



III KONGRES
BIOTECHNOLOGII



Biosynteza lakazy przez *Cerrena unicolor*: aspekty kinetyczne wzrostu biomasy i produkcji enzymu

Anna Antecka, Marcin Bizukojć, Stanisław Ledakowicz

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Biosynthesis of laccase from *Cerrena unicolor*: kinetic aspects of fungal growth and enzyme production

Summary

In spite of various possible industrial applications of laccase produced by wood-rotting basidiomycetes, the investigations concerning kinetics of the fungal growth are still limited. Thus, the aim of this paper was to describe the growth kinetics of white-rot fungus *Cerrena unicolor* and the synthesis of its secondary metabolite, laccase. Glucose was used as a carbon source in the cultivation and L-asparagine as a nitrogen source. The production of the enzyme appeared to be non-growth associated since it is secreted concomitantly to biomass decay. The formation of laccase occurred to be repressed by glucose, but there was no such strong impact of organic nitrogen content. However, the amount of biomass in the system was influenced by both asparagine and glucose concentration in the medium.

Key words:

laccase, kinetics, *Cerrena unicolor*.

Adres do korespondencji

Anna Antecka,
Katedra Inżynierii
Bioprocessowej,
Wydział Inżynierii
Procesowej
i Ochrony Środowiska,
Politechnika Łódzka,
ul. Wólczańska 213,
90-924 Łódź.

1. Wstęp

Grzyby rozkładające drewno są jedną z ważnych grup organizmów wytwarzających enzymy ligninolityczne (lakazy, peroksydazy), które w warunkach naturalnych uczestniczą w rozkładzie ligninocelulozy będącej trudno biodegradowalnym związkiem chemicznym [1]. Enzymy te charakteryzują się niską specyficznością działania, dzięki czemu mogą być stosowane do rozkładu

szerokiej gamy zanieczyszczeń w tym wielu związków o charakterze ksenobiotyków [2]. W wielu ośrodkach na świecie prowadzone są badania nad zastosowaniem enzymu w różnych procesach przemysłowych. Jednym z nich jest oczyszczanie ścieków przemysłowych [3,4], zawierających związki fenolowe i ich pochodne, jak ligniny, barwniki [5] czy niektóre herbicydy. Innym przykładem wykorzystania lakazy są procesy bielenia masy celulozowej [6], modyfikacji włókien lnianych [7] bądź zastosowanie enzymu jako sensora w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [8].

Cerrena unicolor należy do klasy *Basidiomycetes* i jest gatunkiem wywołującym białą zgniliznę drewna [9]. Występuje głównie na drzewach liściastych, takich jak buk, kasztan, czy klon. W warunkach naturalnych powierzchnia grzyba jest często pokryta algami, co nadaje mu charakterystyczny zielonkawy wygląd [10]. *C. unicolor* syntetyzuje w warunkach nieindukujących duże ilości zewnątrzkomórkowej lakazy (EC 1.10.3.2) utleniającej związki fenolowe i aminy aromatyczne [11,12]. Lakaza ta w formie unieruchomionej zachowuje wysoką aktywność w czasie przechowywania w formie zamrożonej [13,14]. Efektywność syntezy lakazy określano poprzez optymalizację składu podłoża hodowlanego [15], jak również opisano procedurę oczyszczania tego enzymu technikami chromatograficznymi i wyznaczono jego fizykochemiczną charakterystykę [16,17].

Niska wydajność biosyntezy enzymów w warunkach naturalnych uniemożliwia ich praktyczne zastosowanie w skali przemysłowej. Do badań nad zastosowaniem enzymów we wspomnianych procesach przemysłowych niezbędne jest uzyskanie wysoce aktywnych preparatów zapewniających otrzymanie powtarzalnych wyników. Dobór odpowiednich warunków hodowli jest tu szczególnie istotny, gdyż od niego zależy wzrost biomasy i aktywność metabolitów. Procesy biosyntezy z udziałem grzybów stanowią zespół złożonych reakcji biochemicznych, związanych ze zużyciem substratów z podłoża, wzrostem biomasy i produkcją enzymu. Matematyczny opis zachodzących zjawisk służy przewidywaniu wydajności bioprodukcji i pozwala na optymalizację warunków produkcji enzymu.

Biorąc pod uwagę zakres możliwych zastosowań enzymu wiedza dotycząca kinetyki wzrostu grzybów rozkładających drewno jest nadal niewystarczająca. Proponowany przez Tavaresa [18] kinetyczny model produkcji lakazy przez *Trametes versicolor* opiera się na obserwacji zmian tylko jednego substratu w podłożu co z reguły nie jest wystarczające, gdyż do wzrostu każdego organizmu niezbędna jest obecność przynajmniej źródła węgla i azotu. Dlatego przedmiotem pracy było szczegółowe określenie kinetyki wzrostu grzybnicy i akumulacji lakazy przez *Cerrena unicolor* z uwzględnieniem przemian źródła węgla i azotu.

