



## Wykorzystanie komórek *Escherichia coli* transformowanych genem termostabilnej $\beta$ -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* do wytwarzania galaktozylofruktozy

Katarzyna Grubiak, Józef Synowiecki

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

### Application of the cells of *Escherichia coli* transformant containing gene encoding thermostable $\beta$ -galactosidase from *Pyrococcus woesei* for the production of galactosylfructose

#### Summary

The gene encoding thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Pyrococcus woesei* was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells. Furthermore, the obtained recombinant strain was used without additional cell permeabilization as a catalyst for the synthesis of galactosylfructose. The optimum pH and temperature for galactosylfructose production by recombinant cells were 5,4 and 80°C, respectively. The highest process productivity (7,6 g/l×h) was attained at the cells' concentration of 40 mg/ml of the reaction media, using a substrate containing 10% of lactose and 20% fructose. The transgalactosylation activity during the repeated bath processes was almost unchanged after sixfold application of the cells.

#### Key words:

lactulose, transgalactosylation, galactooligosaccharides, thermostable  $\beta$ -galactosidase.

## 1. Wstęp

Laktuloza (4- $\beta$ -D-galaktozylofruktoza) i inne galaktooligosacharydy nie są trawione i wchłaniane w jelicie cienkim i przechodzą do okrężnicy stymulując tam wzrost bakterii rodzaju

#### Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,  
Katedra Chemii,  
Technologii  
i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. G. Narutowicza 11/12,  
80-952 Gdańsk;  
e-mail:  
synowiec@chem.pg.gda.pl

*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Skutkiem ich rozwoju jest m.in. zwiększenie przyswajania wapnia, żelaza i magnezu oraz wytwarzanie kwasu mlekowego i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, działających korzystnie na komórki nabłonkowe okrężnicy i dostarczających kolonocytom 60-70% energii (1-3). Produkty wytwarzane przez wymienione drobnoustroje zmieniają ciśnienie osmotyczne w treści pokarmowej jelita, ograniczając przez to absorpcję wody. Skutkiem tego jest łagodne oddziaływanie przeczyszczające laktulozy. Intensyfikacja syntezy kwasów organicznych i obniżenie pH hamuje rozwój bakterii proteolitycznych wytwarzających amoniak i inne substancje o neurotoksycznym oddziaływaniu. Następuje też zmniejszenie wchłaniania amoniaku przekształcanego w kwaśnym środowisku w łatwo wydalone sole amonowe (4,5). Łagodzi to skutki encefalopatii wątrobowej, będącej u ludzi cierpiących na to schorzenie przyczyną upośledzenia usuwania przechodzącego do krwi amoniaku. Substancja ta jest przekształcana w wątrobie zdrowych ludzi w mocznik.

Korzystne oddziaływanie fizjologiczne laktulozy jest przyczyną jej stosowania jako składnika żywności funkcjonalnej, odżywek dla dzieci i niektórych leków (4,6). Celowe są zatem badania zmierzające do usprawnienia metod produkcji tej substancji. Laktulozę otrzymuje się m.in. przez izomeryzację laktozy w alkalicznym środowisku. Wadą tego procesu jest wytwarzanie znacznej ilości produktów ubocznych i związana z tym konieczność stosowania kosztownych procedur oczyszczania (7,8). Lepsza jest zatem synteza enzymatyczna polegająca na przeniesieniu reszty galaktozylowej, której donorem jest laktoza, na cząsteczkę fruktozy (9-11). Można do tego celu wykorzystać niektóre produkowane obecnie preparaty  $\beta$ -galaktozydaz (EC 3.2.1.23) służące do wytwarzania bezlaktozowych produktów mlecznych (12,13).

Szybkość i wydajność transgalaktozylacji oraz udział poszczególnych oligosacharydów w produkcie zależy od pochodzenia enzymu, stężenia substratów oraz od pH i aktywności wody w środowisku reakcji (11,14). Użycie hipertermofilnego enzymu pozwala na podwyższenie temperatury procesu, co zwiększa rozpuszczalność laktozy, obniża lepkość mieszaniny reakcyjnej oraz ogranicza możliwość zanieczyszczenia mikrobiologicznego reaktora. Źródłem takiego enzymu o największej aktywności w temp. 92°C jest hipertermofilny archeon *Pyrococcus woesei* (15).

