



Właściwości i przydatność β -galaktozydazy z różnych źródeł

Józef Synowiecki, Jadwiga Maciuńska

Katedra Chemii i Technologii Żywności

Wydział Chemii

Politechnika Gdańska, Gdańsk

Suitability and properties of β -galactosidases from different sources

Summary

The article reviews the progress of investigations of β -galactosidases from microbial sources. These enzymes show great differences in optimal conditions of lactose hydrolysis and their utilisation creates new possibilities to improve milk and milk by-products processing. Some β -galactosidases from extreme thermophiles have significant activity above 100°C. Possible applications and interrelationship of both molecular structure and thermostability of these enzymes are also discussed.

Key words:

β -galactosidase, thermostable enzymes, thermophiles, enzyme engineering.

1. Wprowadzenie

Negatywnym skutkiem nietolerancji laktozy, której symptomy przejawia około 30% ludzi na świecie oraz trudnościom technologicznym wywołanym występowaniem tego cukru w mleku i serwatce można zapobiec poprzez hydrolizę enzymatyczną katalizowaną β -galaktozydazą. Stosuje się ją głównie w celu wytworzenia dietetycznego mleka i jego przetworów, jogurtów, przydatnych w cukiernictwie syropów glukozowo-galaktozowych i słodzików, bezlaktozowej skondensowanej serwatki używanej w produkcji lodów i fermentowanych napojów, oraz suszonej serwatki wchodzącej w skład paszy trzody chlewnej, bydła i zwierząt futerkowych. Hydroliza laktozy w tych produktach eliminuje niepożądaną krystalizację disacharydu

Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,
Katedra Chemii
i Technologii Żywności,
Wydział Chemii,
Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza,
11/12, 80-952 Gdańsk.

biotechnologia

1 (48) 117-123 2000

w niskiej temperaturze, zwiększa słodkość wyrobów i umożliwia fermentację rozmaitych produktów ubocznych przemysłu mleczarskiego przez organizmy źle przyswajające laktozę.

2. Właściwości enzymów hydrolizujących laktozę

Źródłem β -galaktozydazy mogą być tkanki roślinne lub zwierzęce oraz drożdże, grzyby strzępkowe i bakterie. Zależnie od pochodzenia enzymu β -galaktozydazy różnią się strukturą i ilością podjednostek, masą cząsteczkową, aktywnością, termostabilnością, wrażliwością na działanie inhibitorów i aktywatorów oraz optymalnymi warunkami reakcji. Umożliwia to dostosowanie rodzaju enzymu do właściwości surowca i warunków procesu. Wyizolowane z *Aspergillus niger* i innych grzybów strzępkowych preparaty o maksymalnej aktywności przy pH 4,0-4,5 są przydatne głównie do hydrolizy laktozy w kwaśnej serwatce (1). Natomiast β -galaktozydazę wytwarzaną przez drożdże *Kluyveromyces lactis* o optymalnym pH 6,8-7,0 stosuje się w przetwórstwie mleka (pH 6,6) i słodkiej serwatki (pH 6,2). β -galaktozydazy z pleśni są bardziej stabilne w środowisku kwaśnym oraz mają lepszą termostabilność niż pochodzące z drożdży.

Wytwarzanie enzymu przez niektóre mikroorganizmy zależy od stężenia w pożywce β -D-galaktozydów spełniających funkcję induktorów. Komórka *Escherichia coli* rosnąca na pożywce bez laktozy zawiera tylko około 10 cząsteczek β -galaktozydazy, których liczba wzrasta do kilku tysięcy po wprowadzeniu induktora (2). Razem z β -galaktozydazą syntetyzowana jest permeaza galaktozydowa regulująca transport laktozy przez błonę komórkową oraz acetylotransferaza tiogalaktozydowa uczestnicząca w metabolizmie laktozy. Najsilniejsze oddziaływanie indukujące wywiera 2-propylo- β -D-tiogalaktozyd (IPTG), nie ulegający zresztą hydrolizie pod wpływem β -galaktozydazy, oraz metylo- β -D-tiogalaktozyd. Ich obecność w środowisku rozwoju *Escherichia coli* zwiększa ilość wytwarzanego enzymu do około 6-7% wszystkich białek komórkowych. Skutecznymi induktorami wytwarzania β -galaktozydaz drożdżowych i z innych mikroorganizmów są też galaktoza i w nieco mniejszym stopniu laktoza. Oddziaływanie glukozy zależy od jej stężenia w środowisku rozwoju mikroorganizmów. Przy małym stężeniu nie przekraczającym 1mM cukier ten jest induktorem wytwarzania β -galaktozydazy, np. przez drożdże *Kluyveromyces fragilis* (3). Natomiast przy większej zawartości glukozy następuje silna represja kataboliczna wytwarzania enzymu. β -galaktozydaza jest zazwyczaj enzymem wewnątrzkomórkowym. Jednak niektóre grzyby strzępkowe, jak np. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus* i *Skopulariopsis* sp., wydzielają go na zewnątrz komórek (4).

