

**Uniwersytet Przyrodniczy  
w Poznaniu**  
**Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu**  
Specjalność: *Biotechnologia Żywności*

**Krzysztof Kobus**  
Nr albumu 104305

**Transgeniczne mikroorganizmy w produkcji  
enzymów stosowanych w technologii żywności**

Praca dyplomowa inżynierska wykonana  
na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka

Praca wykonana pod kierunkiem  
(*dr hab. Grażyny Lewandowicz, prof. nadzw.*)  
w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii  
Żywności

Pracę przyjęto.....

**Poznań 2009**

**Streszczenie**  
**Krzysztof Kobus**  
**Transgeniczne mikroorganizmy w produkcji enzymów**  
**stosowanych w technologii żywności**

Enzymy są biokatalizatorami powszechnie stosowanymi w przetwórstwie żywności. Szczególnie powszechnie używa się preparatów pochodzenia mikrobiologicznego ze względu na ich wysoką aktywność i niską cenę w porównaniu do enzymów roślinnych czy zwierzęcych. Mikroorganizmy mogą wytwarzać nie tylko enzymy natywne, lecz również pochodzące z innych organizmów. Geny kodujące enzymy nie wytwarzane przez dany organizm wprowadza się do genomu gospodarza korzystając z narzędzi inżynierii genetycznej. Modyfikację genomu danego mikroorganizmu można również wprowadzać aby wpływać na efektywność otrzymywanych enzymów w skrajnych warunkach środowiskowych jak i wydajność ich produkcji. Stosowanie drobnoustrojów do produkcji enzymów wykorzystywanych w technologii żywności obwarowane jest restrykcyjnymi przepisami, zapewniającymi bezpieczeństwo gotowych preparatów enzymatycznych. Przede wszystkim używane szczepy nie mogą być patogenne ani wytwarzać toksyn mogących zagrozić zdrowiu człowieka. W pracy przedstawiono główne enzymy stosowane w technologii żywności, najważniejsze mikroorganizmy używane do ich produkcji oraz sposoby modyfikacji drobnoustrojów z wykorzystaniem narzędzi inżynierii genetycznej.

**Słowa kluczowe** – enzymy, żywność, mikroorganizmy transgeniczne

**Summary**  
**Kobus Krzysztof**  
**Recombinant microorganisms in the production of enzymes used in food**  
**processing**

Enzymes are biocatalysts commonly used in food processing. The most popular are enzyme preparations derived from microorganisms due to their high activity and relatively low price in comparison to enzymes isolated from plants and animals. Microorganisms can produce not only native enzymes, but also exogenous ones. Genes encoding these enzymes are introduced to the host cells using the recombinant DNA technology. The microbial strains are adapted to industrial conditions by modification of their genomes. The same safety regulations apply to the enzymes derived from recombinant microorganisms, as to the ones derived from the native microorganisms. The key component in evaluating enzyme safety is the safety assessment of the production strain, in particular, its pathogenic and toxigenic potential. In this work, the most popular enzymes applied in food processing, the microorganisms used as hosts for enzyme-encoding genes as well as the major transformation methods of the host strain are presented.

**Key words** – enzymes, food, recombinant microorganisms

---

# Spis treści

---

1. Wprowadzenie
2. Wykorzystanie enzymów w technologii żywności
  - 2.1. Enzymy amylolityczne
  - 2.2. Enzymy pektynolityczne
  - 2.3. Enzymy proteolityczne
  - 2.4. Enzymy lipolityczne
  - 2.5. Inne enzymy
3. Szczepy transgeniczne w produkcji enzymów
  - 3.1. Etapy uzyskiwania rekombinowanych szczepów
  - 3.2. Bezpieczeństwo preparatów enzymatycznych
  - 3.3. Komercyjna produkcja enzymów
4. Bakteryjne źródła enzymów
  - 4.1. *Bacillus* sp.
  - 4.2. *Escherichia coli* K-12
  - 4.3. *Pseudomonas fluorescens*
5. Grzyby jako źródło enzymów
  - 5.1. *Aspergillus* sp.
  - 5.2. *Fusarium venenatum*
  - 5.3. *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*
  - 5.4. *Trichoderma reesei*
6. Uzyskiwanie transgenicznych drobnoustrojów
  - 6.1. Transformacja i identyfikacja modyfikowanych komórek
  - 6.2. Wektory ekspresyjne
  - 6.3. Kasetka ekspresyjna
7. Podsumowanie
8. Literatura

## 1. Wprowadzenie

Mikroorganizmy pełnią istotną rolę nie tylko w środowisku, lecz także w gospodarce człowieka. Historię ich wykorzystania można podzielić na trzy fazy. Pierwsza z nich jest okresem tradycyjnej biotechnologii, w której to drobnoustroje, w różnych zakątkach świata, przez tysiące lat, bez świadomości człowieka, brały udział w utrwalaniu mleka i warzyw oraz w produkcji żywności. Przykładów jest wiele: sery pleśniowe, chleb, kwas chlebowy, ocet, piwo, wino i inne alkohole, miso, tempeh i inne. Druga faza - nowoczesnej mikrobiologii przemysłowej - rozpoczęła się we wczesnych latach XX wieku, kiedy to zrozumiano rolę, jaką mikroorganizmy pełnią w produkcji żywności. Zaowocowało to produkcją enzymów, kwasów organicznych, rozpuszczalników czy witamin. W połowie stulecia metodą przemysłowej syntezy mikrobiologicznej zaczęły być produkowane także antybiotyki - penicylina i streptomycyna. Dążenia do zwiększenia ich podaży doprowadziły do narodzin inżynierii bioprocessowej, a nowo odkryta mutagenaza posłużyła jako metoda polepszenia wydajności produkcji. Rozpoczęła się trzecia faza wykorzystania mikroorganizmów w gospodarce człowieka - nowoczesnej biotechnologii, obejmującej rekombinację DNA przy pomocy narzędzi inżynierii genetycznej. Biotechnologia zaczęła odgrywać znaczącą rolę w rolnictwie, medycynie, diagnostyce czy produkcji związków chemicznych, a także w energetyce, górnictwie, technologii żywności i ochronie środowiska [Demain i Adrio, 2007].

## 2. Wykorzystanie enzymów w technologii żywności

Enzymy występują we wszystkich żywych organizmach, będąc katalizatorem reakcji biochemicznych. Są wszechobecne w żywności świeżej i przetworzonej, którą codziennie spożywamy. Tak jak inne białka, enzymy po strawieniu są degradowane i metabolizowane przez nasz organizm. Enzymy występujące naturalnie w pożywieniu człowieka są postrzegane jako bezpieczne. W produkcji żywności enzymów używa się na początkowych etapach i często nie występują one w gotowym produkcie, ulegając inaktywacji w procesach gotowania czy pieczenia.

Produkcja przemysłowa enzymów używanych w przetwórstwie żywności miała swój początek w 1874 roku, kiedy to Christian Hansen, duński uczonec, wyizolował chymozynę (renninę) z cielęcych żołądków w celu użycia jej do produkcji serów. Enzym ten jest teraz wytwarzany przez drobnoustroje zawierające gen kodujący prochymozynę, który został wprowadzony do ich genomu przy pomocy technik rekombinacji DNA. Chymozyna bydlęca ulegająca ekspresji w szczepie bakterii *Escherichia coli* K-12 była pierwszym enzymem dopuszczonym do stosowania w żywności przez Amerykańską

Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) [Olempska-Beer i in., 2006].

Początki nowoczesnej produkcji enzymów przez drobnoustroje na potrzeby produkcji żywności miały miejsce w latach 60. ubiegłego wieku, kiedy to wytwarzanie glukozy w procesie hydrolizy kwasowej skrobi zastępowane było stopniowo przez hydrolizę enzymatyczną. Na upowszechnienie wykorzystania enzymów w technologii żywności miały wpływ kilka zjawisk:

- Wysoka specyficzność substratowa enzymów, zapobiegająca powstawaniu niepożądanych produktów ubocznych.

- Możliwość prowadzenia reakcji enzymatycznych przy względnie niskich wartościach temperatury, pH czy ciśnienia w porównaniu do procesów chemicznych.

- Biodegradowalność enzymów, która rozwiązuje problem toksyczności odczynników chemicznych.

- Możliwość immobilizacji enzymów na stałych nośnikach, która usprawnia wydajność procesu i zapobiega przedostawaniu się enzymów do gotowego produktu, co redukuje ryzyko wystąpienia w nim czynników alergicznych [MacCabe i in., 2002].

Dzięki inżynierii genetycznej stała się możliwa poprawa właściwości funkcjonalnych enzymów. Struktura biokatalizatorów może być zmieniana poprzez zmianę sekwencji nukleotydowej genu kodującego dane białko. Ta inżynieria białkowa przynosi korzyści w postaci enzymów z wyższą aktywnością, niższym kosztem pozyskiwania i korzystniejszymi właściwościami funkcjonalnymi [Rastall i Maitin, 2002].

