



## Wytwarzanie kwasu L(+) mlekowego przez wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w pożywce z serwatką

Hanna Złotkowska, Joanna Czakaj, Andrzej Krakowiak  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa

### Production of L-lactic acid from whey by selected *Lactobacillus* strains

#### Summary

From among of six strains of *Lactobacillus* able for production of lactic acid in whey medium, the strain of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l was chosen for further experiments as most suitable one. The effect of inoculum concentration and the composition of the medium on the production of lactic acid were studied. It was found that for the inoculation of the medium, 10% (v/v) of the inoculum of propagation lasting 18 h, in the medium MRS containing lactose, should be applied. The amount of lactic acid obtained varied from 3,1 to 7,1 g/100 ml medium, depending on the composition of the medium. Produced L(+) lactic acid constituted over 95% of the sum of D and L isomers. When whey was supplemented with yeast autolysate, lactic acid production and yield process increased. The maximum yield of lactic acid production (97,3%) was obtained when *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l was cultured for 44 h in the temperature of 43°C in medium containing whey enriched with 5% of yeast autolysate and 6% of CaCO<sub>3</sub>.

#### Adres do korespondencji

Hanna Złotkowska,  
Instytut Biotechnologii  
Przemysłu  
Rolno-Spożywczego,  
ul. Rakowiecka 36,  
02-532 Warszawa;  
e-mail:  
zlotkowska@ibprs.pl

#### Key words:

*Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, L(+) lactic acid, whey.

### 1. Wprowadzenie

Kwas mlekowy i jego pochodne są powszechnie stosowane w różnych gałęziach przemysłu m.in. w przemyśle spożywczym, garbarstwie, rolnictwie, farmacji, kosmetyce, czy ostatnio w przemyśle chemicznym do produkcji biodegradowalnych tworzyw

sztucznych i ekologicznych rozpuszczalników do farb. W większości stosowanych dotychczas technologii wytworzony w procesie biosyntezy kwas mlekowy występuje w postaci racematu (DL) lub w izomerycznej formie D(-) (1-3). Głównym odbiorcą fermentacyjnego kwasu mlekowego jest przemysł spożywczy, który zainteresowany jest przede wszystkim jego prawoskrętnym izomerem L(+). Preferencja ta wynika stąd, że izomer ten, w odróżnieniu od formy izomerycznej D(-), jest znacznie szybciej wchłaniany z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt i w pełni metabolizowany.

W ostatnich latach prace badawcze nad biosyntezą kwasu mlekowego do celów przemysłowych dotyczą zarówno poszukiwania szczepów zdolnych do wytwarzania głównie izomerycznej formy L(+) kwasu mlekowego (4,5), jak i wykorzystania w procesie fermentacji jako źródła węgla tańszych surowców węglowodanowych niż dotychczas stosowane. Monteagudo i in. (6) stosowali jako substrat do otrzymania kwasu mlekowego melasę z buraków cukrowych. Maksymalną wydajność procesu wynoszącą 87,8% otrzymali prowadząc hodowlę szczepu *L. delbrueckii* w temperaturze 55°C w pożywce o początkowej zawartości cukru 5,66% (pH 5,5) i przy zastosowaniu 5,14% inokulum. W otrzymanym w wymienionych warunkach kwasie mlekowym izomer L(+) stanowił 90%. Na możliwość wykorzystania melasy sojowej wskazali Montelongo i in. (7). W hodowli szczepu *L. salivarius* w pożywce o pH 5,6 z 2% melasą sojową po 36 godzinach otrzymali 4,2 g kwasu mlekowego/l przy wydajności procesu wynoszącej 85%. Dodatek 0,5% ekstraktu drożdżowego spowodował skrócenie czasu trwania procesu do 10 godzin przy jednoczesnym zwiększeniu ilości kwasu mlekowego do 5,5 g/l i wydajności 86%.

Richter i Traeger (8) jako surowiec do otrzymywania kwasu mlekowego stosowali sorgo cukrowe. Do hodowli wglębnej zastosowali sok cukrowy z sorgo otrzymany metodą ekstrakcji, a pozostałe młóto wykorzystali w hodowlach w podłożu stałym. Podczas hodowli wglębnej przy użyciu *L. paracasei* stężenie kwasu L(+) mlekowego po 24 godzinach hodowli wynosiło 88 g/l przy wydajności 91,7%. Podobną wydajność (91-95%) otrzymali w hodowli w podłożu stałym, jednak czas trwania procesu wynosił od 120 do 200 godzin.