W publikowanych obecnie wynikach badań wskazuje się na możliwość katalizowania przebiegu reakcji komórkami drobnoustroju, bez potrzeby wyodrębniania znajdującego się w nich enzymu (9,16). Eliminuje to straty aktywności enzymu podczas jego izolowania, obniża koszt procesu oraz ułatwia usunięcie biokatalizatora po zakończeniu reakcji (17,18). Aktywność takiego preparatu zmniejszają opory dyfuzyjne spowodowane ograniczoną przepuszczalnością ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej. Można ją zwiększyć wykorzystując rozmaite sposoby permeabilizacji, których stosowanie nie jest jednak konieczne w przypadku ekspresji genu kodującego termostabilny enzym w komórkach mezofilnego gospodarza ze względu na zwiększenie przepuszczalności błony cytoplazmatycznej w podwyższonej temperaturze reakcji (17,18).

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Szczep i hodowla drobnoustroju

Do badań stosowano komórki *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformowane wektorem zawierającym gen termostabilnej  $\beta$ -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* wklonowany za pośrednictwem miejsc rozpoznawanych przez restrykcyjne endonukleazy *KpnI* oraz *HindIII* do plazmidu pET-30LIC z sekwencją kodującą oporność na działanie kanamycyny (19). Komórki z plazmidem selekcjonowano na podłożu zawierającym 2% agaru, 1% peptonu, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 1% NaCl oraz kanamycynę (50  $\mu$ g/ml) i inkubowano 24 godz. w temp. 37°C. Pojedyncze kolonie przesiewano do 100 ml nie zawierającego agaru podłoża o podanym składzie i inkubowano 8 godz. w temperaturze 37°C bez dodatkowego napowietrzania w termostатовanej wstrząsarce powietrznej (160 cykli/min). Porcje podłoża bez kanamycyny o objętości 1000 ml sterylizowano w kolbach Erlenmeyera o pojemności 2000 ml w temp. 121°C przez 20 min i zaszczepiano 10 ml uzyskanej zawiesiny komórek ( $OD_{600}=1,2$ ). Hodowlę drobnoustroju prowadzono przez 24 godz. bez dodatkowego napowietrzania w termostатовanej wstrząsarce typu ECOTRON w temp. 37°C przy 160 cyklach/min. Biomasa odwirowywano (5000 $\times$ g, 15 min), przemywano wodą destylowaną i ponownie odwirowywano (8800 $\times$ g, 15 min).

### 2.2. Oznaczanie aktywności enzymu i zawartości białek

Aktywność znajdujacej się w komórkach  $\beta$ -galaktozydazy oznaczano spektrofotometrycznie mierząc absorbcję ( $A_{420nm}$ ) *o*-nitrofenolu uwolnionego z 4 mM roztworu *o*-nitrofenilo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (Gal $\beta$ oNp) w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym o pH 5,4 (20). Jako jednostkę aktywności przyjęto taką ilość komórek, która w warunkach oznaczenia (70°C, pH 5,4) uwalnia w ciągu 1 minuty 1  $\mu$ mol *o*-nitrofenolu. Ilość białek wyekstrahowanych z komórek oznaczano metodą Bradford (21).

### 2.3. Identyfikacja i oznaczanie ilości produktów konwersji laktozy

Zawartość produktów konwersji laktozy określano stosując zestaw HPLC z kolumną Polyspher™ CH PB (300 $\times$ 7,8 mm) Merck i detektorem refraktometrycznym (La Chrom L-7490, Merck). Przed naniesieniem na kolumnę próbki poddano ultrafiltracji (30 kDa MWCO, Amicon Ultra, Millipore, USA), a następnie sączono przez filtr strzykawkowy 0,2  $\mu$ m (Whatmann, USA). Składniki mieszaniny reakcyjnej rozdzielano w temp. 80°C, przy natężeniu przepływu dejonizowanej wody wynoszącym

0,35 ml/min. Jako wzorce stosowano roztwory laktozy, glukozy, galaktozy i laktulozy (Sigma-Aldrich).