Enzymy mające zastosowanie w produkcji żywności są sprzedawane w postaci preparatów zawierających dany enzym łącznie z szeregiem substancji dodatkowych, jak rozcieńczalniki, konserwanty czy stabilizatory. Dodatki te są z reguły substancjami dobrze znanymi i często dodawanymi do żywności. Preparaty enzymatyczne mogą również zawierać inne enzymy i metabolity produkowane przez dane drobnoustroje. Ponadto mogą tam być obecne pozostałości po surowcach używanych do przygotowania pożywki oraz resztki związków stosowanych do izolacji i oczyszczania enzymu. Jednakże wszystkie te substancje powinny być stosowane zgodnie z aktualną dobrą

praktyką produkcyjną (GMP) jak również charakteryzować się odpowiednią czystością [Olempska-Beer i in., 2006].

Ocena bezpieczeństwa enzymów stosowanych do produkcji żywności, izolowanych z drobnoustrojów transgenicznych była wielokrotnie omawiana zarówno w literaturze. Została ona opisana w dokumentach wydawanych przez kompetentne organizacje międzynarodowe jak na przykład Komitet Naukowy ds. Żywności EU (Scientific Committee on Food – SCF). Jako zasadę przyjęto, by te same wymagania dotyczyły enzymów pozyskiwanych zarówno z mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie, jak również ich form dzikich. Kluczowym parametrem w ocenie bezpieczeństwa danego szczepu jest określenie stopnia jego toksyczności i patogenności. Pomimo iż żaden patogenny ani toksyczny szczep nie został celowo wdrożony do produkcji enzymów, to niektóre grzyby tradycyjnie będące źródłem enzymów, okazały się wytwarzać niskie stężenia toksycznych metabolitów wtórnych w warunkach optymalnych dla syntezy enzymów [Olempska-Beer i in., 2006].

## 2.1. Enzymy amylolityczne

W technologii żywności istotne znaczenie mają produkty hydrolizy skrobi, jak syropy glukozowe, maltodekstryny, cyklodekstryny, glukoza, fruktoza i inne. Stosowana do niedawna kwasowa hydroliza skrobi ustępuje miejsca procesom z wykorzystaniem biokatalizatorów. Enzymatyczna hydroliza skrobi katalizowana jest przez enzymy amylolityczne, z których najważniejsze to:  $\alpha$ -amylazy,  $\beta$ -amylazy, glukoamylazy oraz enzymy usuwające rozgałęzienia.

$\alpha$ -amylaza jest endoenzymem, który ma największe w enzymatycznym procesie upłynniania skrobi. Jest on zdolny do działania w środku łańcucha na wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe, co powoduje gwałtowny spadek lepkości obrabianego kleiku skrobiowego. W pierwszym etapie hydrolizy skrobia jest upłynniana za pomocą  $\alpha$ -amylazy przez podgrzanie do temperatury 105 °C na czas 2-5 minut oraz przetrzymanie w temperaturze 90-100 °C przez 1-2 godziny. Tak dużą termostabilność można było otrzymać dzięki technologii rekombinacji genetycznej. W ten sposób ulepszone zostały także inne cechy poprawiające skuteczność upłynniania skrobi. Najdogłębniej poznana jest produkcja  $\alpha$ -amylazy przez bakterie *Bacillus subtilis*, wykazującej optimum temperaturowe w zakresie od 65 do 70 °C w obecności jonów wapnia. Do zastosowań komercyjnych stosuje się jednak preferencyjnie  $\alpha$ -amylazę ze szczepu bakterii *Bacillus licheniformis*. Enzym ten

wykazuje stabilność i aktywność w temperaturach przekraczających 90 °C, zależną w małym stopniu od stężenia jonów wapnia i pH roztworu. Natomiast  $\alpha$ -amylaza pochodzenia grzybowego jest bardziej termolabilna, lecz odporniejsza na zmiany pH środowiska reakcji [Olempska-Beer i in., 2006].

Głównymi egzoamylazami stosowanymi w hydrolizie skrobi są glukoamylaza i  $\beta$ -amylaza. Glukoamylaza umożliwia wysoce skuteczną hydrolizę wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych. Enzym odszczepia po jednej cząsteczce glukozy aż do miejsca rozgałęzienia. Możliwa jest też, choć z niewielką szybkością, hydroliza wiązań 1,6-glikozydowych. Produktem końcowym reakcji katalizowanych przez ten enzym jest glukoza. Glukoamylazę pozyskuje się głównie z transgenicznych szczepów *Aspergillus niger* oraz *Aspergillus awamori*. Otrzymane z nich biokatalizatory cechują się dużą odpornością na zmiany pH (1,8-8,8 dla *A. niger* i 1,8-10,5 dla *A. awamori*), jednak największą aktywność wykazują w pH równym 4,0 do 5,6 i w temperaturze 40-65 °C. W odróżnieniu od  $\alpha$ -amylazy, jony  $\text{Ca}^{2+}$  wykazują w stosunku do glukoamylazy działanie hamujące [Pandey i in., 2000].

Działając na skrobię enzymem  $\beta$ -amylazą, jako produkt ostateczny otrzymuje się maltozę oraz tzw. dekstryny graniczne. Źródła tego enzymu, poza zbożami (pszenica, jęczmień czy soja) stanowią także bakterie i grzyby.  $\beta$ -amylaza katalizuje hydrolizę wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych między drugą a trzecią jednostką glukozową, licząc od nieredukującego końca łańcucha. Enzym ten nie potrafi hydrolizować wiązań 1,6-hydrolizowalnych.  $\beta$ -amylaza działa najefektywniej w środowisku o temperaturze 55-60 °C i pH około 5 [Pandey i in., 2000].

$\alpha$ - i  $\beta$ -amylazy nie hydrolizują wiązań 1,6-glikozydowych, a tempo ich rozkładu przy pomocy glukoamylazy nie jest dostateczne. Dlatego w procesach obróbki skrobi stosuje się także enzymy usuwające rozgałęzienia, które działają selektywnie na wspomniane wyżej wiązanie. Najważniejsze z tych enzymów to izoamylaza oraz pullulanaza [Pandey i in., 2000].

Pullulanaza pozwala na usunięcie rozgałęzień zarówno amylozy, jak i amylopektyny. Optimum temperaturowe dla tego enzymu wynosi około 60 °C. Enzym ten potrafi rozerwać wiązanie 1,6-glikozydowe jedynie w przypadku, gdy scala ono łańcuchy połączone wiązaniem  $\alpha$ -1,4 (tak jest na przykład w pullulanie). Oprócz tego produkowane są także przemysłowe preparaty pullulanaz, zdolne także do hydrolizy wiązań 1,4-glikozydowych. Pomimo że enzym ten występuje w roślinach (ryż czy

bawełna), to przemysłową pullulanazę pozyskuje się wyłącznie z bakterii, zarówno mezofilnych jak i termofilnych (np. *Geobacillus stearothermophilus*). Geny odpowiedzialne za produkcję tego enzymu zostały sklonowane z wielu szczepów. Struktura pierwszorzędowa pullulanazy wskazuje na duże pokrewieństwo z innymi enzymami amylolitycznymi. Pomimo wielu przeprowadzonych badań nad tym enzymem, w dalszym ciągu poziom jego ekspresji nie jest w pełni zadowalający, a jego właściwości pozwalające na użycie w przemyśle wciąż nie są idealne. Dlatego próbuje się to poprawić poprzez poszukiwanie odpowiedniego szczepu gospodarza oraz wydajnych wektorów ekspresji i sekrecji [Domań-Pytka i Bardowski, 2004].

Izoamylaza także umożliwia hydrolizę rozgałęzień łańcuchów polisacharydowych, w których występują wiązania 1,6-glikozydowe. Nie rozszczepia jednak połączeń, które występują w pullulanie, lecz w glikogenie (obecne są także w amylopektynie i dekstrynach granicznych). Najczęściej enzym ten pozyskuje się ze szczepów bakterii *Pseudomonas amyloclavata*, *Bacillus amyloliquefaciens* czy *Escherichia coli* [JECFA, 2006].

## 2.2. Enzymy pektynolityczne

Pektyna jest jednym z podstawowych polimerów strukturalnych ścian komórkowych roślin. Razem z ligniną, celulozą i hemicelulozami tworzy kompleksy o dużej wytrzymałości mechanicznej. Pektyna zaliczana jest do błonnika pokarmowego z tego względu, że nie podlega działaniu ludzkich enzymów trawiennych. Związek ten tworzy głównie polimer kwasu galakturonowego (poligalakturonian), będący częściowo estrem metylowym. Oprócz tego pektyna zawiera duże ilości cukrów obojętnych, takich jak arabinoza, ksylanoza, ramnoza czy galaktoza, w większości zlokalizowanych w rozgałęzionych fragmentach pektyny, które przeplatają się z liniowymi fragmentami poligalakturonianu. Preparaty enzymów pektynolitycznych produkowane były do niedawna wyłącznie w oparciu o dzikie szczepy grzybów nitkowatych ze środowisk naturalnych, często dodatkowo udoskonalonych konwencjonalnymi metodami mutagenizacji (wykorzystując do tego celu związki chemiczne czy promieniowanie UV). Preparaty te stanowiła na ogół mieszanina enzymów, które rozkładały wyłącznie liniowe fragmenty pektyn. Jednym z takich enzymów była pektynoesteraza, której towarzyszyły enzymy depolimeryzujące, których efektem działania była zbyt daleko posunięta degradacja pektyny. Uwalniały one dodatkowo rozgałęzione fragmenty pektyny, które



utrudniały ultrafiltrację i powodowały, że podczas przechowywania sok mętniał. Te cechy preparatów enzymatycznych spowodowały konieczność poszukiwania biokatalizatorów degradujących wybiórczo poszczególne rozgałęzione regiony pektyny, opartych głównie na drobnoustrojach zmodyfikowanych genetycznie. Uzyskano dzięki nim preparaty o wyższej aktywności, stabilności i precyzji działania w warunkach optymalnych z technologicznego punktu widzenia. Enzymy rozkładające selektywnie rozgałęzione części pektyny to m.in. grzybowe ramnogalakturonazy czy acetyloesteraza. Uwolnione jednak przez nie fragmenty w dalszym ciągu utrudniają ultrafiltrację, dlatego preparaty enzymatyczne powinny zawierać dodatkowo egzohydrolazy, które rozkładają początkowe produkty depolimeryzacji do monomerów. Zastosowanie w produkcji soków mieszaniny enzymów, otrzymanych z zastosowaniem technik modyfikacji DNA, które degradują wybiórczo rozgałęzione fragmenty pektyny, umożliwiło produkcję soków warzywno-owocowych, w których pektyna występuje w formie stabilnej i nie tworzy zawiesiny osadu. Soki takie charakteryzują się wysokimi walorami sensorycznymi [Twardowski i Michalska, 2001].