Yumoto i Ikeda (9) badali możliwość otrzymywania kwasu L(+) mlekowego z rozpuszczalnej skrobi. Największą ilość kwasu mlekowego (53,4 g/l) uzyskali prowadząc hodowlę szczepu *L. amylophilus* w temperaturze 28°C w pożywce zawierającej 100 g/l skrobi.

Tanim surowcem stosowanym do produkcji kwasu mlekowego jest serwatka (10-12). Severson i Barrett (13) opracowali sposób wytwarzania kwasu L(+) mlekowego w pożywce zawierającej permeat serwatkowy, serwatkę, ekstrakt drożdżowy i sole mineralne z wykorzystaniem szczepu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC-55163. Po 68 godzinach hodowli w temperaturze 42°C uzyskali 50 g kwasu L(+) mlekowego/l pożywki przy pełnym zużyciu laktozy serwatki. Kwas L(+) mlekowy stanowił około 100% uzyskanego produktu. Arasaratnam i in. (10) badali przebieg procesu fermentacji kwasu mlekowego przy użyciu szczepu *Lactobacillus delbrueckii* w pożywce z serwatką wzbogaconą glukozą i różnymi źródłami azotu. Największą

ilość kwasu mlekowego (40 g/l) uzyskali po 84 godz. hodowli w wymienionej pożywce z dodatkiem ekstraktu drożdżowego w ilości 20 g/l. Ricon i in. (14) prowadzili badania dotyczące optymalizacji procesu wytwarzania kwasu mlekowego w pożywce z serwatką przy użyciu szczepu *L. casei*. Autorzy określili wpływ temperatury hodowli, pH pożywki, ilości materiału posiewowego oraz stężenia laktozy w pożywce na biosyntezę kwasu mlekowego. Najlepszą produktywność procesu (2,115 g/l × h) otrzymali prowadząc hodowlę w temperaturze 38°C, w pożywce o pH 5,4 zawierającej 5,6% laktozy i dodając inokulum w ilości 7,5%. Zayed i Winter (12) stosowali filtrat słonej serwatki jako pożywkę do wytwarzania kwasu mlekowego przez różne homofermentatywne bakterie fermentacji mlekowej. Skład filtratu optymalizowali przez dodatek ekstraktu drożdżowego i soli mineralnych. Najbardziej efektywnym producentem kwasu mlekowego okazał się szczep *Lactobacillus* sp., który po 48 godz. hodowli w temperaturze 30°C wytwarzał 12 g/l mlecza.

Celem badań był dobór szczepu zdolnego do wytwarzania kwasu L(+) mlekowego w pożywce z serwatką oraz określenie podstawowych parametrów tego procesu w skali laboratoryjnej. Zastosowanie serwatki do otrzymywania kwasu mlekowego pozwoli na znaczne obniżenie kosztów jego produkcji. Jednocześnie zostanie zagospodarowany ten uciążliwy produkt odpadowy przemysłu mleczarskiego.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Drobnoustroje

W badaniach stosowano sześć szczepów bakterii należących do rodzaju *Lactobacillus*, które pochodziły z Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego. Były to: trzy gatunki *Lactobacillus casei* o symbolach KKP/371, KKP/372 i KKP/373 i *Lactobacillus plantarum* o symbolu KKP/384, których optymalna temperatura wzrostu i biosyntezy kwasu mlekowego wynosiła 30°C oraz *Lactobacillus delbrueckii* III.L.d./12 o symbolu KKP/56 i *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l o symbolu KKP/2007/p, których optymalna temperatura wzrostu i biosyntezy wynosiła odpowiednio 50°C i 43°C. Szczep *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l (wcześniejsza nazwa *Lactobacillus bulgaricus* s/l) uzyskano w wyniku wewnątrzszczepowej selekcji szczepu rodzicielskiego *L. bulgaricus* o symbolu KKP/370 oraz adaptacji do wzrostu i biosyntezy kwasu mlekowego w temperaturze 43°C w pożywce z laktozą.

Czyste kultury szczepu *L. delbrueckii* przechowywano w pożywce brzeczkowej firmy Merck zaś pozostałe szczepy w pożywce octanowej (15) w temperaturze 4°C. Przeszczepiano je co dwa tygodnie i hodowano w temp. 30°C, 43°C lub 50°C (w zależności od wymagań badanego szczepu) przez 24-48 godz.

