



## Ocena przydatności bakterii *Thermus ruber* jako źródła syntazy trehalozy

Izabela Sinkiewicz, Józef Synowiecki

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

### Suitability of *Thermus ruber* as a source of trehalose synthase

#### Summary

*Thermus ruber* is a producer of trehalose synthase, which catalyses the conversion of maltose into trehalose by intramolecular transglucosylation. The specific activity of cell-free extract of *Thermus ruber* cultivated on a media without saccharides was 0.016-0.028 U/mg protein and it increased up to 0.086 U/mg in the presence of 0.5% maltose in the culture broth. The maximum degree of maltose conversion of about 90% was achieved at 10% substrate concentration. The trehalose synthase does not catalyse formation of trehalose from maltotetraose, maltohexaose and other oligosaccharides. The optimal temperature for enzyme activity was 65°C. A maximum activity of the maltose transglucosylation was performed at pH 6.5. The highest yield of trehalose synthase was attained during cultivation of bacteria at 55°C for 48 h on media composed of 0.5% peptone, 0.1% yeast extract and 0.5% maltose or starch.

#### Key words:

trehalose synthase, *Thermus ruber*, maltose, trehalose, intramolecular transglucosylation.

#### 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

## 1. Wstęp

Rozwój biotechnologii umożliwił uzyskanie wielu produktów użytecznych w medycynie, farmacji, kosmetyce i produkcji żywności. Jednym z nich jest trehaloza ( $\alpha$ -D-glukopiranozylo-1,1- $\alpha$ -glukopiranozyd), nieredukujący disacharyd zbudowany z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,1-glikozydowym (1,2). Cukier ten tworzy wiązania wodorowe z lipidami błon biologicznych i białkami, stabilizując ich strukturę podczas zamrażania,

suszenia lub ogrzewania (3,4). Asocjację trehalozy ułatwia brak występującego w cząsteczkach innych cukrów wiązania wodorowego pomiędzy tlenem pierścienia glikozydowego a grupą hydroksylową sąsiedniej jednostki strukturalnej, możliwe są zatem zmiany położenia reszt glukozy względem wiązania glikozydowego, ułatwiające dopasowanie kształtu cząsteczek trehalozy do struktury makrocząsteczek z którymi tworzą kompleks (2). Znajdująca się w tych kompleksach trehaloza współdziała z dipolami wody w warstwie hydratacyjnej, wzmacniając jej oddziaływanie pogarszające się podczas odwadniania lub zamrażania. Inną przyczyną oddziaływania stabilizującego jest zdolność roztworów trehalozy do tworzenia po odwodnieniu bezpostaciowego szkliwa pułapkującego makrocząsteczki bez zmian ich struktury, niszczonej wskutek krystalizacji w przypadku stosowania innych cukrów (5,6). Właściwości te są przyczyną licznych zastosowań trehalozy w biotechnologii, medycynie i przemyśle spożywczym. Cukier ten jest wykorzystywany m.in. jako stabilizator szczepionek, enzymów, przeciwciał oraz organów przeznaczonych do transplantacji (3). Zaletą trehalozy jako dodatku do żywności jest jej niewielka słodkość i odporność na hydrolizę w kwaśnym środowisku (6). Zastąpienie sacharozy trehalozą zapobiega reakcjom Maillarda pomiędzy cząsteczkami aldoz i białek lub aminokwasów. Sacharoza jest wprawdzie podobnie jak i trehaloza cukrem nieredukującym, ale jest mniej odporna na oddziaływanie kwaśnego środowiska i podwyższonej temperatury. Wytworzone wskutek hydrolizy sacharozy, glukoza i fruktoza, mają silne właściwości redukujące i reagują z grupami aminowymi białek. Ze względu na dużą przydatność trehalozy, konieczne jest opracowanie prostych i niekosztownych sposobów jej otrzymywania, wydajniejszych od stosowanej zazwyczaj ekstrakcji wymienionego cukru z poddanych stresowi termicznemu komórek drożdży, lub innych mikroorganizmów. Trehalozę ekstrahuje się wodnym roztworem etanolu lub kwasu trichlorooctowego, a następnie odbiałcza uzyskany ekstrakt (7).

Szlaki metaboliczne biosyntezy trehalozy są zróżnicowane w zależności od rodzaju drobnoustroju (8). W komórkach drożdży, grzybów i niektórych bakterii, biosyntezę trehalozy rozpoczyna przyłączenie glukozy uwolnionej z urydyno-difosfoglukozy do glukozo-6-fosforanu. Produktem następnej reakcji katalizowanej przez syntazę trehalozo-6-fosforanu (EC 2.4.1.15) jest urydynodifosforan i trehalozo-6-fosforan, przekształcany następnie w trehalozę i fosforan (9).