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizm i warunki hodowli

Szczep *Cerrena unicolor* pochodził z kolekcji Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie i był przechowywany na płytkach Petriego zawierających podłoże Lindeberga i Holm zestalone 2% agarom. Do hodowli płynnej zastosowano podłoże Lindeberga i Holm [19] o następującym składzie (w przeliczeniu na 1 l podłoża): glukoza 10 g, L-asparagina 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, KH_2PO_4 0,47 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0,48 g, ekstrakt drożdżowy 0,1 g oraz mikroelementy: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2,5 mg, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 3,2 mg, $Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ 12 mg, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 50 mg, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 3,14 mg, tiamina 0,05 mg. Wszystkie te składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej, pH doprowadzono do wartości 5,5 za pomocą 5 N HCl i sterylizowano termicznie w autoklawie w temperaturze 121°C i nadciśnieniu 0,1 MPa przez 15 minut.

Kolby okrągłodenne (500 ml) zawierające 100 ml wysterylizowanego podłoża zaszczipiano 2,5 ml wstępnie rozdrobnionej grzybni w homogenizatorze T25 basic (8000 obr/min). Kolby były następnie wytrząsane w szafie termostatującej do hodowli wstrząsanej Certomat BS-1 firmy B-Braun w temperaturze 28°C przy 110 obr/min. Hodowlę prowadzono przez 14 dni. W celu wyznaczenia kinetyki pobierano kolejne próby (w następujących godzinach trwania procesu: 24, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 89, 98, 116, 144, 192, 240, 312 godz.) początkowo co 8 godzin, a następnie wraz ze zmniejszeniem dynamiki procesu co 1-2 dni w dwóch powtórzeniach. W próbach oznaczano stężenie glukozy, stężenie azotu i asparaginy, aktywność lakazy i proteaz, suchą masę oraz pH po wcześniejszym oddzieleniu grzybni metodą filtracji na filtrach bibułowych 389 firmy Filtrak.

2.2. Metody analityczne

Zawartość glukozy w podłożu oznaczano za pomocą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Waters 600, USA) w warunkach izokratycznych. Analizę prowadzono na kolumnie SugarPak I o wymiarach 300 mm na 6,5 mm. Jako fazę ruchomą stosowano wodę dejonizowaną MilliQ, która przepływała przez kolumnę z szybkością 1 ml/min. Objętość nastrzyku próby wynosiła 10 μ l. Jako detektor zastosowano detektor refraktometryczny RI (Waters 410, USA). Analiza była sterowana komputerowo przy użyciu programu Millennium 2.15. Błąd oznaczenia pojedynczej próby w trzech powtórzeniach był nie większy niż 3%.

Stężenie azotu w podłożu zostało oznaczone alkacymetrycznie po uprzedniej mineralizacji i oddestylowaniu próby z parą wodną. Użyto aparatu do destylacji B 324 firmy Büchi (Szwajcaria) zgodnie z metodą podawaną przez firmę (Büchi, 2000). Mineralizację prowadzono w obecności stężonego kwasu siarkowego i nad-

tlenku wodoru jako katalizatora. Po ostygnięciu każda próba była alkalizowana za pomocą 30% NaOH, a uwalniany podczas destylacji amoniak był adsorbowany za pomocą 2% roztworu kwasu borowego H_3BO_3 . Miareczkowanie przeprowadzono przy użyciu 0,1 N kwasu siarkowego wobec wskaźnika Kalthoffa. Błąd oznaczenia pojedynczej próby w trzech powtórzeniach był nie większy niż 5%.

Biomasę oznaczano metodą grawimetryczną jako suchą masę i wyrażano w g/l. Błąd oznaczenia pojedynczej próby w trzech powtórzeniach był nie większy niż 8%.

Aktywność lakazy oznaczano metodą spektrofotometryczną z 0,5 mM syryngaldazyną [20] w buforze McIlvaine'a pH 5,6 przy długości fali 525 nm w temperaturze 25°C używając spektrofotometru firmy UNICAM. Czas reakcji wynosił 60 sekund. Tak wyznaczoną aktywność lakazy wyrażano w nkat/l. Błąd oznaczenia pojedynczej próby w trzech powtórzeniach był nie większy niż 10%.

Aktywność proteaz oznaczano testem Kunitza. Próby zawierające 1 ml płynu po hodowlanego preinkubowano przez 5 min w 37°C, po czym dodawano 1 ml kazeiny rozpuszczonej w buforze tris-HCl o pH 8,15. Po 10 min inkubacji w 37°C dodawano 3 ml odczynnika odbiałczającego i całość dokładnie mieszano. W próbie kontrolnej substrat dodawano po odczynniku odbiałczającym. Po ostudzeniu i odwirowaniu, oznaczano supernatant przy długości fali 280 nm. Tak wyznaczoną aktywność proteaz wyrażano w U, gdzie 1U oznacza zmianę absorbancji w ciągu minuty. Błąd oznaczenia pojedynczej próby w trzech powtórzeniach był nie większy niż 10%.