### 2.3. Enzymy proteolityczne

Proteazy są enzymami katalizującymi reakcję hydrolizy białek. W wyniku ich degradacji powstają krótsze peptydy i aminokwasy. Jest to bardzo zróżnicowana grupa biokatalizatorów, z różnym powinowactwem do substratów, mechanizmem katalizy, optimum temperaturowym i pH czy stabilnością w różnych środowiskach. Enzymy proteolityczne działają specyficznie ze względu na rodzaj grup funkcjonalnych aminokwasów (aromatycznych, alifatycznych czy zawierających siarkę) znajdujących się przy hydrolizowanym wiązaniu. Proteazy dzieli się ze względu na miejsce działania na endopeptydazy (tnące wiązania peptydowe wewnątrz cząsteczki białka) i egzopeptydazy (odszczepiające pojedyncze aminokwasy lub co najwyżej dipeptydy od N- oraz C-końca). Pomimo że egzopeptydazy znajdują komercyjne zastosowania, to znaczenie endopeptydaz dla przemysłu jest dużo większe. Proteazy mają generalnie największe znaczenie spośród wszystkich enzymów, o czym świadczy to, że ich szacowana wartość sprzedaży stanowi ok. 60% ogólnej sprzedaży enzymów na świecie [Sumantha i in., 2006].

Chymozyna oraz pepsyna (tzw. „kwaśne” proteazy) pochodzenia mikrobiologicznego pozyskiwane są z grzybów i bakterii. Chymozyna jest wytwarzana przez szczepy gatunków *Mucor miehei*, *M. pusillus* oraz *Endothia parasitica*. *M.*

*hiemalis*, *M. racemosus*, i *M. bacilliformis*. Pepsynę otrzymuje się z grzybów *Aspergillus* spp. i *Rhizopus* spp. W celu polepszenia termostabilności enzymów próbuje się także produkować enzymy przy pomocy termofilnych szczepów *Aspergillus* spp. [Sumantha i in., 2006].

Jedną z najbardziej spektakularnych historii przemysłowej inżynierii genetycznej dotyczy produkcji rekombinowanej chymozyny. Do znalezienia genetycznie zmodyfikowanego źródła tego enzymu doprowadziły badania w czasie trzech ostatnich dekad, które miały na celu zastąpić pozyskiwanie chymozyny (jak i towarzyszącej jej pepsyny) z żołądków młodych cieląt. Preparaty enzymatyczne pochodzenia zwierzęcego cechują się wysokim stopniem zanieczyszczenia oraz zmiennością właściwości użytkowych (nie uzyskano zadowalającej powtarzalności). Aby przezwyciężyć te trudności gen bydlęcy kodujący chymozynę sklonowano do szeregu mikroorganizmów. W konsekwencji chymozyna była pierwszym produktem inżynierii genetycznej, który uzyskał komercyjne zastosowanie w Wielkiej Brytanii. W 2002 roku dopuszczone do użytku były trzy rodzaje transgenicznej chymozyny. Enzym pozyskiwany na drodze mikrobiologicznej osiągnął wielki sukces ze względu na lepszą (w stosunku do zwierzęcego) stabilność właściwości oraz mniejszą ilość zanieczyszczeń [Rastall i Maitin, 2002]. Początkowo na drodze do sukcesu genetycznie zmodyfikowanej chymozyny stał jednak niski poziom akceptacji społecznej. Zastrzeżenia były kierowane ze strony wegetarian i niektórych ugrupowań religijnych. Jednak wraz z upływem czasu, dzięki właściwej polityce ze strony producentów żywności (np. serów), którzy skwapliwie umieszczali na etykietach informację o użyciu w procesie technologicznym rekombinowanego enzymu, pomimo iż chymozyna nie występowała w gotowym produkcie, społeczne przyzwolenie Brytyjczyków wzrosło. Obecnie większość serów twardych produkowana jest tylko przy użyciu takiej chymozyny [Rastall i Maitin, 2002].

Proteazy cysteiny, będące enzymami o neutralnym pH, mogą być pochodzenia roślinnego (bromelaina, ficyna oraz najbardziej termostabilna – papaina) lub mikrobiologicznego (papaina pozyskiwana z *Clostridium histolyticum* i *Streptococcus* spp.). Neutralne metaloproteazy są produkowane przez bakterie *Bacillus* spp., przy czym szczepy *Bacillus stearothermophilus* wytwarzają enzymy o podwyższonej termostabilności. Jednak największe komercyjne znaczenie mają neutralne proteazy grzybowe. Znajdują się w preparatach enzymatycznych wykorzystywanych w piekarnictwie, przetwórstwie żywności, obróbce białek, przemyśle skórzanym,

farmaceutycznym oraz żywieniu zwierząt. Głównym źródłem tego typu enzymów są szczepy *Aspergillus niger*, a zaraz po nich *A. sojae* [Sumantha i in., 2006].

Proteazy pochodzenia mikrobiologicznego mają wielkie znaczenie w przemyśle spożywczym. W serowarstwie uczestniczą w koagulacji białek mleka (kazeiny), a proteaza pozyskiwana z *Pseudomonas fluorescens* hydrolizuje peptydy odpowiedzialne za gorzki smak serów. Preparaty proteolityczne używa się w produkcji alkoholi – poprzez udostępnienie łatwo przyswajalnego źródła azotu polepszają wzrost drożdży. W piekarnictwie mają zastosowanie w degradacji białek mąki do produkcji ciastek, a w browarnictwie do izolacji białek ze słodu i jęczmienia. Używa się ich także do klarowania soków owocowych i likierów, do produkcji sosu sojowego, hydrolizy białek sojowych, żelatynowych, mięsnych oraz serwatkowych. Wspomagają również tenderyzację mięsa ryb i zwierząt lądowych [Sumantha i in., 2006].

#### 2.4. Enzymy lipolityczne

Lipazy są enzymami należącymi do klasy hydrolaz. Katalizują one reakcję hydrolizy triglicerydów w środowisku dwufazowym (woda-olej), a także potrafią przeprowadzić odwrotną reakcję w środowisku nieuwodnionym. Końcowymi produktami tej reakcji są wolne kwasy tłuszczowe i glicerol, lub częściej monoacyloglicerol, który zawiera nie usuniętą resztę kwasu tłuszczowego w pozycji 2. Katalizują również reakcje hydrolizy i transestryfikacji innych estrów. Zdolność do przeprowadzania specyficznych reakcji chemicznych jest powodem rosnącej popularności lipaz w technologii żywności, a także produkcji detergentów, kosmetyków czy przemysłu farmaceutycznego [Treichel, i in., 2009].

Metody chemiczne otrzymywania strukturyzowanych triacylogliceroli nie zapewniają odpowiednio wysokiej specyficzności i dają w rezultacie mieszaninę triacylogliceroli, których rozdzielenie wiąże się z dużym wysiłkiem. Metody te przestały być atrakcyjne z chwilą, gdy na rynku pojawiły się preparaty lipaz, głównie pochodzenia mikrobiologicznego, o poznanej regio- i stereo specyficzności [Twardowski i Michalska, 2001].

Od lat 80. XX wieku liczba dostępnych enzymów lipolitycznych stale rośnie. Przyczyną tego stanu rzeczy w głównej mierze są osiągnięcia związane z klonowaniem i ekspresją genów w komórkach mikroorganizmów, jak również rosnące wymagania

dotyczące właściwości tych biokatalizatorów, jak specyficzność, stabilność, optimum pH i temperatury [Treichel, de Oliveira i in., 2009].

Lipazy produkowane są przez zwierzęta, rośliny i drobnoustroje, jednak te pochodzenia mikrobiologicznego są cenione najbardziej z uwagi na dużą selektywność, stabilność oraz szeroką specyficzność substratową. Lipazy zwierzęce i roślinne są z reguły mniej termostabilne. Zewnątrzkomórkową lipazę produkuje wiele gatunków bakterii, drożdży czy grzybów. Część z nich jest mieszaniną kilku enzymów pochodzących od różnych genów. W różnych technologiach wykorzystuje się lipazy grzybowe, będące monomerami o masie cząsteczkowej od 30 do 60 kDa, ze szczepów *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicilium* i *Pseudomonas* [Akoh i Min, 2008].