## 2.2. Pożywki

Do namnażania materiału posiewowego stosowano zmodyfikowaną pożywkę MRS, w której glukozę zastąpiono laktozą (16) oraz pożywkę brzeckową firmy Merck wzbogaconą autolizatem drożdżowym.

Do biosyntezy kwasu mlekowego stosowano pożywki: „P1” i „P2” zawierające odpowiednio serwatkę w proszku „B” lub „L” rozcieńczoną do zawartości laktozy 10% (pH 6,0), „P3” zawierającą płynną serwatkę kwasową o zawartości laktozy 4% (pH 6,0) oraz wymienione pożywki wzbogacone dodatkowo 5% autolizatu drożdżowego [odpowiednio pożywki „P1a”, „P2a” i „P3a”, pH 6,0]. Do wszystkich pożywek dodawano  $\text{CaCO}_3$  w ilości 6%.

Do przygotowania wymienionych pożywek stosowano serwatkę w proszku „B” firmy BIOLACTA-TEXEL Sp. z o.o. w Olsztynie o zawartości białka 3,7% s.m. i laktozy 88%, serwatkę w proszku „L” firmy LAKTOPOL Sp. z o.o. w Suwałkach o zawartości białka 13,8% s.m. i laktozy 76% oraz płynną serwatkę kwasową o zawartości białka około 1% s.m. i laktozy 4%.

## 2.3. Przygotowanie materiału posiewowego

W celu otrzymania materiału posiewowego zawiesinę bakterii (w zależności od szczepu zawierającą od  $1,1$  do  $4,8 \times 10^9$  jtk/ml) uzyskaną przez dodanie do pożywki do namnażania 1% 24-godzinnej czystej kultury (I stadium) przeszczepiano do 10-krotnie większej objętości pożywki do namnażania (II stadium). Hodowle inkubowano w zależności od wariantu doświadczenia przez 8-48 godzin w temperaturach: 30, 43 lub 50°C.

## 2.4. Biosynteza kwasu mlekowego

Hodowle prowadzono metodą stacjonarną w kolbach płaskodennych o objętości 500 ml zawierających 300 ml podłoża fermentacyjnego w temperaturach: 30, 43 lub 50°C (w zależności od wymagań badanego szczepu) przez 44-72 godzin. Materiał posiewowy II stadium dodawano, w zależności od wariantu doświadczenia, w ilości od 5 do 10%.

## 2.5. Metody analityczne i inne oznaczenia

- Kwas mlekowy ogółem oznaczono metodą wersenianową (17).
- Kwas mlekowy w formie L(+) i D(-) oznaczano metodą enzymatyczną (testy firmy Boehringer Mannheim GmbH) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta (18).
- Cukry proste oznaczono (w przeliczeniu na laktozę) metodą kolorymetryczną z odczynnikami DNS (19).

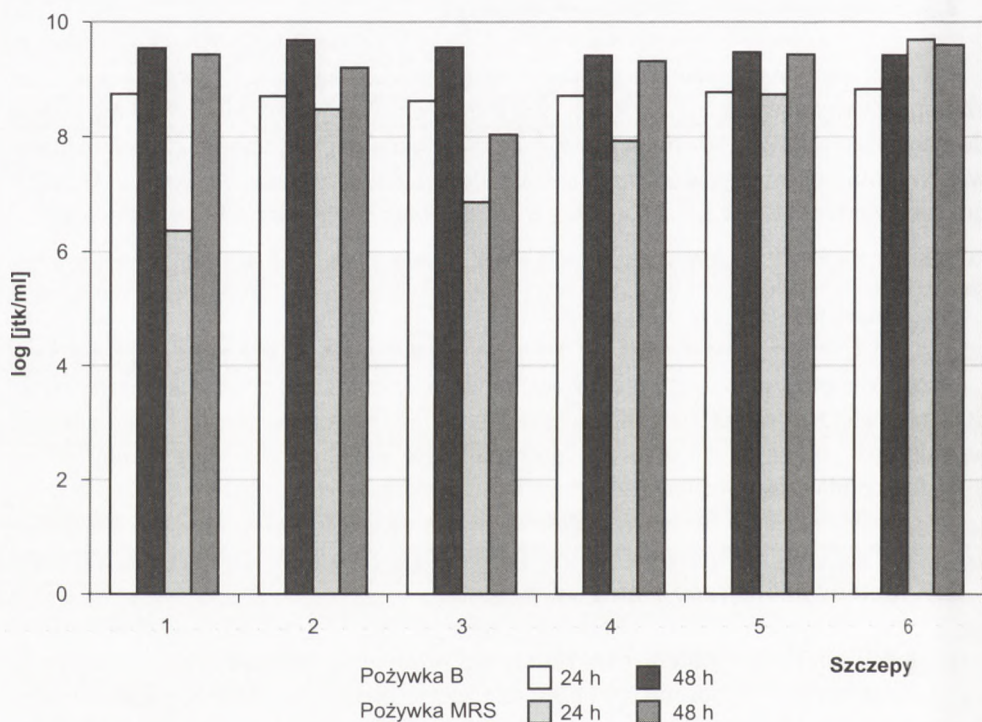
- Białko ogólne oznaczano zgodnie z normą PN-A -79083-9 „Sóló browarny”.
- Suchą masę oznaczano metodą wagową przy użyciu wagosuszarki.
- Liczbę bakterii fermentacji mlekowej oznaczano metodą posiewów na stałą pożywcę Szembera (17).