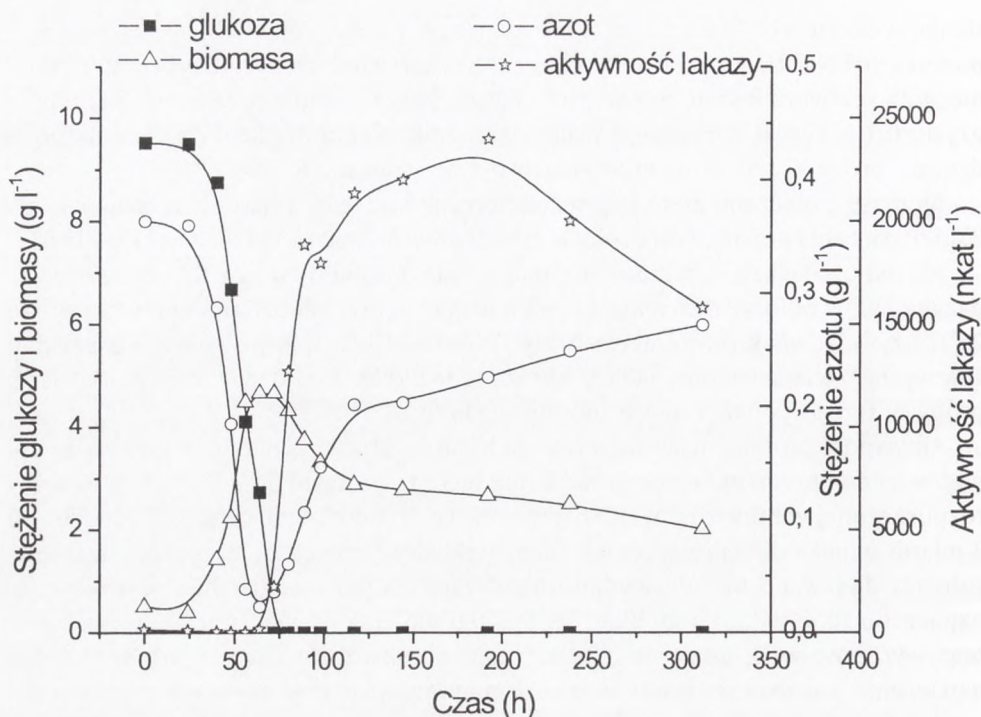
Zawartość asparaginy oznaczano przy użyciu analizatora aminokwasów AAA 400 firmy INGOS (Czechy) przy użyciu programu CHROMULAN 0,72 firmy PIKRON (Czechy). Błąd oznaczenia pojedynczej próby w trzech powtórzeniach był nie większy niż 5%.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Charakterystyka przebiegu procesu biosyntezy *Cerrena unicolor*

W celu określenia kinetyki wzrostu grzybni *Cerrena unicolor* i produkcji lakazy został przeprowadzony proces jej biosyntezy w warunkach optymalnych dla badanego układu [21]. Na rysunku 1 przedstawiono przebieg zmian badanych parametrów: aktywności lakazy, wzrostu biomasy oraz zużycia substratów węgla i azotu w czasie.