#### 2.4. Warunki otrzymywania galaktozylofruktozy

Wpływ warunków procesu na ilość wytworzonego produktu określano katalizując reakcję zawiesiną rekombinowanych komórek *Escherichia coli*. Substratem była mieszanina laktozy i fruktozy rozpuszczona w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym o pH 5,4.

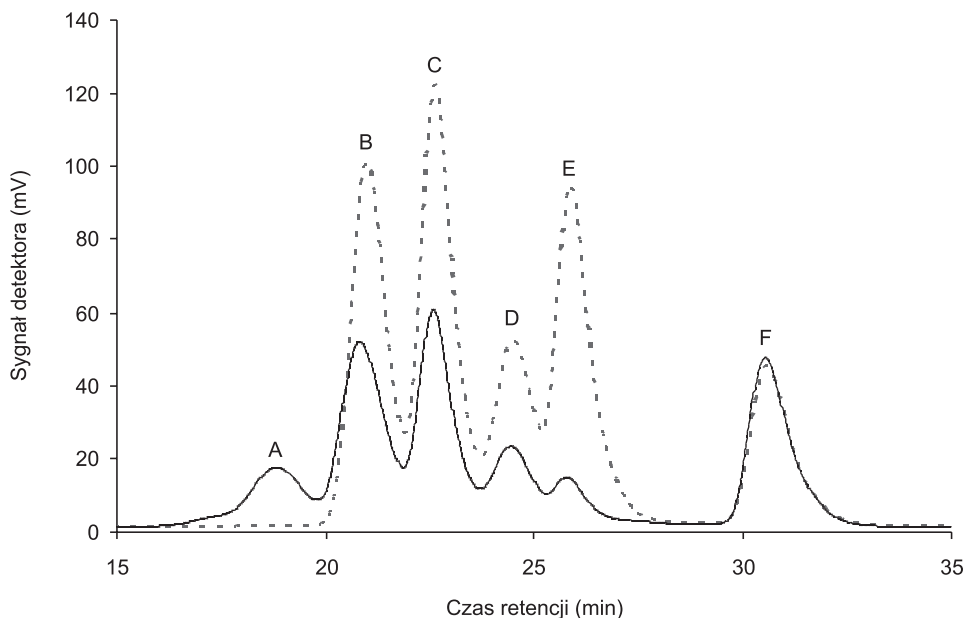
Wpływ stężenia i udziału poszczególnych substratów na wydajność transgalaktozylacji oznaczano w temp. 70°C przy pH 5,4 stosując 10% roztwory laktozy w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym zawierające od 0,5 do 20% fruktozy oraz 5% roztwory fruktozy w wymienionym buforze, w których rozpuszczono od 0,5 do 20% laktozy. Konwersję tych substratów prowadzono przez 4 godz. po dodaniu do 5 ml mieszaniny reakcyjnej 200 mg rekombinowanych komórek *Escherichia coli*.

Wpływ temperatury reakcji zmienianej w zakresie 60-90°C, aktywności  $\beta$ -galaktozydazy regulowanej ilością rekombinowanych komórek (0,1-4,58 U/ml) lub czasu trwania procesu (od 2 do 12 godz.) na ilość wytwarzanego produktu badano stosując 10% roztwór laktozy w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym (pH 5,4) zawierający 5% fruktozy. Wyższych stężeń substratów nie stosowano, bo nie wywoływały już one dużych zmian wydajności procesu. Możliwość wielokrotnego wykorzystania rekombinowanych komórek badano w temp. 80°C używając ww. roztwór laktozy i fruktozy. Po zakończeniu każdego cyklu trwającego 2 godz. lub 4 godz. komórki odwirowywano, przemywano buforem (pH 5,4) i ponownie zawieszano w roztworze substratów.

### 3. Omówienie wyników

W zidentyfikowanych metodą HPLC produktach reakcji laktozy z fruktozą przeprowadzonej w środowisku wodnym jednofazowym i katalizowanej rekombinowanymi komórkami *Escherichia coli* stwierdzono występowanie galaktozylofruktozy i mniejszej ilości oligosacharydów (rys. 1). Zaobserwowane przez innych autorów (18) zwiększenie przepuszczalności błony cytoplazmatycznej mezofili w temp. 70-80°C występowało też w przypadku badanej przez nas rekombinowanej *Escherichia coli* i stosowanie dodatkowych czynników permeabilizujących nie wywierało istotnego wpływu na wykazywaną przez te komórki aktywność hydrolityczną względem *o*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (Gal $\beta$ oNp).