Centrum aktywne podjednostki β -galaktozydazy zawiera grupę tiolową, oraz resztę imidazolową. Uczestniczą one w przegrupowaniu nukleofilowym wywołującym hydrolizę β -D-galaktozydów z szybkością zależną od budowy chemicznej aglikonu. Z tego powodu maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) rozkładu *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu stosowanego często do pomiaru aktywności enzymu jest wyższa, a stała Michaelisa (K_m) mniejsza niż w przypadku hydrolizy laktozy. Na szybkość reakcji wpływa m.in. liczba i malejąca wraz z temperaturą dostępność centrów aktywnych. Zaobserwowano to w przypadku β -galaktozydazy z *Escherichia coli*, w której następowało około 4-krotne zmniejszenie licz-

by dostępnych centrów aktywnych po obniżeniu temperatury z 20°C do 5°C (5). Masa cząsteczkowa podjednostki β -galaktozydazy zależy od jej pochodzenia i zmienia się nawet w przypadku enzymów pochodzących z rozmaitych szczepów tego samego gatunku drożdży, grzybów i bakterii (4-7). Spośród organizmów mezofilnych najmniejszą masę cząsteczkową (90–126 kDa) mają zewnątrzkomórkowe β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* i *Aspergillus foetidus*, a największą, dochodzącą do 2000 kDa wewnątrzkomórkowy enzym wytwarzany przez drożdże *Kluyveromyces fragilis* (4). Jeszcze mniejsze (75 kDa) są cząsteczki β -galaktozydazy z niektórych bakterii termofilnych (8). Nawet duże różnice ciężaru cząsteczkowego nie wykluczają jednak podobieństwa aktywności i optymalnych warunków reakcji enzymatycznej. Natomiast β -galaktozydazy o prawie takim samym ciężarze cząsteczkowym często różnią się dość znacznie temperaturą i optymalnym pH działania, termostabilnością, punktem izoelektrycznym, a nawet składem aminokwasowym (9). Niekiedy różne β -galaktozydazy są wytwarzane w tkankach tego samego organizmu. Komórki śluzówki jelit człowieka i niektórych innych ssaków wytwarzają lizosomalną β -galaktozydazę o maksymalnej aktywności przy pH 3,0, niezbędną w przemianach glikoprotein i mukopolisacharydów. Enzym ten nie powoduje hydrolizy laktozy z powodu wyższego pH przewodu pokarmowego i małego przenikania tego cukru do wnętrza komórek. Drugi rodzaj enzymu łatwo rozkładający laktozę przy pH 6,0 jest natomiast wydzielany przez kosmki jelitowe (4). Zależnie od pochodzenia β -galaktozydazy są zazwyczaj kompleksem kilku identycznych lub nieco różnych podjednostek, stabilizowanych m.in. oddziaływaniami jonowymi i mostkami solnymi wytworzonymi z udziałem wielowartościowych kationów (10).