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1. Dobór szczepu

Ocenę cech biotechnologicznych badanych szczepów przeprowadzono na podstawie ich zdolności do namnażania oraz wytwarzania kwasu mlekowego w tym formy L(+).

Porównując zdolność do namnażania badanych bakterii stwierdzono, że większość szczepów osiągała najlepszy wzrost po 48 godz. hodowli zarówno w zmodyfikowanej pożywce MRS jak i brzeckowej firmy Merck (rys. 1). Liczba żywych komór-

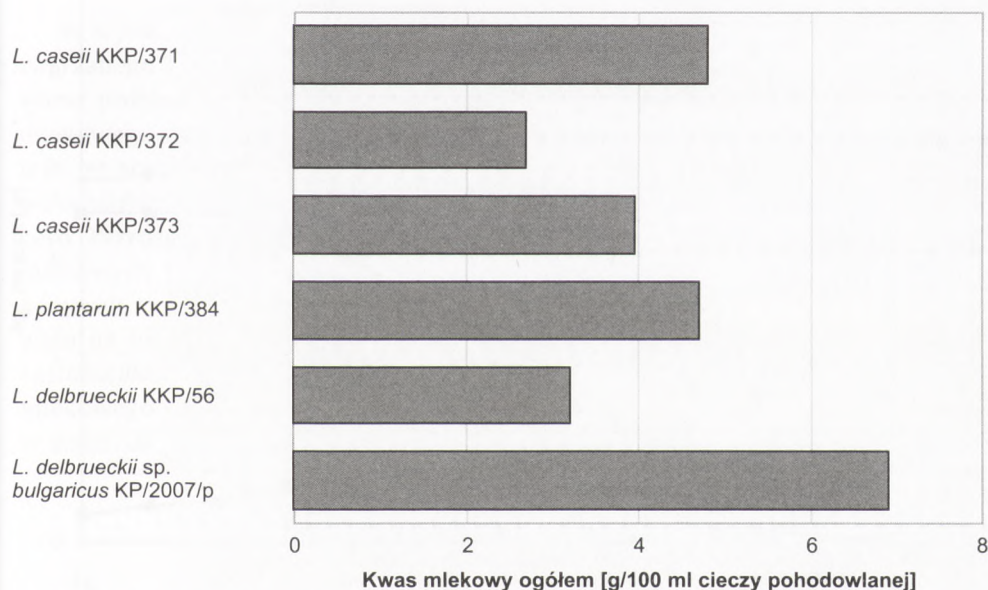


Rys. 1. Zdolność do namnażania badanych szczepów w pożywce brzeckowej [B] i MRS z laktozą [MRS]. 1 – *L. caseii* KKP/271; 2 – *L. caseii* KKP/272; 3 – *L. caseii* KKP/273; 4 – *L. plantarum* KKP/384; 5 – *L. delbrueckii* KKP/56; 6 – *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* KKP/2007/p.

rek mieściła się w zakresie  $1,1-4,8 \times 10^9/\text{ml}$ . Tylko w przypadku szczepu *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l intensywny wzrost odnotowano już po 24 godzinach hodowli w pożywce MRS z laktozą. Liczba żywych komórek wynosiła  $4,8 \times 10^9/\text{ml}$ .