Zaletą takich handlowych lipaz jest zachowanie stabilności i aktywności katalitycznej w zakresie temperatur do 80 °C w środowisku rozpuszczalników organicznych. W tak drastycznych warunkach o niskiej zawartości wody lipazy katalizują proces syntezy wiązań estrowych pomiędzy kwasami organicznymi (na przykład kwasami tłuszczowymi) a glicerolem lub innymi związkami o charakterze alkoholi. Pomocne w odkrywaniu mechanizmów działania lipaz oraz ich relacji ze strukturą białka okazały się modyfikacje genetyczne udoskonalające właściwości tych enzymów. Obecnie większość lipaz, wytwarzanych przez drobnoustroje transgeniczne, jak również przez organizmy nie poddane modyfikacjom genetycznym, wykazuje specyficzność wobec pozycji 1 i 3 w cząsteczce triacyloglicerolu, jednak ostatnio pojawiają się doniesienia o biokatalizatorach zdolnych do odszczepienia kwasu tłuszczowego także z pozycji 2, co ułatwia wstawienie w to miejsce pożądanego wolnego kwasu tłuszczowego [Twardowski i Michalska, 2001].

Pierwszym zastosowaniem lipaz do produkcji ustrukturyzowanych triacylogliceroli była produkcja zamiennika tłuszczu kakaowego. Stanowi on jeden ze składników w produkcji czekolady. Jest to tłuszcz o temperaturze topnienia 32-35°C, zawierający w pozycji 2 przeważnie kwas oleinowy, a w pozycjach 1 i 3 kwasy palmitynowy i stearynowy. Wytwarzany obecnie zamiennik tłuszczu kakaowego z zastosowaniem udoskonalonych lipaz jest w pełni porównywalny z naturalnym. Zastosowanie tych biokatalizatorów pozwoliło również na produkcję zamiennika mleka kobiecego, bogatego w wolne nienasycone kwasy tłuszczowe i kwas palmitynowy. W tłuszczu tym kwas palmitynowy znajduje się w pozycji 2, a nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycjach 1 i

3. Dzięki temu w przewodzie pokarmowym dziecka nie tworzą się nierozpuszczalne sole wapnia i wolnego kwasu palmitynowego, mogące prowadzić do odwapnienia i zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu [Twardowski i Michalska, 2001].

Esterazy, stanowiące odrębną kategorię enzymów lipolitycznych, również mają zdolność do estryfikacji oraz hydrolizy tłuszczów, jednak w przeciwieństwie do lipaz mogą katalizować te reakcje jedynie w środowisku nieuwodnionym. Najbardziej aktywnymi producentami tych enzymów okazują się być grzyby z rodzaju *Aspergillus*, w warunkach fermentacji na podłożu stałym. W toku badań wyróżniono sześć szczepów transgenicznych ze statusem GRAS, z których pozyskane preparaty enzymatyczne wykazywały dużą aktywność nawet bez procesów izolacji i oczyszczania. Produkcja esteraz była indukowana dodatkiem substratu: kwasu laurynowego i jednego z fitosteroli roślinnych –  $\beta$ -sitosterolu. Enzym katalizujący estryfikację tych składników do laurynianu sterolowego i wykazujący największą aktywność pochodził szczepów *A. oryzae* NRRL 6270 i *A. sojae* NRRL 6271 [Enikő, Viviána i in., 2007].

Z technologicznego punktu widzenia bardzo ważną właściwością lipaz i esteraz jest zdolność do tworzenia wiązań nie tylko pomiędzy glicerolem i kwasami tłuszczowymi, lecz także pomiędzy innymi alkoholami i tymi kwasami. Do związków o charakterze alkoholi można tutaj zaliczyć także cukrowce. W środowisku polarnych rozpuszczalników organicznych w obecności enzymów lipolitycznych uzyskano estry kwasów tłuszczowych i takich sacharydów, jak sacharoza czy glukoza. Dało to początek takim preparatom handlowym jak Olestra, zawierającym estry kwasów tłuszczowych nie ulegającym hydrolizie w układzie pokarmowym człowieka, dzięki czemu można je stosować jako zamienniki tłuszczu w produktach niskokalorycznych. Z zastosowaniem lipaz i esteraz produkuje się także estry kwasów tłuszczowych i kwasu askorbinowego. W odróżnieniu od witaminy C, pochodne te rozpuszczalne są nie tylko w środowisku wodnym, lecz także w środowisku lipidów, co pozwala na wzbogacenie w tę witaminę produktów zawierających dużo tłuszczów. Modyfikacje genetyczne prowadzące do uzyskania lipaz o wysokiej stereo- i regiospecyficzności umożliwiają produkcję szeregu estrów kwasów tłuszczowych i glicerolu, cukrowców lub innych związków o sprecyzowanym, korzystnym wpływie na zdrowie człowieka [Twardowski i Michalska, 2001].

## 2.5. Inne enzymy

Przetwory owocowo-warzywne, funkcjonalne i bogate w pektynę, powinny także cechować się stosownym aromatem. W celu uniknięcia dodatku obcych substancji do produktów, poddaje się je działaniu enzymów rozkładających glikozydy, które stanowią bezwonne pochodne związków zapachowych. Następuje reakcja odłączania końcowych reszt glukozy, arabinozy, ksylozy i innych składników. Operacja ta uwalnia składniki aromatu. Niski poziom pH występujący w sokach roślinnych oraz obecność inhibującej glukozy powodowały niską aktywność glikozydaz występujących naturalnie w komórkach roślinnych. Zaczęto więc stosować enzymy pochodzenia mikrobiologicznego. Jako pierwsze wykorzystano enzymy hydrolityczne ze szczepu *Aspergillus niger*. Wykazywały one wyższą aktywność od enzymów natywnych w kwaśnym soku owocowym, były jednak nadal hamowane przez wysokie stężenie glukozy. Z tego względu uzyskano szereg zmutowanych szczepów produkujących biokatalizatory stabilne w niskim pH i nie inhibowane przy wysokich stężeniach glukozy [Twardowski i Michalska, 2001].

Obecne możliwości w zakresie konstrukcji genetycznie zmodyfikowanych drobnoustrojów pozwala na wytworzenie enzymów optymalnych ze względu na skład używanego do produkcji surowca, co pozwala na wybiórcze usuwanie wybranych składników soku nie oddziałując przy tym na pozostałe substancje. Wygodnym okazała się immobilizacja enzymów na odpowiednich stałych nośnikach, pozwalająca na łatwe usuwanie niepożądanych związków z ostatecznego produktu [Twardowski i Michalska, 2001].

Metody biotechnologiczne pozwalają na otrzymanie oligo- i polisacharydów oraz różnorodnych pochodnych cukrów o dokładnie zdefiniowanej strukturze. Produkcja tych związków metodami chemicznymi jest żmudna i pracochłonna ponieważ wymaga specyficznego blokowania grup funkcyjnych. Dlatego zastąpiono produkcję chemiczną biosyntezą z użyciem enzymów wytwarzających wiązania pomiędzy dwiema resztami sacharydów. Oprócz hydrolaz glikozydowych używa się w tym celu glikozylotransferazy. Katalizują one reakcje przeniesienia reszty monosacharydu z donora (którym może być pochodna nukleotydu cukru czy oligosacharyd) na akceptor cukrowy. Sposobem tym produkuje się takie oligosacharydy i polimery jak alternan, dekstran, mutan czy czysta amyloza. Reakcje prowadzi się w warunkach optymalnych dla nowo powstałych wiązań glikozydowych, co nie zawsze koreluje z wysoką aktywnością stosowanego biokatalizatora. Stosując techniki inżynierii genetycznej uzyskano enzymy o większej

specyficzności do substratu i stabilność w środowisku polarnym. Otrzymane dzięki transgenicznym mikroorganizmom związki znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Są to między innymi cenione wypełniacze żywności, niektóre pełniące rolę prebiotyków [Twardowski i Michalska, 2001].

### 3. Szczepy transgeniczne w produkcji enzymów

#### 3.1. Etapy uzyskiwania rekombinowanych szczepów

Otrzymanie szczepu drobnoustrojów produkującego zmodyfikowany produkt jest zawsze poprzedzone okresem intensywnych poszukiwań i badań. Zwykle dzielą się one na następujące etapy:

- a) studia nad szczepem mającym zostać zmodyfikowany (gospodarz);
- b) konstrukcja wektora ekspresyjnego (pozwalającego na bardzo wydajne produkowanie białka kodowanego przez transgen w transformowanych komórkach);
- c) modyfikacja szczepu gospodarza;
- d) identyfikacja i izolacja szczepu o najbardziej pożądanym cechach;
- e) dodatkowe ulepszenia otrzymanego szczepu oraz
- f) szczegółowa jego charakteryzacja.

Każdy z tych etapów jest specyficzny w zależności od właściwości danego mikroorganizmu i metod genetycznych, które można zastosować do jego modyfikacji [Olempska-Beer i in., 2006].