Znajdujące się w środowisku reakcji kationy są niekiedy aktywatorami enzymu, ale też często nie wywierają żadnego wpływu na aktywność, bądź też działają jako inhibitory. Aktywność β -galaktozydaz pochodzących z mikroorganizmów zazwyczaj wzrasta w obecności Na^+ , K^+ i Mg^{2+} (4-6,11). Natomiast jony Ca^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{2+} i Hg^{2+} są inhibitorami reakcji lub nie powodują zmian aktywności (4,12,13). Dwuwartościowe kationy Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} nie zmieniają też aktywności β -galaktozydazy z *Mucor pusillus* (14). Zróżnicowanie oddziaływania rozmaitych jonów jest spowodowane zarówno ich niejednakową skutecznością katalizowania oksydacji grup tiolowych, prowadzącej do inaktywacji preparatu, jak i zdolnością do stabilizowania konformacji cząsteczek zapewniającej najlepszą aktywność. Przyczyną różnego wpływu kationów na rozmaite enzymy może być też ochronne oddziaływanie innych znajdujących się w ich cząsteczkach grup -SH łatwiej utlenianych od grup tiolowych centrum aktywnego. Obecność kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i innych chelatorów zwiększa stabilność enzymu, prawdopodobnie wskutek wiązania kationów katalizujących oksydację grup tiolowych znajdujących się w centrum aktywnym. Zabezpieczenie przed ich utlenianiem jest przypuszczalną przyczyną stabilizującego enzym oddziaływania merkaptoetanolu, cysteiny czy ditiotreitolu. Efektu tego nie stwierdzono jednak w przypadku β -galaktozydazy z *Mucor pusillus* (14). Utleniający grupy tiolowe kwas jodooctowy prawie całkowicie inaktywuje enzym wytwarzany przez termofilną bakterię *Thermus aquaticus* (6).

Zależnie od stężenia, laktoza i produkty jej hydrolizy oraz niekiedy inne cukry są inhibitorami β -galaktozydazy. Skuteczność hamowania reakcji zależy m.in. od pochodzenia enzymu i rodzaju cukru. W przypadku β -galaktozydazy z *Thermus aquaticus* przy 10 mM

stężeniu laktozy, glukozy lub galaktozy następowało zmniejszenie aktywności enzymu odpowiednio o 22, 46 i 30% (6). Niekiedy tylko jeden produkt hydrolizy wywiera dominujące oddziaływanie. Glukoza o 10 mM stężeniu prawie nie wpływa na aktywność enzymu z *Mucor pusillus*, a galaktoza o tym samym stężeniu zmniejsza ją prawie o 80% (14). Galaktoza natomiast jest znacznie mniej skutecznym inhibitorem termostabilnej β -galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus* od glukozy wywołującej około 100-krotne obniżenie aktywności enzymu (15). Galaktoza, laktoza, galaktozamina i ryboza są silnymi inhibitorami β -galaktozydazy *Candida pseudotropicalis*, zaś glukoza i fruktoza prawie nie wpływają na aktywność (16). Inhibicja produktami reakcji jest przyczyną nieproporcjonalnych do stężenia enzymu i czasu reakcji zmian stopnia hydrolizy laktozy (tab. 1). Podwojenie ilości enzymu z *Aspergillus niger* zastosowanej do hydrolizy laktozy w słodkiej serwatce zwiększa szybkość reakcji tylko o 60% (17). Wskutek wzrostu stężenia produktów reakcji następuje też stopniowe zmniejszanie szybkości hydrolizy. Obniża to wykorzystanie enzymu i zwiększa koszt procesu. Wpływ ten można znacznie zmniejszyć stosując reaktory z unieruchomioną β -galaktozydazą, w których enzym znajdujący się na początku kolumny działa w środowisku o jeszcze bardzo małym stężeniu produktów hydrolizy. Zastosowanie reaktora kolumnowego z unieruchomioną β -galaktozydazą z *Aspergillus niger* umożliwiło uzyskanie szybkości hydrolizy laktozy o 30-36% większej niż w przypadku reakcji hydrolizowanej preparatem enzymu dodawanym bezpośrednio do roztworu substratu (17). Podczas długotrwałej pracy reaktora z unieruchomionym enzymem często następuje zanieczyszczenie mikrobiologiczne urządzenia. Można temu przeciwdziałać stosując termostabilne β -galaktozydazy aktywne w temperaturze znacznie ograniczającej niepożądany rozwój drobnoustrojów.

Tabela 1

Przyrost stopnia hydrolizy laktozy (%) wywołany 2-krotnym zmniejszeniem szybkości przepływu substratu przez reaktor z unieruchomioną β -galaktozydazą z *Aspergillus niger*

Rodzaj substratu	pH	Stopień hydrolizy (%) przy natężeniu przepływu (cm ³ /min)		Przyrost stopnia hydrolizy (%)
		70	35	
5% roztwór laktozy	4,7	40	65	62,5
kwaśna serwatka	4,7	43	61	41,8
słodka serwatka	6,0	15	24	60,0

Opracowano wg (17).