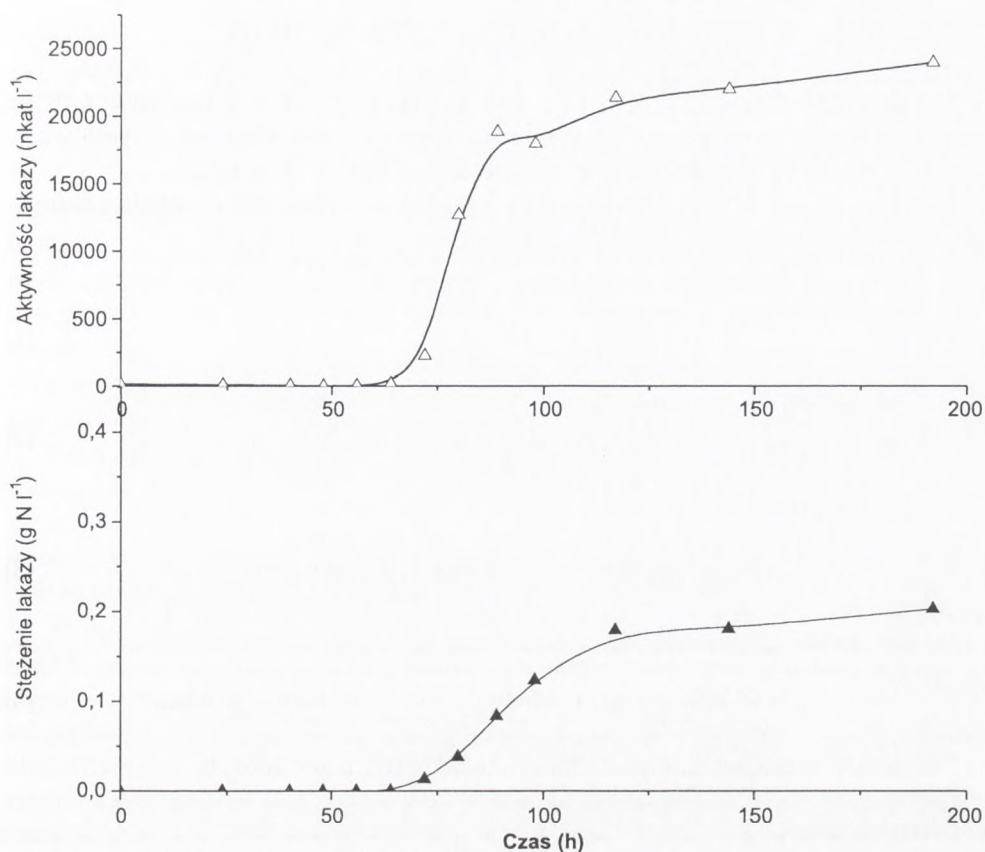
Na początku procesu pojawia się wyraźna faza adaptacji (lag-faza) trwająca około 24 godziny, podczas której nie obserwujemy ani wzrostu grzybni ani asymilacji substratów. Po tym okresie rozpoczyna się szybkie zużycie glukozy – źródła węgla i asparaginy – źródła azotu, towarzyszy temu wykładniczy wzrost biomasy. Wraz z wyczerpywaniem się substratów wykładniczy wzrost biomasy przechodzi w fazę limitowanego wzrostu. Momentowi całkowitego zużycia glukozy odpowiada



Rys. 1. Zmiany stężenia glukozy, azotu, biomasy i aktywności lakazy w czasie hodowli *Cerrena unicolor*.

maksimum stężenia biomasy w układzie. W przypadku asparaginy sytuacja wygląda nieco inaczej. Około 60. godziny hodowli krzywa obrazująca stężenie azotu, odzwierciedlająca zmiany stężenia asparaginy, osiąga wyraźne minimum, po czym stężenie azotu w układzie wzrasta. Ten nietypowy przebieg krzywej azotu może tłumaczyć fakt, że momentowi ponownego wzrostu stężenia azotu odpowiada rozpoczęcie wydzielania się białek, w tym głównie lakazy, do podłoża hodowlanego, co potwierdzają obserwacje poziomu aktywności enzymu w podłożu. W analizie elektroforezy SDS-PAGE [17] wykazano, że lakaza jest podstawowym (jedynym) metabolitem wydzielanym zewnątrzkomórkowo przez *C. unicolor*. Stężenie azotu od momentu osiągnięcia minimum, jak się wydaje, jest zatem ściśle skorelowane z wydzielaniem zewnątrzkomórkowej lakazy i obrazuje produkcję enzymu. Zależność tę przedstawiono na rysunku 2.

Krzywa wzrostu biomasy (rys. 1) po zakończeniu fazy wykładniczego wzrostu (około 60 godz.) charakteryzuje się również nietypowym przebiegiem. W momencie całkowitego wyczerpania źródła węgla i minimalnego, choć zawsze wyższego od zera, stężenia źródła azotu pochodzącego od asparaginy wzrost biomasy stabilizuje się. Stężenie biomasy osiąga wyraźne maksimum po czym zaczyna spadać. W związku z tym w dalszej części przebiegu krzywej wzrostu biomasy nie obserwujemy cha-



Rys. 2. Zmiany stężenia azotu (▲-▲) i aktywności lakazy (△-△) w czasie hodowli *Cerrena unicolor*.

rakterystycznej dla większości mikroorganizmów fazy stacjonarnej, pojawiającej się po wyczerpaniu substratu limitującego [22,23]. Takie obniżenie poziomu biomasy obserwowano wcześniej u grzybów białej zgnilizny drewna [18,24], jednak fakt ten nie był wytłumaczony przez autorów. Zjawisko to, jak się wydaje, jest bezpośrednio związane z przyrostem poziomu aktywności lakazy, czyli produkcją enzymów zewnątrzkomórkowych, które grzyb wydziela w momencie wyczerpania źródła węgla – glukozy. Powodem wydzielania lakazy jest bowiem potrzeba znalezienia nowego substratu stanowiącego źródło łatwo przyswajalnego węgla. W tym samym czasie (ok. 60 godz.) następuje także wzrost stężenia azotu w podłożu, który w tej fazie hodowli może wyłącznie pochodzić od wydzielanego na zewnątrz komórek enzymu. Na podstawie analizy zawartości asparaginy w podłożu wykazano, że po zaprzestaniu jej przyswajania przez *C. unicolor* stężenie asparaginy utrzymuje się na końcowej, stałej wartości do końca trwania hodowli.