Zdolność badanych szczepów do biosyntezy kwasu mlekowego oceniono na podstawie wyników prób fermentacyjnych w pożywce z serwatką (rys. 2). Najlepszym producentem kwasu mlekowego okazał się szczep *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l. W pożywce P1a wytwarzał on 6,9 g kwasu mlekowego ogółem na 100 ml cieczy pohodowlanej po 72 godzinach hodowli w temp.  $43^\circ\text{C}$ , czyli o 30-61% więcej w porównaniu z ilością kwasu mlekowego otrzymaną w hodowlach pozostałych szczepów. Ilość wytworzonego kwasu mlekowego w formie izomeru L(+) była dla tego szczepu również najwyższa i wynosiła ponad 90% jego ogólnej ilości.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki do dalszych badań wytypowano szczep *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l.

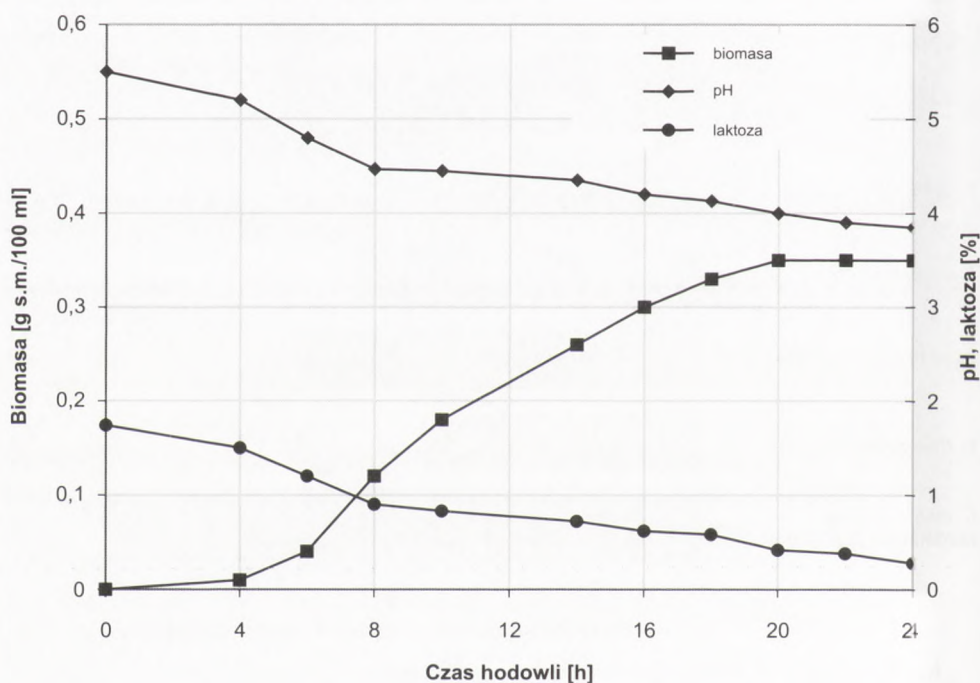


Rys. 2. Wytwarzanie kwasu mlekowego przez badane szczepy z rodzaju *Lactobacillus* w hodowlach prowadzonych metodą stacjonarną w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  (*L. casei*, *L. plantarum*),  $50^\circ\text{C}$  (*L. delbrueckii*) i  $43^\circ\text{C}$  (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l) w pożywce P1a; [warunki hodowli: 48-godz. materiał posiewowy w ilości 10% namnożony w pożywce MRS z laktozą; czas hodowli – 72 godz.].

### 3.2. Biosynteza kwasu mlekowego przez szczep *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l w pożywce z serwatką

Oceniając dynamikę procesu namnażania *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l w pożywce MRS z laktozą stwierdzono, że po 20 godzinach hodowli kończy się faza intensywnego przyrostu biomasy (rys. 3). Znalazło to odbicie w istotnych zmianach pH środowiska hodowlanego i zawartości laktozy. Po tym czasie hodowli pH obniżyło się z wartości 5,5 do 4,0, a wykorzystanie laktozy wynosiło 76%.