Optymalna temperatura syntezy galaktozylofruktozy (80°C) katalizowanej komórkami *Escherichia coli* (tab. 1) była niższa od wynoszącej 92°C optymalnej tempe-



Rys. 1. Chromatogram (HPLC) rozdzielenia cukrów uzyskanych po 8 godz. reakcji katalizowanej w 80°C zawiesiną rekombinowanych komórek *Escherichia coli* w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym (pH 5,4) zawierającym 10% laktozy i 5% fruktozy. Produkty reakcji (—), mieszanina wzorców (••••), A – inne produkty transglukozytacji, B – laktoza, C – glukoza, D – laktuloza, E – galaktoza, F – fruktoza.

ratury hydrolizy Gal $\beta$ oNp przebiegającej z udziałem wolnego enzymu wyizolowanego z komórek wg opracowanej wcześniej procedury (15) (tab. 1). Przyczyną tego zjawiska może być zmniejszenie aktywności enzymu spowodowane przebiegającymi w podwyższonej temperaturze interakcjami z białkami i innymi składnikami komórek mezofilnego gospodarza. Jako optymalne pH reakcji przyjęto wartość 5,4, zapewniającą największą wydajność reakcji katalizowanej preparatem wolnej  $\beta$ -galaktozydazy (wyniki nie publikowane) i nie różniącą się od kwasowości środowiska umożliwiającej uzyskanie najwyższej aktywności hydrolitycznej oznaczonej względem Gal $\beta$ oNp (15).

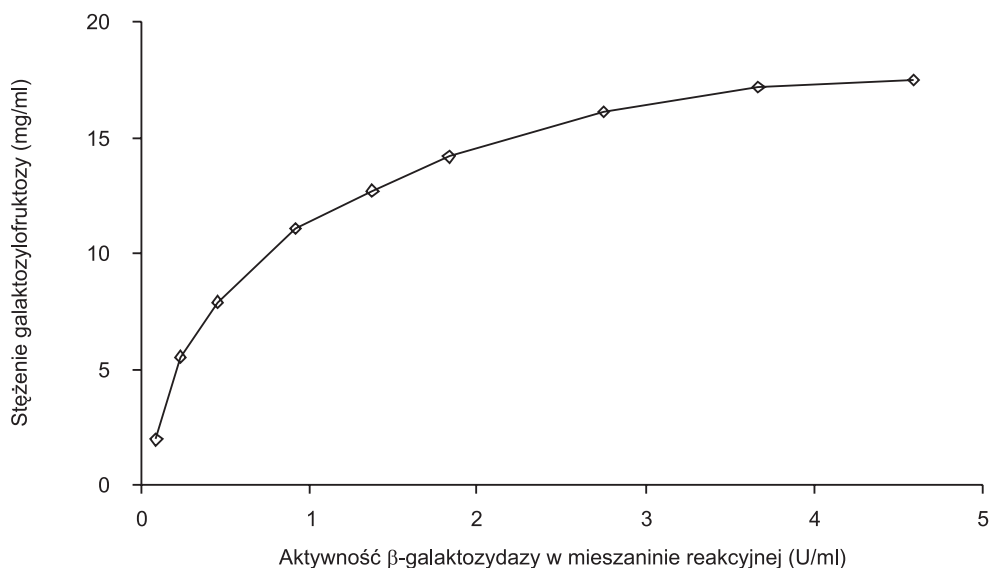
**Tabela 1**

**Wpływ temperatury na zawartość galaktozylofruktozy wytworzonej po 4 godz. konwersji substratu (pH 5,4) zawierającego 10% laktozy i 5% fruktozy**

Rodzaj preparatu	Stężenie galaktozylofruktozy (mg/ml) po reakcji w temperaturze (°C)			
	60	70	80	90
wolna $\beta$ -galaktozydaza	8,07 $\pm$ 0,20	10,28 $\pm$ 0,23	11,02 $\pm$ 0,16	12,48 $\pm$ 0,47
komórki rekombinowanej <i>Escherichia coli</i>	12,92 $\pm$ 0,17	16,00 $\pm$ 0,52	16,90 $\pm$ 0,14	15,48 $\pm$ 0,83

Przedstawione wyniki są średnią z 4 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe. Dawka wolnego enzymu 2,18 U/ml. Aktywność komórek 3,70 U/ml mieszaniny reakcyjnej.