3.2. Aspekty kinetyczne wzrostu biomasy i produkcji lakazy

W celu dokładniejszego opisu procesów przebiegających podczas syntezy grzybni *C. unicolor* wyznaczone zostały szybkości objętościowe i właściwe przyrostu biomasy, produkcji enzymu i zużycia substratów glukozy i asparaginy.

Szybkości objętościowe przemian poszczególnych składników układu zdefiniowane są następująco:

– dla biomasy

$$r_x \frac{dc_x}{dt} \quad (1)$$

– dla glukozy

$$r_{GLU} \frac{dc_{GLU}}{dt} \quad (2)$$

– dla L-asparaginy

$$r_{ASP} \frac{dc_N}{dt} \text{ od } t = 0 \text{ do takiego } t, \text{ kiedy } c_N = c_{N_{min}} \quad (3)$$

– dla lakazy

$$r_{LACC} \frac{dc_N}{dt} \text{ od takiego } t, \text{ kiedy } c_N = c_{N_{min}} \text{ do końca procesu} \quad (4)$$

Szybkości właściwe zaś są definiowane w następujący sposób:

– dla biomasy

$$\mu = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (5)$$

– dla glukozy

$$\sigma_{GLU} = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_{GLU}}{dt} \quad (6)$$

– dla L-asparaginy

$$\sigma_{ASP} = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_N}{dt} \text{ od } t = 0 \text{ do takiego } t, \text{ kiedy } c_N = c_{N_{min}} \quad (7)$$

– dla lakazy

$$\pi_{LACC} = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_N}{dt} \text{ od takiego } t, \text{ kiedy } c_N = c_{N_{min}} \text{ do końca procesu} \quad (8)$$

gdzie: c_x – stężenie biomasy ($g\ l^{-1}$), c_{GLU} – stężenie glukozy ($g\ l^{-1}$), c_N – stężenie azotu ($g\ l^{-1}$).

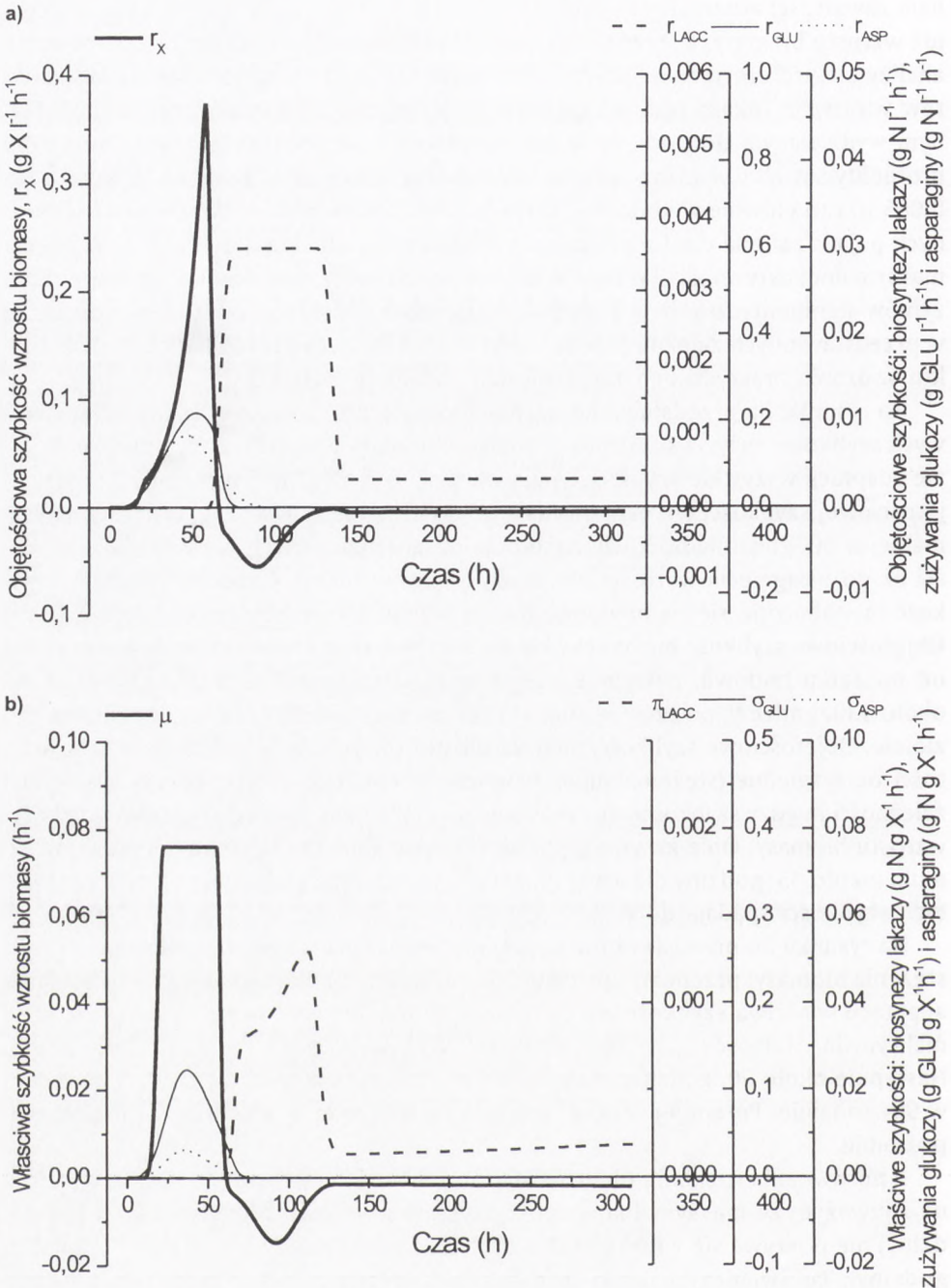
W obliczeniach przyjęto przybliżenie, że ilość lakazy w układzie jest określana przez przyrost azotu organicznego w podłożu. Stężenie azotu będącego substratem po osiągnięciu punktu minimum (60 godz.) pozostaje stałe, co potwierdzono w ana-