3. Termostabilne β -galaktozydazy

Dotychczas poznano niewiele termostabilnych β -galaktozydaz. Enzymy te wykazujące w niektórych przypadkach maksymalną aktywność w temperaturach 102-105°C są zazwyczaj oligomerem 2 lub 4 podjednostek lub występują w postaci monomeru. Zależnie od

pochodzenia masa cząsteczkowa podjednostki zmienia się w granicach od 52 do 137 kDa (8,15,18-21).

Wzrost termostabilności enzymów niektórych mikroorganizmów zapewniły mutacje ograniczające swobodę zmian konformacji cząsteczek w stanie rodzimym i zwiększające różnicę energii swobodnej (ΔG) pomiędzy stanem rodzimym i zdenaturowanym białek, wynoszącą zazwyczaj zaledwie 40-80 kJ/mol (22,23). Jest to najczęściej skutkiem tworzenia nowych wiązań stabilizujących strukturę cząsteczek oraz wyeliminowania lub osłabienia oddziaływań destabilizujących, jak np. odpychania jednoimiennie zjonizowanych grup funkcyjnych, ograniczenia stopnia swobody fragmentów łańcucha polipeptydowego lub poszczególnych grup funkcyjnych oraz usunięcia reszt aminokwasowych wywołujących naprężenia steryczne. Szybkość denaturacji obniżają też mutacje wprowadzające do cząsteczek białka aminokwasy utrudniające zmiany konformacji. Największe jej fluktuacje są możliwe w otoczeniu reszt glicyny zawierających zamiast węgla β atom wodoru nie przeciwdziałający odkształceniom α -helisy pod wpływem oddziaływań środowiska. Zamiana glicyny na każdy inny aminokwas zapewnia zatem wzrost stabilności cząsteczki w stopniu zależnym od wielkości grupy funkcyjnej przy węglu α . Rozgałęzione reszty leucyny i izoleucyny zmniejszają jednak termostabilność wskutek tworzenia szczelin w strukturze cząsteczek zwiększających powierzchnię oddziaływania białka ze środowiskiem. Natomiast alanina, której grupa metylowa nie odkształca sąsiednich fragmentów łańcucha polipeptydowego zwiększa stabilność struktury fałdowej lub α -helisy. Aminokwasem najlepiej przeciwdziałającym przyrostowi entropii jest prolina występująca w postaci pierścieni usztywniających wiązania peptydowe oraz wprowadzających zawadę steryczną ograniczającą stopień swobody sąsiednich grup funkcyjnych. Przyrost termostabilności następuje także poprzez zwiększenie udziału domen hydrofobowych w białku. Wskutek oddziaływania ze środowiskiem tworzą one ściśle upakowany rdzeń otoczony powłoką hydrofilnych reszt aminokwasowych w którym poszczególne fragmenty łańcucha polipeptydowego mają niewielki stopień swobody i są mało podatne na wpływ sił entropii ze strony środowiska o podwyższonej temperaturze. Natomiast reszty hydrofobowe pozostające na powierzchni cząsteczek zazwyczaj zmniejszają stabilność enzymów. Jednym z wyjątków jest termolizyna z *Bacillus stearothermophilus*, której eksponowana do środowiska reszta fenyloalaniny uczestniczy w tworzeniu na powierzchni cząsteczek stabilizujących oddziaływań hydrofobowych. Zjonizowane grupy funkcyjne stabilizują cząsteczki tylko w przypadku gdy mają one przeciwne ładunki elektryczne. Natomiast siły odpychania reszt aminokwasowych o jednoimiennych ładunkach zmniejszają termostabilność, z wyjątkiem oddziaływania tych grup funkcyjnych, które tworzą mostki solne z udziałem wapnia magnezu lub innych wielowartościowych kationów. Ich usunięcie zrównuje ciepłoodporność niektórych termostabilnych enzymów z analogicznymi enzymami organizmów mezofilnych (22,24). Wpływ oddziaływań jonowych w dużym stopniu zależy od ich rozmieszczenia. Wiązania znajdujące się na powierzchni cząsteczek mają mniejszą energię od umiejscowionych w rdzeniu wskutek solwatacji grup funkcyjnych cząsteczkami wody o dużej stałej dielektrycznej. W zapewniających wzrost termostabilności zmianach budowy enzymów znacznie częściej następuje usuwanie wiązań jonowych o destabilizującym oddziaływaniu niż tworzenie nowych wiązań powodujących wzrost termostabilności.