Stopień konwersji substratów zależał od aktywności  $\beta$ -galaktozydazy, którą regulowano stężeniem rekombinowanych komórek zmienianym w zakresie od 1 do 50 mg/ml mieszaniny reakcyjnej. Największą ilość galaktozylofruktozy otrzymywano przy zawartości komórek około 40 mg/ml, które wykazywały 3,7 U aktywności hydrolitycznej oznaczonej względem Gal $\beta$ 0Np (rys. 2). W zakresie stężeń komórek 30-40 mg/ml nie następowało już zwiększenie wydajności procesu.



Rys. 2. Wpływ aktywności  $\beta$ -galaktozydazy w zawiesinie rekombinowanych komórek *Escherichia coli* na ilość galaktozylofruktozy wytworzonej po 4 godz. reakcji prowadzonej w temp. 70°C w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym (pH 5,4) zawierającym 10% laktozy i 5% fruktozy. Wyniki są średnią z 4 oznaczeń.

Skutkiem podwyższenia stężenia zarówno laktozy jak i fruktozy jest przesunięcie równowagi reakcji z hydrolizy laktozy w kierunku syntezy oligosacharydów, a w konsekwencji wzrost wydajności transgalaktozylacji. Przy niezmiennym 5% stężeniu fruktozy maksymalną ilość produktu (19,72 mg/ml mieszaniny reakcyjnej) uzyskiwano przy 15% zawartości laktozy i dalsze zwiększanie jej stężenia nie powodowało istotnych zmian wydajności procesu (tab. 2). Wzrost zawartości fruktozy miał natomiast większy wpływ na ilość galaktozylofruktozy, która po 4 godz. reakcji przy 10% stężeniu laktozy i 20% stężeniu fruktozy osiągała poziom 30,52 mg/ml mieszaniny reakcyjnej (tab. 2). Osiągana w tych warunkach produktywność wynosiła 7,6 g/l×godz. i była większa niż w przypadku stosowania komórek *Kluyveromyces lactis* permeabilizowanych 50% etanolem, katalizujących syntezę laktulozy z wydajnością 6,8 g/l×godz. (9). Wydajności uzyskiwane przy użyciu zawiesiny rekombinowanych komórek *Escherichia coli* są lepsze od osiągniętych w procesie katalizowanym badanymi przez Lee i wsp. (9) preparatami β-galaktozydaz z *Aspergillus oryzae* (0,4 g/l×godz.) i *Saccharomyces fragilis* (1,1 g/l×godz.) oraz podobne jak w przypadku stosowania termostabilnej β-galaktozydazy z *Sulfolobus solfataricus*, wytwarzającej laktulozę w ilości 8,3 g/l×godz. (10). Zwiększenie wydajności transgalaktozylacji w procesach katalizowanych termostabilnymi enzymami jest skutkiem wywołanego wzrostem temperatury przesunięcia równowagi reakcji w kierunku syntezy oligosacharydów (22).

Tabela 2

**Wpływ stężenia laktozy i fruktozy na wydajność syntezy galaktozylofruktozy katalizowanej rekombinowanymi komórkami *Escherichia coli***

Stężenie (%)		Zawartość galaktozylo-fruktozy (mg/ml)	Stężenie (%)		Zawartość galaktozylofruktozy (mg/ml)
fruktoza	laktoza		laktoza	fruktoza	
5,0	0,5	2,68 ± 0,54	10,0	0,5	3,14 ± 0,01
	1,0	5,51 ± 0,03		1,0	5,56 ± 0,07
	2,5	9,70 ± 0,32		2,5	10,45 ± 0,05
	5,0	14,58 ± 0,48		5,0	17,29 ± 0,34
	10,0	17,18 ± 0,42		10,0	25,62 ± 1,17
	15,0	19,72 ± 0,35		15,0	28,50 ± 0,02
	20,0	19,15 ± 2,32		20,0	30,52 ± 1,66

Przedstawione wyniki są średnią z 4 oznaczeń ± odchylenie standardowe. Aktywność komórek 3,7 U/ml mieszaniny reakcyjnej. Temperatura procesu prowadzonego przy pH 5,4 wynosiła 70°C. Czas reakcji 4 godz.