lizie zawartości asparaginy w podłożu. Ponadto od tego momentu nie obserwujemy już wzrostu biomasy, a stężenie glukozy jest równe zeru. Wspomniano, że podczas analizy elektroforetycznej SDS-PAGE nie stwierdzono innych poza lakazą metabolitów wtórnych. Lakaza jest, jak się wydaje, jedynym białkowym metabolitem wtórnym wydzielanym do podłoża w czasie hodowli. Na podstawie analizy enzymów proteolitycznych wykazano jedynie ich znikomą obecność w podłożu (mniejszą niż 0,005 U) i to głównie w końcowej fazie hodowli. Aktywność enzymów proteolitycznych pojawia się na ogół z pewnym opóźnieniem w stosunku do czasu osiągnięcia maksymalnej aktywności lakazy. Może być zatem przyczyną spadku aktywności enzymów ligninolitycznych w końcowej fazie hodowli. Faza ta nie jest rozważana w przedstawionych zależnościach kinetycznych i jest jednocześnie nieistotna z punktu widzenia praktycznego zastosowania badanego procesu.

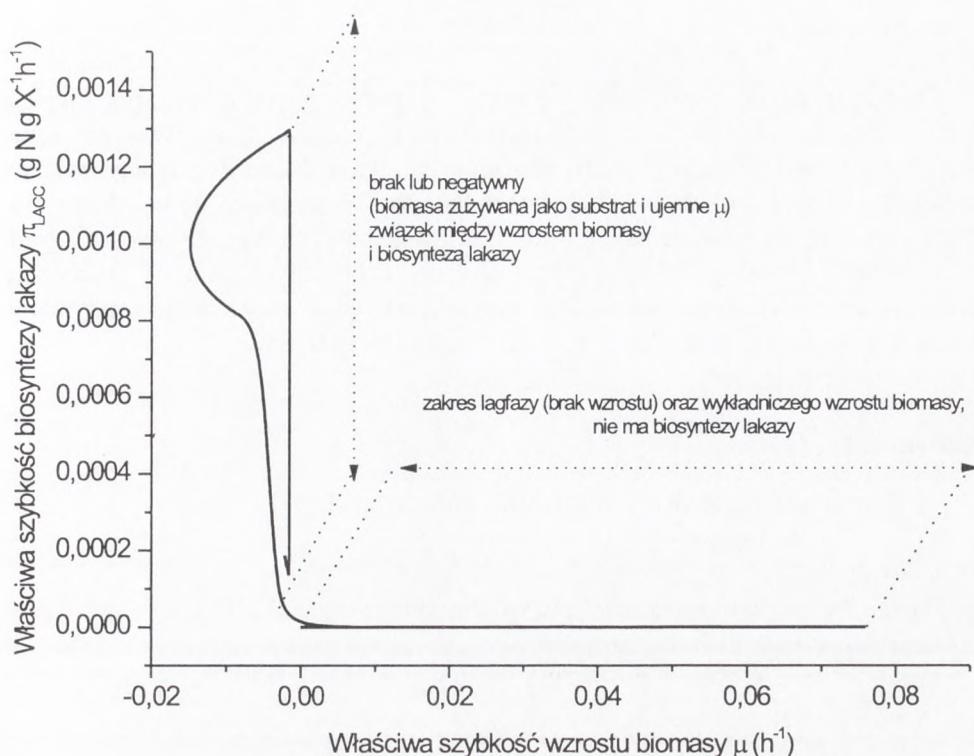
Na rysunku 3a przedstawiono zachodzące w czasie hodowli zmiany objętościowych szybkości zużycia substratów, wzrostu biomasy i biosyntezy produktów. W fazie adaptacji wszystkie szybkości mają wartości zerowe. Dalej następuje wzrost objętościowej szybkości wzrostu biomasy aż do osiągnięcia wyraźnej wartości maksymalnej w 60. godzinie hodowli, następnie obserwujemy gwałtowny spadek szybkości aż do osiągnięcia wartości ujemnych (stężenie biomasy spada), po czym szybkość ta stabilizuje się na poziomie niskiej wartości ujemnej, bliskiej 0,01 g l⁻¹h⁻¹. Objętościowa szybkość biosyntezy lakazy zaczyna rosnać dopiero około 60. godziny od początku hodowli, następnie osiąga wartość maksymalną, utrzymującą się do około 130. godziny, po czym spada, aby ponownie ustabilizować się na niższym poziomie. Objętościowe szybkości zużycia substratów zostały przedstawione jako wartości bezwzględne (stężenia substratów zawsze maleją) w celu lepszej obserwacji zależności między szybkościami i lepszego uwidocznienia ujemnej wartości szybkości wzrostu biomasy. Obie krzywe szybkości zużycia substratów charakteryzuje maksimum (około 45. godziny dla asparaginy i 60. godziny dla glukozy), po czym wartości tych szybkości spadają do zera.