#### 3.2. Bezpieczeństwo preparatów enzymatycznych

Rządy poszczególnych krajów same decydują o wprowadzeniu danej substancji do produkcji żywności. Swoje decyzje opierają o sądy uznanych i poważanych instytucji zajmujących się kontrolą stanu żywności. Jedną z najbardziej znanych tego typu urzędów jest Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (Food And Drug Administration - w skrócie FDA). Jest ona znana z rygorystycznych przepisów związanych z wydawaniem zezwoleń na dopuszczenie do obrotu substancji dodawanych do żywności oraz leków. Jeśli już takie zezwolenie zostanie wydane, to i tak dodatki do żywności (w tym preparaty enzymatyczne) podlegają ścisłej kontroli Agencji. Wyjątkiem są substancje generalnie uznane (przez ekspertów wykwalifikowanych pod względem oceny bezpieczeństwa żywności) za bezpieczne (Generally Recognized as Safe - w skrócie GRAS) [Gaynor, 2006].

17 kwietnia 1997 roku FDA zaproponowała nowy sposób oceny bezpieczeństwa substancji stosowanych w żywności. Status GRAS przyznawano na podstawie przysyłanych zgłoszeń od

osób

i instytucji, dostarczających wyczerpującej dokumentacji naukowej potwierdzającej bezpieczeństwo danej substancji. Od roku 1997 FDA pozytywnie rozpatrzyła ponad 35 wniosków o przyznanie statusu GRAS preparatom enzymatycznym otrzymanych z natywnych oraz transgenicznych mikroorganizmów. Pełną listę zgłoszeń substancji GRAS do amerykańskiej Agencji można zobaczyć na stronie internetowej

(<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing>).

### 3.3. Komercyjna produkcja enzymów

Obecnie wiele enzymów używanych w przetwórstwie żywności jest pozyskiwanych z genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów. Producenci enzymów korzystają z nowych technik inżynierii genetycznej w celu opracowywania i produkcji enzymów z poprawionymi właściwościami. Wywodzą się one często z drobnoustrojów, które nie mogą być łatwo hodowane w warunkach laboratoryjnych czy przemysłowych. Poprzez odpowiednią selekcję organizmu gospodarza, szczepy rekombinantów mogą być tak skonstruowane, aby umożliwić wydajną produkcję enzymów wolnych od niepożądanych enzymów i innych metabolitów [Olempska-Beer i in., 2006].

Tabela 1. Najpopularniejsze preparaty enzymatyczne, które uzyskały status GRAS [Olempska-Beer i in., 2006].

Szczep	Enzym
<i>Aspergillus niger</i>	Chymozyna Fitaza Lipaza
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esteraza–lipaza Proteaza aspartylowa Oksydaza glukozowa Oksydaza fenyłowa Lipaza Esteraza pektynowa Fosfolipaza
<i>Bacillus licheniformis</i>	$\alpha$ -amylaza Pullulanaza Dekarboksylaza-proteaza
<i>Bacillus subtilis</i>	Dekarboksylaza $\alpha$ -acetomleczanu $\alpha$ -amylaza Maltogenna $\alpha$ -amylaza Pullulanaza
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	$\alpha$ -amylaza
<i>Escherichia coli</i> K-12	Chymozyna
<i>Fusarium venenatum</i>	Ksylanaza
<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	Chymozyna Laktaza
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biovar I	$\alpha$ -amylaza
<i>Trichoderma reesei</i>	Liaza pektynowa



Listę komercyjnych enzymów wykorzystywanych w przetwórstwie żywności jest udostępniona na stronie internetowej Enzyme Technical Association (<http://www.enzymetechnicalassoc.org/>) lub Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (<http://www.amfep.org/>). W dalszej części pracy zostaną omawiane najważniejsze mikrobiologiczne źródła enzymów, które zostały umieszczone w tabeli 1.

#### 4. Bakteryjne źródła enzymów

##### 4.1. *Bacillus* sp.

W produkcji enzymów ważnych dla technologii żywności najważniejszą rolę odgrywają dwa gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus*: *B. subtilis* oraz *B. licheniformis*. Pierwszy z nich od wielu dziesiątek lat jest źródłem bakteryjnej  $\alpha$ -amylazy oraz proteaz. Najbardziej znanym szczepem tego gatunku jest dziki typ 168, z którego wywodzi się wiele szczepów wykorzystywanych przemysłowo, również zmodyfikowanych genetycznie. Jego genom został zsekwencjonowany w ubiegłym wieku [Kunst i in., 1997].

Bezpieczeństwo enzymów z transgenicznej *B. subtilis* jest udokumentowane w danych GRAS oraz wielu publikacjach. Bakteria ta jest po *Escherichia coli* najbardziej poznany gatunek w biotechnologii. Inne gatunki z rodzaju *Bacillus*, głównie *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* oraz *G. stearothermophilus* także zostały z powodzeniem zaadaptowane jako organizmy gospodarzy produkujące egzogenne enzymy, przeważnie  $\alpha$ -amylazę. Znana jest sekwencja genomu dwóch przemysłowych szczepów *B. licheniformis*. Fakt ten zwiększa jego zaufanie do stosowania jako producenta enzymów wykorzystywanych w technologii żywności. Okazało się bowiem, że *B. licheniformis* ma wiele sekwencji zgodnych z *B. subtilis*, a znikomą ilość elementów wspólnych z chorobotwórczymi gatunkami *Bacillus* (mowa tu głównie o *B. cereus* wytwarzającym szereg toksyn oraz *B. anthracis* wywołującym chorobę zwaną wąglikiem). *B. subtilis* oraz *B. licheniformis* nie wydzielają toksycznych metabolitów wtórnych i z tego powodu są zaufanymi producentami enzymów używanych w przetwórstwie żywności [Ray i in., 2004].

Bakterie z rodzaju *Bacillus* są gram-dodatnimi, przeważnie bezwzględnie tlenowymi pałeczkami, pełniącymi w przyrodzie rolę saprofitów. Mają zdolność do tworzenia spor w odpowiedzi na stres żywieniowy. W niektórych przypadkach proces ten

ma korzystny wpływ na produkcję danego metabolitu (np. produkcja przez *B. thuringensis* związku wykorzystywanego jako pestycyd), lecz w procesie wytwarzania enzymów wykorzystywanych w technologii żywności, tworzenie spor jest niepożądanym zjawiskiem. Udało się je wyeliminować stosując metody mutagenizacji. Mutanty pozbawione możliwości tworzenia spor są stosowane obecnie jako gospodarze produkujący z dużą wydajnością enzymy o znaczeniu przemysłowym [Olempska-Beer i in., 2006].

Główną zaletą rodzaju *Bacillus* w roli komórek gospodarza produkujących enzymy na skalę przemysłową jest zdolność do wydzielania enzymów poza komórkę, co niezwykle ułatwia ich izolację. Jednak oprócz poszukiwanych produktów na zewnątrz komórki uwalniane są także substancje niepożądane. Największym problemem było wydzielanie proteaz, które powodowały degradację enzymów stanowiących produkt biosyntezy. Problem ten wyeliminowano w podobny sposób co zdolność komórek do sporulacji, to znaczy poprzez otrzymanie mutantów wytwarzających śladowe ilości proteaz. Zmienione w ten sposób komórki z rodzaju *Bacillus*, niesporulujące oraz mające ograniczone właściwości proteolityczne, są obecnie standardowo wykorzystywane do produkcji enzymów egzogennych [Olempska-Beer i in., 2006].

#### 4.2. *Escherichia coli* K-12

Chymozyna wytwarzana przez zmodyfikowane genetycznie komórki *E. coli* K-12 była pierwszym transgenicznym enzymem, który uzyskał pozwolenie rządu Stanów Zjednoczonych na stosowanie w technologii żywności. Zastąpienie źródeł zwierzęcych tego enzymu źródłami mikrobiologicznymi pozwoliło na znaczne obniżenie kosztów jego pozyskiwania. Komórka *E. coli* wytwarzająca chymozynę zawiera bydlęcy gen kodujący prochymozynę, która ulega konwersji do chymozyny przez obniżenie pH. Nie są one wydzielane na zewnątrz komórki, zatem w celu pozyskania enzymu komórki należy poddać lizie. W przeciwieństwie do chymozyny pochodzenia zwierzęcego, preparaty enzymatyczne pozyskane z *E. coli* cechują się brakiem proteaz oraz innych substancji obcych, dzięki czemu preparaty te są czyste i charakteryzują się wysoką aktywnością enzymatyczną [Wayne Hutkins, 2006].

Genom *E. coli* K-12 został zsekwencjonowany w 1997 roku, a sama bakteria jest obecnie najlepiej zbadanym szczepem w biotechnologii. Jest uznawany za bezpieczny i został dopuszczony bez większych przeszkód do produkcji enzymów technologii żywności. W przeciwieństwie do niektórych pozostałych szczepów, *E. coli* K-12 nie

wytwarza toksyn w żywności. W ciągu 30 lat hodowli laboratoryjnych nie zanotowano ani jednego przypadku infekcji z udziałem tego mikroorganizmu [Blattner i in., 1997].