Największy wzrost zawartości galaktozylofruktozy następował w okresie pierwszych 8 godzin reakcji (tab. 3). Dalsze przedłużanie procesu zmniejszało ilość produktu o około 7% maksymalnej wartości, prawdopodobnie wskutek obserwowanej

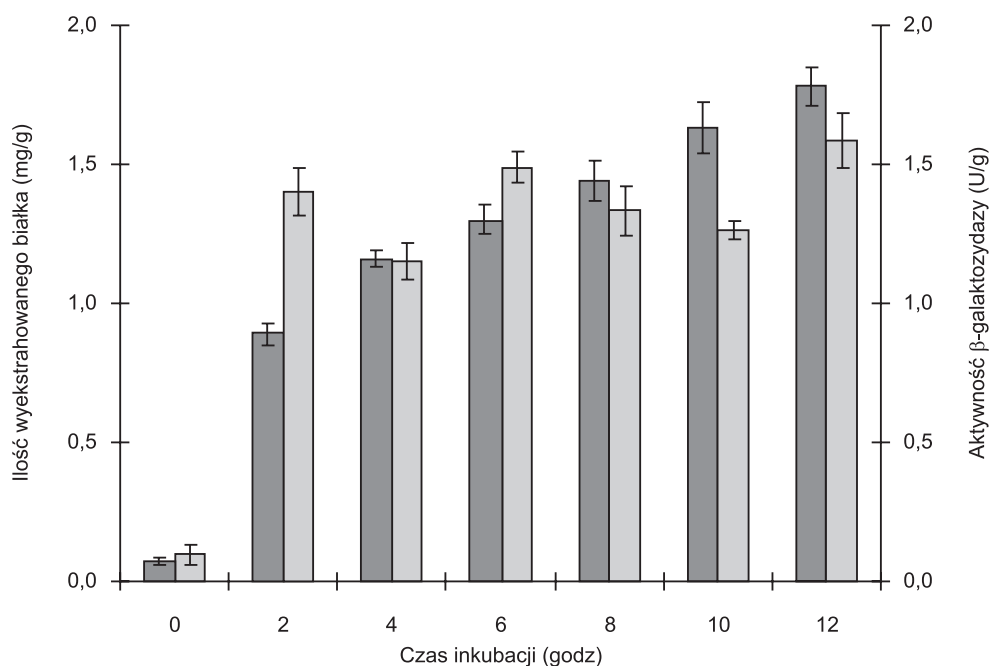
też przez innych autorów, wtórnej degradacji oligosacharydów oraz zwiększenia udziału produktów hydrolizy laktozy utrudniających wiązanie reszt galaktozylowych (11,23).

Tabela 3

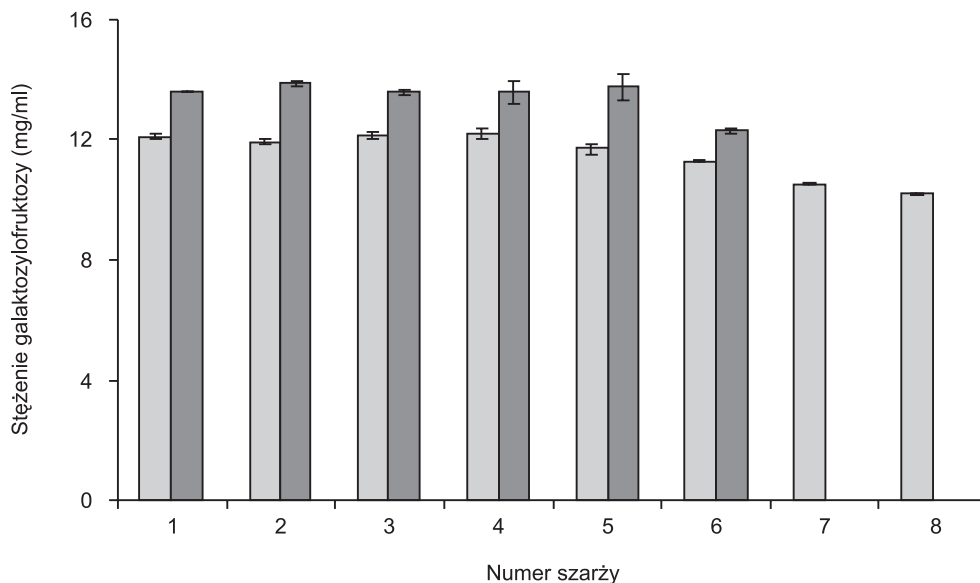
Wpływ czasu reakcji prowadzonej w temperaturze 80°C (pH 5,4) na ilość galaktozylifruktozy wytworzonej w roztworze zawierającym 10% laktozy i 5% fruktozy