Na rysunku 3b przedstawione są zmiany właściwych szybkości (odniesionych do stężenia biomasy) przemian substratów σ , produktu π i biomasy μ w czasie. Po fazie adaptacji właściwa szybkość wzrostu biomasy rośnie gwałtownie by osiągnąć stałą maksymalną wartość μ_{\max} , równą około 0,076 h⁻¹ w okresie wzrostu wykładniczego. Następnie około 60. godziny spada aż do osiągnięcia wartości ujemnych i minimum w 90. godzinie. Potem jej wartość wzrasta i stabilizuje się na niskim, ale ujemnym poziomie.

Z porównania rozkładu objętościowych szybkości w czasie (rys. 3a) łatwo można zauważyć, że maksymalna wartość szybkości wzrostu biomasy (około 60. godziny) nie pokrywa się z maksymalną szybkością biosyntezy lakazy (od 75. do 130. godziny), co świadczy o braku prostej zależności pomiędzy wzrostem biomasy a produkcją enzymu. Obrazują to także zmiany właściwych szybkości w czasie (rys. 3b), gdzie w fazie wzrostu wykładniczego biomasy (μ_{\max}) nie obserwuje się produkcji enzymu.



Rys. 3. Zmiany (a) – objętościowych (b) – właściwych szybkości wzrostu biomasy, biosyntezy laktazy, zużycia glukozy i asparaginy w czasie wzrostu *Cerrena unicolor*.



Rys. 4. Zależność właściwej szybkości biosyntezy lakazy od właściwej szybkości wzrostu biomasy.

Maksymalne wartości szybkości wzrostu biomasy pokrywają się natomiast z maksymalnymi szybkościami zużycia substratów. Świadczy to o zależności wzrostu biomasy zarówno od źródła węgla jak i azotu, co było opisywane wielokrotnie w literaturze [25].

Produkcja lakazy, wtórnego metabolitu, rozpoczyna się dopiero w momencie całkowitego wyczerpania substratów. Potwierdzono to także we wcześniejszych doniesieniach [25,26], w których stwierdza się, że niedobór źródła węgla lub azotu w podłożu hodowlanym inicjuje u grzybów przemiany metabolizmu wtórnego.

Z wykresu zależności właściwej szybkości biosyntezy lakazy od właściwej szybkości wzrostu biomasy (rys. 4) wynika, że w fazach adaptacji i wykładniczego wzrostu biomasy nie ma związku pomiędzy opisywanymi wielkościami. W czasie wzrostu biomasy szybkość biosyntezy lakazy pozostaje zerowa, nie obserwujemy wydzielania enzymu. Następnie w momencie wzrostu właściwej szybkości biosyntezy lakazy wartość właściwej szybkości wzrostu biomasy przyjmuje wartości ujemne i nadal nie pozostaje stała tylko maleje. Na podstawie tej szybkości ubytku biomasy można stwierdzić negatywny związek między wzrostem biomasy i biosyntezą lakazy objawiający się zużywaniem biomasy jako substratu.

4. Podsumowanie

Produkcja lakazy przez *Cerrena unicolor* jest przede wszystkim związana z ilością wytworzonej w układzie biomasy. Wzrost biomasy jest zależny zarówno od stężenia glukozy, jak i azotu w podłożu hodowlanym. Stwierdzono negatywny związek pomiędzy biosyntezą enzymu a wzrostem biomasy, objawiający się ubytkiem biomasy w momencie pojawienia się produktu. Świadczy to o tym, że powstała podczas hodowli biomasa staje się substratem do produkcji enzymu. W momencie całkowitego zużycia glukozy z podłoża przyswajanie asparaginy zostaje zatrzymane, a grzyb rozpoczyna wydzielanie zewnątrzkomórkowej lakazy.