#### 4.3. *Pseudomonas fluorescens*

Status GRAS otrzymał również preparat  $\alpha$ -amylazy produkowany przez bakterie z gatunku *Pseudomonas fluorescens*, szczep Biovar I. Ponieważ bakteria ta nie miała historii wcześniejszego użytkowania, firma Innovase chcąc produkować za jej pośrednictwem  $\alpha$ -amylazę sfinansowała wszystkie badania określające jej bezpieczeństwo. Bakteria ta została w ten sposób scharakteryzowana na poziomie genotypu oraz fenotypu. Jest to niechorobotwórcza i niewytwarzająca toksyn, gram-ujemna pałeczka. Występuje pospolicie w glebie i jest zjadana powszechnie przez ludzi razem z warzywami oraz owocami. Pierwszy raz została wyizolowana z sałaty na farmie w Kalifornii. Jej genom został już zsekwencjonowany (szczep Pf-5). Tak jak *E. coli*, nie wydziela enzymów na zewnątrz komórki [Paulsen i in., 2005].

### 5. Grzyby jako źródło enzymów

#### 5.1. *Aspergillus* sp.

*Aspergillus niger* jest drobnoustrojem o dużym znaczeniu dla współczesnej biotechnologii. W przyrodzie jest wszechobecny. Miejscem jego bytowania jest gleba, wszelkiego rodzaju odpady organiczne czy gnijące części roślin. *A. niger* rośnie w postaci czarnych kolonii w przedziałach temperatury od 6 do 47 °C, z dosyć wysokim optimum temperaturowym 35-37 °C. Limit aktywności wody jest, w porównaniu z innymi *Aspergilli*, dosyć wysoki i jego wartość wynosi 0,88. Tym, co wyróżnia *A. niger* jest jego zdolność do wzrostu w niesamowicie szerokim spektrum pH, zawierającym się pomiędzy 1,4 a 9,8. Te cechy, a także możliwość wytwarzania olbrzymiej ilości przenoszonych przez powietrze konidiosporów, zadecydowały o wszechobecności *A. niger* w środowisku [Schuster i in., 2002].

*A. niger* jest stosowany, od dziesiątek lat, do produkcji kwasu cytrynowego (w tym celu zaczął być wykorzystywany już w 1919 roku) i enzymów stosowanych w technologii żywności. Enzymy te od lat 60. ubiegłego wieku stosuje się w przetwórstwie owoców, piekarnictwie, hydrolizie skrobi oraz innych gałęziach przemysłu spożywczego. Oprócz zastosowania w przemyśle spożywczym, *A. niger* wykorzystywany jest do biodegradacji

zanieczyszczeń. Grzyb ten w ciągu ostatniego dwudziestolecia został zaadaptowany jako komórka gospodarza. Zachodzi w niej nadekspresja enzymów pochodzenia zewnętrznego, głównie wykorzystywanych w technologii żywności. Pewną wadą *A. niger* jest zdolność do zarodnikowania, powodująca powstawanie pyłów podczas hodowli tego drobnoustroju. W porównaniu z innymi grzybami strzępkowymi problem ten nie jest jednak znaczący. Jak dotąd stwierdzono jedynie sporadyczne przypadki infekcji tym drobnoustrojem (atakowanym narządem były przeważnie płuca), za każdym razem u osób z obniżoną odpornością immunologiczną. W klimacie tropikalnym zdarzają się infekcje zewnętrznych kanałów usznych, lecz *A. niger* przedostaje się w to miejsce przez uszkodzoną barierę skórną, a nie drogą pokarmową. *A. niger* produkuje także szereg wtórnych metabolitów, z których jedynie jeden z nich, ochratoksyna A, może być rozpatrywana jako mikotoksyna. Badania na temat toksyczności różnych szczepów *A. niger* wykazały, że od 3 do 10% z nich jest zdolne do wytwarzania wspomnianej toksyny w warunkach przemysłowych. Te szczepy nie są zatem wykorzystywane do produkcji enzymów. Z tego powodu nowe szczepy tego mikroorganizmu są badane na obecność wspomnianej ochratoksyny. Eksperti z FAO/WHO wielokrotnie badali bezpieczeństwo szczepów *A. niger* a amerykańska agencja FDA już we wczesnych latach 60. uznała wyizolowane z nich preparaty enzymatyczne jako generalnie bezpieczne. Długa historia bezpiecznego stosowania *A. niger* powoduje chętnie wykorzystywanie tego mikroorganizmu w charakterze gospodarza ekspresji enzymów egzogennych. Został do niego wklonowany szereg genów mających znaczenie w przemyśle, jak również odpowiednie sekwencje regulatorowe, dostosowujące ekspresję genów do poziomu przemysłowego. Modyfikacja polega przeważnie na zastąpieniu rozrzuconych po całym genomie genów kodujących glukoamylazę pożądanymi przez nas genami. Metoda modyfikacji w tym wypadku jest niezwykle skuteczna [Schuster i in., 2002].

*Aspergillus oryzae* jest szeroko wykorzystywany w produkcji żywności dalekowschodniej, głównie japońskiej. Tylko za jego pomocą można wytworzyć produkty, w Japonii obecne niemal w każdym domu, takie jak sos sojowy, sojowa pasta miso czy ryżowe wino sake. Historia jego użytkowania sięga 3 tysięcy lat wstecz do starożytnych Chin. Technologia wykorzystania tego grzyba została przeniesiona do Japonii między X wiekiem p.n.e. a III wiekiem n.e., a pierwsze jego komercyjne inokulaty stawały się dostępne pod nazwą *koji* od XIII-XV wieku. Kluczowym składnikiem *koji* były konidiospory zmieszane z popiołem. Obecnie wiadomo, że alkaliczny odczyn popiołu w połączeniu z obecnymi w nim składnikami mineralnymi

polepszały kondycję zarodników. Pierwsze zastosowanie *A. oryzae* do przemysłowej produkcji na podłożu stałym miało miejsce w 1894 roku. Dotyczyło syntezy Taka-diastazy – związku odkrytego przez Jokichiego Takamine, mającego leczyć ból brzucha. Obecnie *koji* jest źródłem wielu otrzymywanych przemysłowo enzymów (głównie amylaz, proteaz i lipaz), a także związków chemicznych [Machida i in., 2008].

Długa historia bezpiecznego stosowania *A. oryzae* w produkcji żywności zaowocowała uznaniem przez FDA przemysłowych zastosowań tego grzyba jako generalnie bezpiecznych. Bezpieczeństwo tego drobnoustroju uznaje również WHO. Jego genom został w pełni zsekwencjonowany. Pomimo bliskiego genomowego pokrewieństwa *A. oryzae* i *A. flavus* znanego z produkcji karcinogennej mikotoksyny, u *A. oryzae* nigdy nie zarejestrowano produkcji żadnych rakotwórczych metabolitów [Machida i in., 2008].

W wyniku wyteżonych wysiłków naukowców uzyskano mutanty *A. oryzae* całkowicie pozbawione genów produkcji aflatoksyn oraz innych niepożądanych metabolitów wtórnych. Uzyskany szczep, BECh2, stał się gospodarzem produkującym trzy masowo produkowane enzymy: lipazę triacyloglicerolu, oksydazę glukozową oraz fosfolipazę A1. Gospodarzami zostały również inne szczepy tego gatunku, a metody jego skutecznej transformacji znane są już od późnych lat 80. ubiegłego wieku [Olempska-Beer i in., 2006].

## 5.2. *Fusarium venenatum*

W roku 2001 FDA nadało status GRAS preparatowi ksylanazy otrzymanej z rekombinowanego szczepu grzybów strzępkowych z gatunku *Fusarium venenatum*. Gen kodujący ten enzym został sklonowany z gatunku *Thermomyces lanuginosus*. Wspomniany szczep gospodarza *F. venenatum* jest zmodyfikowanym organizmem potomnym dzikiego szczepu A3/5, który został po raz pierwszy wyizolowany, w roku 1968, z próbki ziemi w Wielkiej Brytanii. Gatunek ten stał się znany dzięki zdolności wytwarzania mikoproteiny używanej do produkcji wysokobiałkowego wyrobu żywnościowego, znanego pod nazwą *Quorn*. Początkowo sprzedawany tylko w Wielkiej Brytanii, ostatnio zaczyna być komercjalizowany także w pozostałych krajach Europy i w Stanach Zjednoczonych. Mikoproteina wytwarzana przez *F. venenatum* także została uznana przez FDA za generalnie bezpieczną do stosowania jako ekwiwalent białka zwierzęcego [Olempska-Beer i in., 2006].

*F. venenatum* jest również producentem innych enzymów egzogennych: oksydazy laktozowej z *Microdochium nivale*, karboksypeptydazy seryny oraz aminopeptydazy z *A. oryzae*, a także glukoamylazy z *A. niger*. Jedynie dwa pierwsze z nich są otrzymywane ze szczepów, które są pozbawione genu kodującego syntazę trichodieniu, prekursora trichotecenów. Dziki szczep A3/5 oraz jego pochodne są bowiem zdolne do produkcji, w pewnych szczególnych warunkach hodowli, trichotecenów oraz innych mikotoksyn, jak również cyklicznego peptydu eniatyny B. Optymalizacja warunków hodowli pozwala na uniknięcie ich wydzielania. Aby potwierdzić brak szkodliwych metabolitów w preparatach pochodzących od *F. venenatum*, przeprowadza się regularną ich kontrolę. Można się również zabezpieczyć się przed trichotecenami przez usunięcie z genomu *F. venenatum* genu *tri5* kodującego syntazę trichodieniu. Jest to enzym katalizujący pierwszą reakcję w biosyntezie trichotecenów. Szczep LyMC4.B pozbawiony tego genu za pomocą mutagenizacji jest uznanym i bezpiecznym źródłem ksylanazy. Zdecydowały o tym niska toksynogenność w warunkach przemysłowych, brak patogenności oraz dobrze scharakteryzowane insercyjne DNA [Olempska-Beer i in., 2006].