W celu określenia wpływu wieku i dawki materiału posiewowego na biosyntezę kwasu mlekowego zastosowano 8-, 12-, 18- i 24-godzinną hodowlę szczepu w pożywce MRS z laktozą (tab. 1). Najkorzystniejszy efekt biosyntezy kwasu mlekowego po 72 godz. hodowli uzyskano stosując 18-godzinny materiał posiewowy w ilości 10%. Stosując 18-godzinny materiał posiewowy w ilości 5% zaobserwowano zmniejszenie ilości wytworzonego kwasu mlekowego o 12,4%. Również wyniki badań uzyskane przez Badran i Reichart (20) wykazały, że zwiększenie dawki inokulum (z 3do 5%) wpływało w istotny sposób na ilość wytwarzanego kwasu mlekowego przez szczep *L. bulgaricus*. W piśmiennictwie podawane są różne dane dotyczące dawki i wieku materiału posiewowego stosowanego w hodowlach szczepów z gatunku *L. delbrueckii*.



Rys. 3. Dynamika procesu namnażania biomasy bakterii *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l w pożywce MRS z laktozą w temperaturze 43°C.

Arasaratnam i in. (10) prowadząc proces biosyntezy kwasu mlekowego w pożywce z serwatką przy użyciu szczepu *L. delbrueckii* zastosowali 24-godzinny materiał posiewowy w ilości 10%. Severson i Barrett (13) preferowali 12-godzinne inokulum w ilości 5% w przypadku hodowli szczepu *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* w pożywce produkcyjnej zawierającej serwatkę. Natomiast Monteaquedo i in. (6) jako inokulum stosowali 15-godzinną hodowlę szczepu *L. delbrueckii* w pożywce MRS w ilości 5,14%.

Tabela 1

Wpływ wieku i dawki materiału posiewowego na wytwarzanie kwasu mlekowego przez *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l w hodowli w pożywce P1a w temperaturze 43°C

Materiał posiewowy wiek [h]	Kwas mlekowy ogółem [g/100 ml pożywki]		
	dawka [%]	48 godz. hodowli	72 godz. hodowli
8	10	4,5	6,0
12	10	4,9	6,5
18	5	4,9	6,4
	10	5,4	7,3
	15	5,5	7,5
24	10	5,2	7,2

W wyniku przeprowadzonych prób fermentacyjnych stwierdzono, że ilość wytwarzanego kwasu mlekowego oraz wydajność procesu zależała od składu zastosowanej pożywki (tab. 2). Wydajność procesu wyrażono jako stosunek ilości kwasu mlekowego w formie L(+) i D (-) powstającego w trakcie fermentacji do ilości zużytego w procesie cukru. Wzbogacenie pożywek w autolizat drożdżowy spowodowało zarówno wzrost ilości wytwarzanego kwasu mlekowego jak i wydajności procesu. Wzrost ten był jednak zróżnicowany, np. w hodowli w pożywkach wysoko-białkowych był mniej znaczący. Z danych literaturowych wynika, że wzbogacenie pożywek z serwatką w dodatkowe źródła azotu, np. namok kukurydziany (21) wpływało na intensyfikację biosyntezy kwasu mlekowego przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Aeschlimann i von Stockar (22) w celu zwiększenia wytwarzania kwasu mlekowego proponują dodanie do pożywki z serwatką ekstraktu drożdżowego w ilości 10 g/l.



Tabela 2

Wpływ składu pożywki na wytwarzanie kwasu mlekowego przez szczep *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l w hodowli w temperaturze 43°C

Rodzaj pożywki	Czas hodowli [h]	Ilość kwasu mlekowego [g/100 ml płynu pohodowlanego]		Cukry red. w przeliczeniu na laktozę [%]	Wydajność [%]
		forma L(+)	forma D(-)		
P1a	72	6,9	0,16	0,15	71,1
P1		4,0	0,2	2,7	57,1
P2a		7,0	0,1	0,05	71,1
P2		6,5	0,1	0,3	68,1
P3a	44	3,6	0,1	0,2	97,1
P3		3,0	0,1	0,4	86,1

