1997), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 6/47, 69-76.
9. Whelan W. J., (1964), *Hydrolysis with alpha amylase*, in: *Methods in carbohydrate chemistry*, v. 4, *Starch*, Ed. R. L. Whistler., Academic Press, New York, London, 252-256.
10. Kłyszewko-Stefanowicz L., (1982), *Oznaczenie aktywności trypsyny metodą Ansona. Ćwiczenia z biochemii*, praca zbiorowa, PWN, Warszawa-Poznań, 561-565.
11. Lowry J. O. H., Rosenbrough N.J., Farr A. L., Randall R. J., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
12. Davis B. J., (1964), *Ann. N. York., Acad. Sci.*, 121, 404-427.
13. Miller C. L., (1959), *Analytic. Chem.*, 31, 426-428.
14. Rauscher K., Engst R., Freimuth U., (1972), *Untersuchung von Lebensmitteln*, VEB Fachbuch-Verlag, Leipzig, 130-135.
15. Rodziewicz A., Bugla W., (1994), *Zesz. Nauk. AR Wroc. Technol. Żywn.*, 244, 177-187.

16. Taniguchi H., Jae Ch. M., Yoshigi N., Maruyama Y., (1983), *Agric. Biol. Chem.*, 47, 511-519.
17. Lin L. L., Tsau M. R., Chu W. S., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 51-56.
18. Brunswick J. M., Kelly C. T., Fogarty W. M., (1996), *Biochem., Soc. Trans.*, 24, 45-46.
19. Kim T. U., Gu B. G., Jeong J. Y., Byun S. M., Shin Y. Ch., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3105-3112.
20. Castro G. R., Ferrero M. A., Abate C. M., Mendez B. S., Sineriz F., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14, 49-54.
21. Uozumi N., Matsuda T., Tsukagoshi N., Udaka S., (1991), *Biochem.*, 30, 4594-4599.
22. Takase K., (1992), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1122, 278-282.
23. Violet M., Meunier J. C., (1989), *Biochem J.*, 263, 665-670.
24. Kang G. J., Kim M. J., Kim J. W., Park K. H., (1997), *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4168-4172.