### 5.3. *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*

Status GRAS uzyskały dwa preparaty enzymatyczne otrzymane z tego gatunku mikroorganizmów. Od wielu lat pozyskiwana jest z niego laktaza, używana w przemyśle mleczarskim do hydrolizy laktozy do galaktozy i glukozy. Natomiast drugim enzymem otrzymywanym ze zmodyfikowanego genetycznie szczepu tego gatunku jest chymozyna. Szczep SL56 jest gospodarzem bydlęcego genu kodującego prochymozynę. Jego zaletami jest dogłębnie poznana charakterystyka fermentacji oraz zdolność do wydzielania enzymu poza komórkę. *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* jest bezpiecznym źródłem obu preparatów enzymatycznych ze względu na jego niepatogenność i niezdolność do produkcji toksyn [van den Berg i in., 1990].

### 5.4. *Trichoderma reesei*

Rozmnażające się bezpłciowo grzyby strzępkowe *Trichoderma reesei* zostały po raz pierwszy wyizolowane z włókien bawełny na Wyspach Salomona podczas II Wojny Światowej. Gatunek ten jest unikatowy, ponieważ wszystkie obecne szczepy przemysłowe pochodzą od tego jednego izolatu [Kuhls i in., 1996].

Jest znany głównie z produkcji hemicelulazy, ksylanazy, a także najważniejszej - celulazy, której to preparat uzyskał status GRAS ze względu na niepatogenność i nietoksynogenność produkującego go szczepu. Jest ona używana od szóstej dekady XX wieku w przemyśle papierniczym, farmaceutycznym, paszowym oraz w technologii żywności, przeważnie w piekarnictwie, słodownictwie i gorzelnictwie [Nevalainen i in., 1994].

Analiza genomu *T. reesei* ujawniła dużą jego podatność na modyfikacje, co daje duże możliwości w wykorzystaniu tego mikroorganizmu jako gospodarza egzogennych genów kodujących enzymy. W ten sposób do *T. reesei* wprowadzono geny odpowiedzialne za ekspresję tak cennych dla przetwórstwa żywności biokatalizatorów jak  $\alpha$ -amylaza, aminopeptydaza, liaza pektynowa, esteraza pektynowa, fosfolipaza A (z *Aspergillus* sp.), dekarboksylaza  $\alpha$ -acetomleczanu (z *Thielavia* sp.) czy fitaza (z *Hormoconis* sp.) [Penttilä i in., 2004].

## 6. Uzyskiwanie transgenicznych drobnoustrojów

### 6.1. Transformacja i identyfikacja modyfikowanych komórek

Modyfikacji genomu komórek można dokonać przy pomocy narzędzi inżynierii genetycznej bądź mutagenyzy. Jedynie w pierwszym przypadku do organizmu gospodarza można dostarczyć geny pochodzące z innego organizmu. Wektory ekspresyjne w postaci plazmidów są przenoszone z komórki do komórki przez bakterie tego samego gatunku (koniugacja), mogą być również pobrane przez komórki innych gatunków mikroorganizmów w stanie tzw. kompetencji (czyli zdolności do przyjęcia egzogennej materii genetycznej). Wprowadzanie obcego DNA do komórek nie zachodzi zwykle z wysoką wydajnością, dlatego przed tym krokiem stosuje się namnażanie plazmidów w modelowych komórkach *E. coli*. Następnie materiał genetyczny izoluje się i za pomocą różnych metod wprowadza do komórki docelowej. Przykładowo ze względu na obecność grubej ściany komórkowej, bakterie gram-dodatnie doprowadza się do stanu kompetencji metodami elektroporacji, czyli działając na nie krótkim wyładowaniem elektrycznym o wysokim napięciu [Grajek i Schmidt, 2006].

W celu wyodrębnienia z mieszaniny komórek tylko tych, które uległy modyfikacji, stosuje się markery, czyli geny selekcyjne. Najczęściej stosowanymi markerami w biotechnologii są geny oporności na antybiotyki. Po dodaniu do pożywki hodowlanej antybiotyku, pozostają tylko te komórki, które przyjęły transgen. Pomimo wygody stosowania tego rodzaju markerów, ich używanie w przemyśle spożywczym jest

zabronione. Zamiast nich genami selekcyjnymi są przykładowo geny bakteriocyn czy geny nadające komórce zdolność do wykorzystania nietypowej cząsteczki jako źródła węgla [Grajek i Schmidt, 2006].

Mutageneza jest procesem, w którym w sposób niekontrolowany uzyskuje się mikroorganizmy o zmienionym genotypie – mutanty. Mutacje spontaniczne w przemyśle nie są pożądane, gdyż ich efektów nie można przewidzieć i prowadzą najczęściej do obniżenia wydajności procesu. Nieprawidłowości w mechanizmach replikacji bądź rekombinacji, które prowadzą do powstania mutacji, są wywoływane przez szereg czynników fizycznych bądź chemicznych. W większości przypadków mutacje są albo obojętne dla przydatności przemysłowej drobnoustroju, albo ją obniżają. Dlatego istotnym, lecz czasochłonnym, elementem mutagenezy jest selekcja mutantów o pożądanym układzie cech fenotypowych. Metody mutagenezy cechują się znaczną nieprzewidywalnością – nowe zmiany w genomie są generowane w sposób losowy. Przy technologicznym zastosowaniu mutagenezy należy ocenić, czy poza mutacjami korzystnymi nie nastąpiły także inne zmiany, do czego konieczne są drogie i żmudne badania. Metody inżynierii genetycznej pozwalają natomiast na przeniesienie danego genu z jednej komórki do drugiej w ściśle kontrolowany sposób. Niestety metody te nie cieszą się wielką akceptacją społeczną [Grajek i Schmidt, 2006].

## 6.2. Wektory ekspresyjne

Geny wprowadzane do organizmów gospodarzy są zazwyczaj przenoszone przez wektory ekspresyjne. Najczęściej stanowi go plazmid zawierający pożądaną kasetę ekspresyjną. Plazmidy są niewielkimi elementami genetycznymi, podlegającymi we wnętrzu komórki gospodarza replikacji niezależnie od jej podziałów komórkowych. Ponieważ różnorodne organizmy wykształciły różne mechanizmy inicjacji oraz terminacji transkrypcji, kasetę ekspresyjną oprócz genu kodującego dane białko musi się składać z silnego promotora oraz terminatora, które zadziałają w komórce biorcy. Aby wyodrębnić z mieszaniny komórek te, które przyjęły skonstruowany plazmid, należy posłużyć się także selektywnym markerem. Najczęściej jest on zlokalizowany na tym samym plazmidzie co kasetę ekspresyjną, lecz zdarzają się również przypadki wprowadzania do komórki dwóch rodzajów wektorów: jednego zawierającego kasetę, i drugiego z selektywnym markerem [Grajek i Schmidt, 2006].

Do najczęściej używanych plazmidów w produkcji enzymów należą pUB110, pUC18



i pUC19. pUB110 został wyizolowany z bakterii *Staphylococcus aureus* i jest wykorzystywany głównie jako wektor ekspresyjny dla rodzaju *Bacillus*. Plazmidy pUC18 oraz pUC19 zostały skonstruowane z myślą o ich wykorzystaniu w komórkach *E. coli*. Zawierają one marker selekcyjny – gen *amp<sup>r</sup>* kodujący enzym oporności na ampicylinę. W celu zastosowania tego plazmidu jako wektora dla komórek grzybów (na które ampicylina nie działa), należy zastosować inny selekcyjny marker (na przykład gen *amdS* umożliwiający grzybom wykorzystywanie acetamidu). Bakteryjne wektory ekspresyjne mogą być tworzone z myślą o integracji z genomem gospodarza bądź ich autonomicznej replikacji w organizmie docelowym. W przypadku, gdy organizmem gospodarza jest komórka grzybowa, wektory tworzone są najczęściej z przeznaczeniem integracji z genomem gospodarza, przy czym najczęściej dochodzi do integracji całej konstrukcji genowej. Alternatywnie scaleniu mogą ulec fragmenty wektora pocięte enzymem restrykcyjnym.

W ostatnich latach rozwinięto techniki umożliwiające integrację konstrukcji genowych w określonych miejscach w obrębie genomu gospodarza. Elementem niezbędnym do konstrukcji tego typu ekspresyjnego wektora są sekwencje homologiczne do miejsc docelowych w DNA komórki gospodarza. W zależności od sposobu działania, kasetka ekspresyjna może zastąpić odcinek docelowy w genomie lub usytuować się w jego pobliżu. Takich miejsc na genomie gospodarza może być wiele. Przykładem integracji w wielu odcinkach jednocześnie jest konstrukcja szczepu *B. licheniformis* kodującego termostabilną  $\alpha$ -amylazę. W tym przypadku do genomu gospodarza zostały wprowadzone za pomocą wektora trzy kopie genów kodujących ten enzym w otoczeniu fragmentów homologicznych do odpowiednich fragmentów DNA docelowego. Kopie te uległy przyłączeniu do odpowiednich loci: genu *amyl* (kodującego  $\alpha$ -amylazę), *xyl* (odpowiedzialnego za produkcję izomerazy ksylozowej) i *gnt* (permeaza glukonowa) [Olempska-Beer i in., 2006].