Przyczyny odporności cieplnej β -galaktozydaz są dotychczas mało zbadane i w dostępnym piśmiennictwie nie ma jeszcze informacji, które z wymienionych oddziaływań mają największe znaczenie. Wyniki badań β -galaktozydazy wyizolowanej z *Saccharopolyspora rectivirgula* wskazują na udział mostków solnych wytworzonych za pośrednictwem Ca^{2+} , Mn^{2+} i Mg^{2+} . Usunięcie tych kationów chelatorami znacznie zmniejsza odporność cieplną enzymu (19). Obniżenie termostabilności β -galaktozydaz z *Sulfolobus solfataricus* i *Thermus aquaticus* następuje natomiast po rozszczepieniu stabilizujących cząsteczki enzymu wiązań disulfidowych (15).

Poszczególne termostabilne β -galaktozydazy różnią się powinowactwem do substratu, co w przypadku hydrolizy *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu (ONPG) wywołuje zmiany stałej Michaelisa (K_m) w zakresie 0,15-9,50 mM. Podobnie do enzymów z rozmaitych mikroorganizmów mezofilnych wartości K_m zależą też w dużym stopniu od rodzaju substratu i dla reakcji hydrolizy laktozy lub ONPG katalizowanych β -galaktozydazą z *Stenigmatomyces elviae* wynoszą odpowiednio 2,4 mM i 9,5 mM (12). β -galaktozydazy wytwarzane przez hipertermofilne archebakterie są często mało specyficzne (25). Przykładem są enzymy z *Sulfolobus solfataricus* i *Pyrococcus furiosus* przejawiające zarówno aktywność β -galaktozydazy jak i β -glukozydazy.

Ograniczenie swobody zmian konformacji centrum aktywnego termostabilnych β -galaktozydaz jest przyczyną niewielkiej ich aktywności w temperaturze działania enzymów z mikroorganizmów mezofilnych. Przykładem jest β -galaktozydaza z hipertermofilnej archebakterii *Sulfolobus solfataricus*, wykazująca w optymalnej temperaturze działania analogicznego enzymu z *Escherichia coli* tylko 5% aktywności osiąganą w 100°C (15). W przypadku niektórych termostabilnych β -galaktozydaz określona równaniem Arrheniusa prostoliniowa zależność aktywności właściwej od temperatury reakcji ma załamanie przejawiające się u enzymu z *Sulfolobus solfataricus* w temperaturze 65°C (15). Powyżej tej temperatury następuje znaczne zmniejszanie energii aktywacji z 74,5 kJ/mol do 29,8 kJ/mol, a w konsekwencji duży wzrost aktywności wywołany prawdopodobnie zaistnieniem korzystnej dla działania enzymu zmiany konformacji jego cząsteczek. Jest to też przypuszczalną przyczyną około 8-krotnego zwiększenia aktywności β -galaktozydazy z *Saccharopolyspora rectivirgula* inkubowanej 20 min w temperaturze 60°C (19).

Termostabilne β -galaktozydazy wytwarzają niektóre termofilne eubakterie i archebakterie rozwijające się w temperaturach 70-113°C. Jedną z najwyższych dotychczas stwierdzonych wartości optymalnej temperatury rozwoju przejawiają hipertermofilne bakterie *Pyrolobus fumaris* rosnące pod zwiększonym ciśnieniem jeszcze w 120°C (26). Możliwość hodowli takich bakterii w skali wystarczającej do produkcji enzymów zależy od: wrażliwości na tlen, metabolizmu bakterii i związanego z tym składu pożywki oraz od toksyczności i oddziaływania korozyjnego wydzielanych produktów (27). Tylko niektóre termofile są tlenowcami, rozwijającymi się zresztą niekiedy dopiero przy ograniczonym stężeniu tlenu. W naturalnym środowisku rozwoju hipertermofile asymilują głównie siarkę elementarną, siarczki, siarczyny i siarczany, wodór, tiosiarczany oraz tlenek węgla, wydzielając zazwyczaj toksyczne lub silnie korodujące metabolity, jak np. siarkowodór lub wytwarzany przez *Sulfolobus solfataricus* kwas siarkowy (15,20). Wytwarzające β -galaktozydazę i aktywne do temperatury około 120°C archebakterie *Pyrococcus furiosus* dobrze rozwijają się na pożywkach zawierających ekstrakt drożdżowy, pepton