W hodowlach prowadzonych w pożywkach z rozcieńczoną serwatką spryszkowaną [P1, P1a, P2 i P2a] maksymalną ilość kwasu mlekowego ogółem (ok. 7,1 g/100 ml cieczy pohodowlanej) otrzymano po 72 godzinach w pożywkach wzbogaconych autolizatem drożdżowym. Wydajności procesu wynosiła ok. 71,0%. Izomer L(+) kwasu mlekowego stanowił ok. 98% kwasu mlekowego ogółem. W przypadku stosowania pożywek z serwatką płynną zaobserwowano skrócenie czasu procesu biosyntezy. Maksymalną ilość kwasu mlekowego (3,7 g/100 ml cieczy pohodowlanej), a także najwyższą wydajność procesu wynoszącą 97,3% uzyskano już po 44 godz. hodowli w pożywce zawierającej płynną serwatkę o początkowej zawartości laktozy 4% i białka 1% wzbogaconej również autolizatem drożdżowym [P3a]. Ilość wytworzonego w wymienionych warunkach kwasu L(+) mlekowego stanowiła ponad 97% sumy izomerów L i D. Podobne wyniki w hodowli szczepu *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* uzyskał Severson i Barrett (13) stosując pożywkę z serwatką oraz Hofendahl i Haln-Hägerdal (23) w pożywce zawierającej hydrolizat mąki pszennej. Wytworzony kwas mlekowy w formie izomeru L(+) stanowił około 100% jego ogólnej ilości.

#### 4. Podsumowanie

Spośród przebadanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* najlepszym producentem kwasu mlekowego w pożywce z serwatką okazał się szczep *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* s/l. Wysoki poziom wytwarzania izomeru L(+) kwasu mlekowego kwalifikuje wymieniony drobnoustrój jako szczep o wysokiej wartości użytkowej w przemyśle spożywczym. Najwyższą wydajność procesu (97,3%) uzyskano po 44 godzinach hodowli wymienionego szczepu w pożywce zawierającej płynną serwatkę wzbogaconą autolizatem drożdżowym. Stwierdzono, że wzbogacanie pożywek zawierających serwatkę w dodatkowe źródło azotu powodowało intensyfikację procesu biosyntezy. Najkorzystniejszy wynik biosyntezy uzyskano stosując jako materiał posiewowy 18-godziną hodowlę szczepu w pożywce MRS z laktozą w ilości 10%.

## Literatura

1. Duxburg D. D., (1993), *Food Processing*, 54, 5, 97-98.
2. El-Sabaeny A. H., (1996), *Microbiologica*, 12, 3, 411-416.
3. Veringa H. A., (1987), Patent No EP 0232556 A1.
4. Hujanem M., Linko S., Linko Y. Y., Leisola M., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 126-130.
5. Ragout A., Pesce A., Oliver G., Sineriz F., (1989), *Biochimie*, 71, 639-644.
6. Monteagudo J.H., Rodriguez L., Rincon L., Fuertes J., (1994), *Acta Biotechnol.*, 14, 3, 251-260.
7. Montelongo J., Chassy B. M., McCord J. D., (1993), *J. of Food Science*, 58, 4, 863-866.
8. Richter K., Traeger A., (1994), *Acta Biotechnol.*, 14, 367-378.
9. Yumoto I., Ikeda K., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17, 543-546.
10. Arasaratnam V., Senthuran A., Balasubramaniam K., (1996), *Enzyme. Microb. Technol.*, 19, 7, 482-486.
11. Roukas T., Kotzekidou P., (1996), *Food Biotechnol.*, 10, 3, 231-242.
12. Zayed G., Winter J., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 3/4, 362-366.
13. Severson D. K., Barrett Ch. L., (1995), US Patent No 5416020.
14. Ricon J., Fuertes J., Moya A., Monteagudo J. M., Rodriguez L., (1993), *Acta Biotechnol.*, 4, 323-331.
15. Rzędowska H., Brzozowska M., Lipiec M., Sawicka R., Skiba J., (1969), *Katalog kultur drobnoustrojów przemysłowych*, 9, IPF, Warszawa.
16. Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H., (1983), *Mikrobiologia żywności*, PZWL, Warszawa.
17. Zlotkowska H., Ilnicka-Olejniczak O., (1996), *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 51, 82-94.
18. Metoda oznaczania kwasu L(+) i D(-) mlekowego – testy firmy Boehringer Mannheim GmbH.
19. Miller G. L., (1959), *Analytical Chem.*, 31, 3, 426-428.
20. Badran I. I., Reichart O., (1995), *Acta Alimentaria*, 24, 3, 277-287.
21. Amrane A., Prigent Y., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 4, 379-383.
22. Aeschlimann A., Stockar U., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 811-816.
23. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 301-307.