Spis symboli:

- r_X – szybkość objętościowa wzrostu biomasy [$gX\ l^{-1}h^{-1}$],
- c_X – stężenie biomasy [$g\ l^{-1}$],
- t – czas [h],
- r_{GLU} – szybkość objętościowa zużywania glukozy [$gGLU\ l^{-1}h^{-1}$],
- c_{GLU} – stężenie glukozy [$g\ l^{-1}$],
- r_{ASP} – szybkość objętościowa zużywania asparaginy [$gN\ l^{-1}h^{-1}$],
- c_N – stężenie azotu [$g\ l^{-1}$],
- r_{LACC} – szybkość objętościowa biosyntezy lakazy [$gN\ l^{-1}h^{-1}$],
- μ – szybkość właściwa wzrostu biomasy [h^{-1}],
- σ_{GLU} – szybkość właściwa zużywania glukozy [$gGLU\ gX^{-1}h^{-1}$],
- σ_{ASP} – szybkość właściwa zużywania asparaginy [$gN\ gX^{-1}h^{-1}$],
- π_{LACC} – szybkość właściwa biosyntezy lakazy [$gN\ gX^{-1}h^{-1}$].

Praca wykonana w ramach grantu MNiSW nr N20703031/1435 oraz programu Mechanizmu WIDDOK współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz Budżetu Państwa nr WIDDOK/SM/2006/26.

Literatura

1. Hatakka A., (2001), *Biopolymers*, 1, 129-180.
2. Couto S. R., Herrera J. L. T., (2006), *Biotechnol. Adv.*, 24, 500-513.
3. Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K. H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G. M., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3357-3362.
4. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N., (2003), *Biotechnol. Adv.*, 22, 161-187.
5. Michniewicz A., Ledakowicz S., Jamroz T., Jarosz-Wilkolazka A., Leonowicz A., (2003), *Biotechnologia*, 4, 63, 194-203.
6. Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4627-4632.
7. Sójka-Ledakowicz J., Lichawska-Olczyk J., Ledakowicz S., Michniewicz A., (2007), *Fibres and Textiles in EE*, 63, 86-89.
8. Mayer A. M., Staples R. C., (2002), *Phytochem.*, 60, 551-565.

9. Enebak S. A., Blanchette R. A., (1989), *Can. J. For Res.*, 19, 225-231.
10. Krieglsteiner G. J., (2000), *Die Grosspilze Baden – Württernbergs*, Verlag Eugen Ulmer GmbH&Co, 1, 501-502.
11. Thurston C. F., (1994), *Microbiol.*, 140, 19-26.
12. Leonowicz A., Gianfreda L., Rogalski J., Jaszek M., Luterek J., Wojtas-Wasilewska M., Malarczyk E., Dawidowicz A., Fink-Boots M., Ginalska G., Cho N. S., (1997), *Proc. Int. Sem. for Sci.*, 15-34.
13. Rogalski J., Dawidowicz A., Józwick E., Leonowicz A., (1999), *J. Mol. Catal.*, 6, 29-39.
14. Rekuć A., Krzysztofik P., Bryjak J., (2005), *Inż. i Ap. Chem.*, 4, 44, 86-87.
15. Elisashvili V., Kachlishvili E., Bakradze M., (2002), *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38, 210-213.
16. Kim Y., Cho N. S., Eom T. J., Shin W., (2002), *Bull Korean Chem. Soc.*, 23, 985-989.
17. Michniewicz A., Ullrich R., Ledakowicz S., Hofrichter M., (2006), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 682-688.
18. Tavares A. P. M., Coelho M. A. Z., Coutinho J. A. P., Xavier A. M. R. B., (2005), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 669-676.
19. Lindeberg G., Holm G., (1952), *Physiol.Plant.*, 5, 100-114.
20. Leonowicz A., Grzywnowicz K., (1981), *Enz. Microbiol. Technol.*, 3, 55-58.
21. Janusz G., Rogalski J., Jarosz-Wilkołazka A., Leonowicz A., (2002), *Inż. i Ap. Chem.*, 3, 41, 57-58.
22. Szewczyk K. W., (2005), *Bilansowanie i kinetyka procesów biochemicznych*, WPW, 74-75.
23. Bizukojć M., Ledakowicz S., (2007), *J. Biotechnol.*, 132, 453-460.
24. Barajos-Aceves M., Hassan M., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., (2002), *J. Microbiol. Methods*, 50, 227-236.
25. Mester T., Pena M., Field J. A., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 778-784.
26. Galhaup C., Wagner H., Hinterstoisser B., Haltrich D., (2002), *Enz. Microb. Tech.*, 30, 529-536.