kazeinę i skrobię lub maltozę, produkując kwas octowy wodór i dwutlenek węgla (25). Zwiększenie wydajności biomasy można uzyskać wprowadzając do pożywki siarkę rodzimą, wywołującą jednak wydzielanie toksycznego siarkowodoru. Niepożądane metabolity i wysoka temperatura rozwoju utrudniają hodowlę hipertermofili użytecznych w produkcji enzymów o szczególnie dużej ciepłoodporności. Rozwiązanie tego problemu może zapewnić sklonowanie genu kodującego syntezę termostabilnej β -galaktozydazy do mezofilnego mikroorganizmu rosnącego w niższych temperaturach bez wydzielania niepożądanych produktów.

Literatura

1. Wierzbicki L. E., Kosikowski F. V., (1973), *J. Dairy Sci.*, 56, 1182-1187.
2. Stryer L., (1999), *Biochemia*, 1008-1010, PWN S.A., Warszawa.
3. Dickson R. C., Markin J. S., (1980), *J. Bacteriol.*, 142, 777-789.
4. Kowalewska-Piontas J., (1993), *Przegląd Mlecz.*, 8, 197-200.
5. Shukla T. P., (1975), *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, 5, 325-356.
6. Covan D. A., Daniel R. M., Martin A. M., Morgan H. W., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1141-1145.
7. Craven G. R., Steers E., Anfinsen C. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 2468-2477.
8. Ohtsu N., Motoshima H., Goto K., Tsukasaki F., Matsuzawa H., (1998), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1539-1545.
9. Ogushi S., Yoshimoto T., Tsuru D., (1980), *J. Ferment. Technol.*, 58, 115-122.
10. Steers E., Craven G. R., Anfinsen C. B., Bethune J. L., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 2478-2482.
11. Becker V. E., Evans H. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 95-99.
12. Onishi N., Tanaka T., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4026-4030.
13. Thomas G. V., Kaira M. S., Singh A., (1980), *Indian J. Experim. Biol.*, 18, 1020-1023.
14. Ismail S. A., Mabrouk S. S., Mahoney R. R., (1997), *J. Food Biochem.*, 21, 145-161.
15. Pisani F. M., Rella R., Raia C. A., Rozzo C., Nucci R., Gambacorta A., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 187, 321-328.
16. Castillo F. J., Moreno B., (1983), *J. Dairy Sci.*, 66, 1616-1621.
17. Woychik J. H., Wondolowski M. V., (1973), *J. Milk Food Technol.*, 36, 31-33.
18. Grabnitz F., Seiss M., Rucknagel K. P., Staudenbauer W. L., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 200, 301-309.
19. Harada M., Inohara M., Nakao M., Nakayama T., Kakudo A., Shibano Y., Amachi T., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 22021-22026.
20. Huber G., Drobner E., Huber H., Steter K. O., (1992), *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 502-504.
21. Inohara-Ochiai M., Nakayama T., Nakao M., Fujita T., Ueda T., Ashikari T., Nishino T., Shibano Y., (1998), *Biochim Biophys. Acta*, 1388, 77-83.
22. Daniel R. M., (1996), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 19, 74-70.
23. Sikorski Z. E., (1997), *Proteins the chemical structure and properties*, in: Ed. Sikorski Z. E., *Chemical and Functional Properties of Food Components*, Technomic Publ. Co., Lancaster/Basel, 119-160.
24. Covan D. A., Daniel R. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, 705, 293-305.
25. Kengen W. M., Luesink E. J., Stams A. J. M., Zehnder A. J. B., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 213, 305-312.
26. Barros J. A., Holden J. F., (1996), *Adv. Protein Chem.*, 48, 1-34.
27. Synowiecki J., (1998), *Biotechnologia*, 42, 98-105.