### 6.3. Kasetka ekspresyjna

Elementem genetycznym stanowiącym nieodłączną część każdego konstruktów, który chcemy wprowadzić do modyfikowanej komórki mającej wytwarzać pożądane przez nas enzymy, jest kasetka ekspresyjna. Składa się ona z genu kodującego białko oraz sekwencji regulatorowych: promotora i terminatora. Sekwencje te powinny być zależne od gatunku mikroorganizmu, w którym dany gen będzie ulegać ekspresji. Przykładowo

chcąc produkować egzogenne enzymy w komórkach z rodzaju *Bacillus*, promotor i terminator kontrolujące ten gen również powinny pochodzić z tego rodzaju bakterii [Olempska-Beer i in., 2006].

W celu zapewnienia jak najwydajniejszej produkcji pożądanego enzymu, bardzo istotnym problemem jest dobór promotora zapewniającego wydajną ekspresję. U bakterii z rodzaju *Bacillus* przykładami takich silnych promotorów jest promotor genu *amyL* (kodujący  $\alpha$ -amylazę u *B.licheniformis*) oraz *amyM* (glukoamylaza u *B.stearothermophilus*). Z kolei obce geny ulegające ekspresji w *A. oryzae* znajdują się pod kontrolą promotora genu kodującego TAKA-amylazę także w *A. oryzae*. Sekwencje promotorowe można wykorzystywać nie tylko w postaci natywnej. W celu zwiększenia ich wydajności stosuje się takie procesy jak mutagenizacja czy fuzja sekwencji dwóch różnych promotorów. Przykładem takiej hybrydy jest promotor *Pna2/TPA*. Jest to sekwencja promotorowa genu amylazy II z *A. niger*, w którym nie ulegająca translacji część od końca 5' jest zastąpiona fragmentem promotora izomerazy triozofosforanowej z *A. nidulans*. Czasami stosuje się także promotory, które ulegają indukcji po dodaniu określonej substancji. Rozwiązanie takie znalazło zastosowanie w produkcji termostabilnej  $\alpha$ -amylazy u *Pseudomonas fluorescens*. Produkcję tego enzymu rozpoczyna się w momencie odpowiednio dużej gęstości komórek w bioreaktorze, dodając induktor - analog laktozy izopropylotio- $\beta$ -D-galaktopiranozyd [Olempska-Beer i in., 2006].

## 7. Podsumowanie

Enzymy są używane w produkcji żywności od tysięcy lat. Proces ich pozyskiwania ze źródeł naturalnych sięga końca XIX wieku. Znaczny postęp genetyki molekularnej i biologii komórki zmieniły sposób produkcji enzymów. Możliwe stało się klonowanie genów kodujących białka enzymatyczne i dokonywanie ich ekspresji w mikroorganizmach bardzo dobrze przystosowanych do przemysłowej fermentacji w wielkiej skali. Proces ten ulega stałym ulepszeniom poprzez użycie wydajnych promotorów i wprowadzenie genu kodującego dane białko w wielu kopiach. Udało się także zaadaptować wytwarzane enzymy do warunków wymaganych w niektórych gałęziach przemysłu spożywczego, jak temperatura czy pH. Osiągnięto ten cel dzięki inżynierii białkowej, pozwalającej m.in. na zmianę struktury pierwszorzędowej białek.

Dobrym przykładem jest  $\alpha$ -amylaza, która dzięki modyfikacjom struktury uzyskała zwiększoną termostabilność, aby dostosować ją do warunków panujących w czasie hydrolizy skrobi z surowców roślinnych [Olempska-Beer i in., 2006].

Określanie bezpieczeństwa szczepów drobnoustrojów produkujących enzymy ciągle stanowi centrum uwagi. W związku z tym powstał pomysł wprowadzania do produkcji preparatów enzymatycznych bezpiecznych szczepów z rodowodem, do których stworzenia użyto dobrze znane, niepatogenne i niewytwarzające toksyn szczepy (zwłaszcza te z historią bezpiecznego stosowania w produkcji żywności). Przemysłowe szczepy mikroorganizmów będące niegdyś źródłem enzymów natywnych, są obecnie gospodarzami dla enzymów heterogennych. Obecne strategie polepszenia szczepów poprawiają ich bezpieczeństwo i wydajność. Ten trend będzie bez wątpienia kontynuowany wraz z poszerzaniem wiedzy o genetyce drobnoustrojów oraz rozwojem technik inżynierii genetycznej [Olempska-Beer i in., 2006].

## 8. Literatura

Akoh C. C., Min D. B. 2008. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Taylor & Francis Group, LLC.

van den Berg, J.A., van der Laken, K.J., van Ooyen, A.J.J., Renniers, T.C.H.M., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schultz, K., Moyer, D., Richman, M., Shuster, J.R., 1990. *Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin*. Bio/Technology 8, 135–139.

Blattner F. R., Plunkett III G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. 1997. *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science 277, 1453–1462.

Gaynor, P. 2006. *How U.S. FDA's GRAS notification program works*. Food Safety Magazine 11, 16–19.

Demain A. L., Adrio J. L. 2007. *Contributions of Microorganisms to Industrial Biology*. Molecular Biotechnology 38, 41-55.

Domań-Pytka M., Bardowski J. 2004. *Pullulan degrading enzymes of bacterial origin*. Critical Reviews in Microbiology, 30(2), s.107-21.

Enikő T., Viviána N., Katalin R., György S., László P. 2007. *Production and Application of Novel Sterol Esterases from Aspergillus Strains by Solid State Fermentation*. Journal of the American Oil Chemists' Society, t. 84, nr 10, s. 907-915.

- Grajek W., Schmidt M., 2006. *Mikroorganizmy w nowoczesnej biotechnologii żywności*. Mikroorganizmy w żywności i żywieniu, wyd. Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, s. 103-116.
- JECFA, 2006. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing. [http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/docs/enzymes\\_en.htm](http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/docs/enzymes_en.htm)
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T., Kubicek, C.P., 1996. *Molecular evidence that the asexual industrial fungus Trichoderma reesei is a clonal derivative of the ascomycete Hypocrea jecorina*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 7755–7760. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38820/pdf/pnas01519-0340.pdf>
- Kunst F., i in. 1997. *The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis*. Nature 390, s. 249–256.
- MacCabe A.P., Orejas M., Tamayo E. N., Villanueva A., Ramo'n D. 2005. *Improving extracellular production of food-use enzymes from Aspergillus nidulans*. Journal of Biotechnology 96, 43-54.
- Machida M., Yamada O., Gomi K. 2008. *Genomics of Aspergillus oryzae: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future*. DNA Research 15(4), 173–183. <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/cgi/content/full/15/4/173>.
- Nevalainen, H., Suominen, P., Taimisto, K. 1994. *On the safety of Trichoderma reesei*. Journal of Biotechnology 37, s. 193–200.
- Olempska-Beer Z. S., Merker R. I., Ditto M. D., DiNovi M. J., 2006. *Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 45, 144–158.
- Pandey A., Nigam P., Soccol CR., Soccol VT., Singh D., Mohan R., 2000. *Advances in microbial amylases*. Biotechnology and Applied Biochemistry 31, 135-52.
- Paredh S. R., 2004. *The GMO handbook: genetically modified animals, microbes, and plants in biotechnology*. Humana Press Inc.
- Paulsen, I.T. et al. 2005. *Complete genome sequence of the plant commensal Pseudomonas Fluorescence Pf-5*. Nature Biotechnology 23, 873–878.
- Penttilä, M., Limón, C., Nevalainen, H. 2004. *Molecular biology of Trichoderma and biotechnological applications*. W: Arora, D.K. (Ed.), Handbook of Fungal Biotechnology. Second edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Basel, New York, s. 413–427.
- Rastall R. A., Maitin V. 2002. *Genetic engineering: threat or opportunity for the dairy industry?*. International Journal of Dairy Technology 55, 161-165.
- Rey M.W., Ramaiya P., Nelson B.A., Brody-Karpin S.D., Zaretsky E.J., Tang M., Lopez de Leon A., Xiang H., Gusti V., Clausen I.G., Olsen P.B., Rasmussen M.D., Andersen J.T., Jørgensen P.L., Larsen T.S., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Galleron N., Ehrlich S.D., Berka R.M. 2004. *Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species*. Genome Biology 5, R77.1–R77.12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC545597/?tool=pubmed>
- Schuster E.,Dunn-Coleman N., Frisvad J. C., van Dijck P. W. M. 2002. *On the safety of Aspergillus niger – a review*. Applied Microbiology and Biotechnology 59, 426–435.

Sumantha A., Larroche C., Pandey A., 2006. *Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective*. Food Technology and Biotechnology 44 (2), 211–220.

Twardowski T., Michalska A. 2001. *KOD: Korzyści, oczekiwania, dylematy biotechnologii*. Agencja Edytor, Poznań.

Treichel H., Oliveira D., Mazutti M. A., Luccio M. and Oliveira J. V., 2009. *A Review on microbial lipases production*. Food and Bioprocess Technology. ISSN 1935-5130.

Wayne Hutkins R., 2006. *Microbiology and technology of fermented foods*. Blackwell Publishing, 152-154.