Czas reakcji (godz.)	Stężenie galaktozylifruktozy (mg/ml)
2	15,91 ± 0,03
4	17,68 ± 0,51
6	17,64 ± 0,35
8	18,00 ± 0,24
10	16,91 ± 0,34
12	16,77 ± 0,04

Przedstawione wyniki są średnią z 4 oznaczeń ± odchylenie standardowe. Aktywność komórek 3,7 U/ml mieszaniny reakcyjnej.



Rys. 3. Wpływ czasu inkubacji (80°C) na ilość białka (■) i aktywność  $\beta$ -galaktozydazy (□) białek wyekstrahowanych z rekombinowanych komórek *Escherichia coli* 50 mM sodowo-potasowym buforem fosforanowym (pH 5,4). Wyniki są średnią z 4 oznaczeń.



Rys. 4. Ilość galaktozylofruktozy wytworzonej w kolejnych szarżach trwających 2 godz. (■) lub 4 godz. (■) i przeprowadzanych przy stężeniu komórek 40 mg/ml (80°C) w 50 mM sodowo-potasowym buforze fosforanowym (pH 5,4) zawierającym 10% laktozy oraz 5% fruktozy. Wyniki są średnią z 4 oznaczeń.

Pomimo zwiększenia przepuszczalności substratów i produktów reakcji przez błonę cytoplazmatyczną rekombinowanej *Escherichia coli* w temp 70-80°C, straty enzymu spowodowane jego „wyciekaniem” z komórek były niewielkie, a ogólna ilość białek wyekstrahowanych po 12 godz. ogrzewania w temp. 80°C przy pH 5,4 wynosiła około 1,8 mg/g komórek (rys. 3). Największy ubytek  $\beta$ -galaktozydazy, wynoszący 1,4 U/g komórek następował w ciągu pierwszych 2 godz. ogrzewania i dalsze przedłużanie obróbki termicznej nie wywoływało istotnego wzrostu ilości uwolnionego enzymu (rys. 3). Skutkiem tego jest duża stabilność aktywności rekombinowanych komórek podczas wielokrotnego katalizowania syntezy laktulozy z wydajnością prawie nie zmieniającą się podczas sześciu kolejnych szarż produkcyjnych trwających przez 2 lub 4 godz. i przeprowadzanych z użyciem tej samej porcji komórek (rys. 4).

#### 4. Podsumowanie

Zastosowanie komórek drobnoustrojów w miejsce preparatów enzymatycznych przydatnych do wytwarzania laktulozy i innych galaktooligosacharydów pozwoli na znaczne obniżenie kosztu produkcji tych substancji. Z przeprowadzonych badań wynika, że preparat rekombinowanych komórek *Escherichia coli* transformowanych

genem kodującym termostabilną  $\beta$ -galaktozydazę z *Pyrococcus woesei* katalizuje efektywnie reakcję syntezy galaktozylofruktozy. Największą wydajność tej reakcji uzyskano w temp. 80°C, czyli o 12°C niższej od optymalnej temperatury działania enzymu wyizolowanego z rekombinowanych komórek *Escherichia coli*.

Duży wpływ na ilość wytworzonego produktu ma stężenie substratów. Wynika to z określonego przez różnych autorów mechanizmu reakcji, której pierwszym etapem jest utworzenie kompleksu przejściowego laktozy z  $\beta$ -galaktozydazą i uwolnienie glukozy (22,24). Związana nadal z enzymem reszta galaktozylowa jest przenoszona na cząsteczkę akceptora podczas reakcji transglikozylacji. Warunkiem wydajnej syntezy jest zatem ograniczenie możliwości reakcji kompleksu przejściowego z wodą, czemu można zapobiec zwiększając stężenie fruktozy i zmniejszając aktywność wody. Produktami dalszych, przebiegających jednak z mniejszą wydajnością etapów procesu są rozmaite oligosacharydy wytwarzane wskutek przeniesienia reszty galaktozylowej na laktozę lub reakcji laktulozy z innymi cząsteczkami fruktozy.

Podczas przeprowadzonych doświadczeń, wydajność galaktozylofruktozy wynosiła 30,5 g/l roztworu laktozy i fruktozy. Możliwe jest jednak (co jest przedmiotem dalszych badań) zwiększenie wydajności procesu przez obniżenie aktywności wody wskutek wprowadzenia rozpuszczalników organicznych oraz usuwania produktów reakcji przez ultrafiltrację. W prezentowanych wynikach wskazuje się, że rekombinowane komórki *Escherichia coli* są lepszym katalizatorem syntezy galaktozylofruktozy od permeabilizowanych komórek *Kluyveromyces lactis* i innych mezofilnych drobnoustrojów (13). Wskazuje to na możliwość ich wykorzystania do przemysłowej produkcji zawierających laktulozę koncentratów oligosacharydów.

## Literatura

1. Demczuk A., Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (2004), *Biotechnol.*, 3(66), 152-165.
2. Voragen A. G. J., (1998), *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 328-335.
3. Socha P., Neuhoﬀ-Murawska J., Socha J., (2006), *Zakażenia*, 6, 50-55.
4. Conn H. O., Floch M. H., (1970), *Am. J. Clin. Nutr.*, 23,1588-1615.
5. Liu Q., Duan Z. P. Ha D. K., (2004), *Hepatology*, 39, 1441-1445.
6. Sako T., Matsumoto K., Tanaka R., (1999), *Int. Dairy J.*, 9, 69-80.
7. Zokaee F., Kaghazchi T., Zare A., Soleimani M., (2002), *Process Biochem.*, 37, 629-635.
8. Mendez A., Olano A., (1979), *Dairy Sci. Abs.*, 41, 531-535.
9. Lee Y. J., Kim C. S., Oh D. K., (2004), *Appl. Microb. Biotechnol.*, 64, 787-793.
10. Kim Y. S., Park C. S., Oh D. K., (2006), *Enz. Microb. Technol.*, 39, 903-908.
11. Bednarski W., Kulikowska A., (2007), *Biotechnologia*, 2(77), 137-148.
12. Kowalewska-Piontas J., (1993), *Przegląd Mlecz.*, 8, 197-200.
13. Shukla T. P., (1975), *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, 5, 325-356.
14. Moracci M., Trincone A., Rossi M., (2001), *J. Mol. Catalysis B*, 11, 155-163.
15. Synowiecki J., Maciuńska J., (2002), *J. Food Biochem.*, 26, 49-62.
16. Ma Y., Xue L., Sun D. W., (2006), *J. Food Engin.*, 77, 342-347.
17. Felix H., (1982), *Anal. Biochem.*, 120, 211-234.
18. Kamrat T., Nidetzky B., (2007), *J. Biotechnol.*, 129, 69-76.
19. Dąbrowski S., Maciuńska J., Synowiecki J., (1998), *Mol. Biotechnol.*, 10, 217-222.

20. Craven G. R., Steers E., Afinsen C. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 2468-2477.
21. Bradford M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
22. Plou F. J., de Segura A. G., Ballesteros A., (2007), in: *Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides*, in: *Industrial enzymes, structure function and applications*, Eds. Polaina J., Mac Cabe A. P., Springer, Dordrecht.
23. Petzelbauer J., Zeleny R., Reiter A., Kulbe K. D., Nidetzky B., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 140-149.
24. Moracci M., Trincone A., Cobucci-Ponzano B., Perugino G., Ciaramella M., Rossi M., (2001), *Extremophiles*, 5, 145-152.