Drugi szlak syntezy trehalozy, wykorzystywany przez *Sulfolobus shibatae*, *Sulfolobus solfataricus*, *Rhizobium* i *Brevibacterium*, polega na jej wytwarzaniu z maltooligosacharydów (10). Tę drogę biosyntezy trehalozy katalizuje: syntaza maltooligotrehalozy i trehalozydaza. Pierwszy enzym izomeryzuje znajdujące się w końcowej części cząsteczki oligosacharydu wiązanie  $\alpha$ -1,4- na  $\alpha$ -1,1-glikozydowe. Wytworzony produkt rozpada się następnie pod wpływem trehalozydazy na trehalozę i cząsteczkę maltooligosacharydu pomniejszoną o dwie reszty glukozyłowe i cykl ten powtarza się aż do niemal zupełnego przekształcenia oligosacharydu w trehalozę (11).

Niektóre bakterie rodzaju *Thermus* i *Pimelobacter* sp. uzyskują trehalozę poprzez transglikozylację maltozy katalizowaną przez syntazę trehalozy ( $\alpha$ -D-glukozylotrans-



ferazę maltozy) (12,13). Ta właśnie  $\alpha$ -D-glukozylotransferaza (EC 5.4.99.16) jest najlepszym biokatalizatorem w przemysłowej produkcji trehalozy, ze względu na możliwość jej wydajnego wytwarzania z łatwo dostępnych syropów maltozowych, np. w reaktorze przepływowym z immobilizowanym enzymem. W tym artykule przedstawiono ocenę przydatności mało dotychczas zbadanej termofilnej bakterii *Thermus ruber* jako źródła syntazy trehalozy.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Szczep i hodowla mikroorganizmu

Szczep *Thermus ruber* (DSM 1279) przygotowano zgodnie z zaleceniami Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen, zawieszając liofilizowane komórki bakterii w 1 ml podłoża peptonowego z wyciągiem drożdżowym, zawierającego: 0,5% peptonu, 0,1% wyciągu drożdżowego oraz wodę. Tak przygotowaną zawiesinę przenoszono następnie do 5 ml podłoża o takim samym składzie i inkubowano przez 3-5 dni w temperaturze 55°C. Do niektórych hodowli stosowano wymienione podłoże wzbogacone 0,5% dodatkiem skrobi lub innych węglowodanów. Porcje podłoża (pH 8,0) o objętości 1000 ml sterylizowano w kolbach Erlenmayera o pojemności 2000 ml w temp. 121°C przez 30 min i zaszczepiano. Hodowlę drobnoustroju prowadzono przez 24 lub 48 godz., bez dodatkowego napowietrzania w termostatowanej wytrząsarce typu ECOTRON w temperaturze 50, 55 lub 60°C, z szybkością wstrząsania 160 obrotów/min. Biomasę komórek odwirowywano przez 15 min (9000×g), zamrażano i przechowywano w temp. -18°C przez okres nie przekraczający 3 dni.

### 2.2. Ekstrakcja białek komórkowych

Do 10 g zamrożonej biomasy dodawano 20 g Aluminy A-5 (Sigma, St. Louis, MO, USA) i rozcierano przez 15 min w moździerzu (4°C) wprowadzając stopniowo 70 ml 0,01 M buforu fosforanowo-cytrynianowego (pH 6,5) zawierającego 1  $\mu$ M ditiotretolu. Otrzymaną zawiesinę wirowano przez 15 min (9000×g) i w uzyskanym supernatancie oznaczano zawartość białka metodą Bradford (14) oraz aktywność syntazy trehalozy.



### 2.3. Oznaczanie aktywności syntazy trehalozy

Aktywność syntazy trehalozy oznaczano dodając 5 ml ekstraktu białek komórkowych *Thermus ruber* do 10 ml 30 mM roztworu maltozy w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 6,5) i prowadzono reakcję w różnych temperaturach, w zakresie od 50 do 85°C. Po upływie odpowiedniego czasu, reakcję zatrzymywano przez oziębnienie próbki w wodzie z lodem. Podczas oznaczeń aktywności enzymu w zależności od odczynu środowiska reakcji, stosowano 0,1 M bufor cytrynianowo-fosforanowy w zakresie pH od 5,0 do 8,0. Wymianę buforu przeprowadzano stosując dializę przez błonę VISKING (ang. *dialysis tubing* 27/32) o zdolności rozdzielczej 12-19 kDa (Serva Feinbiochemica, Niemcy). Zawartość produktów konwersji maltozy określano stosując zestaw HPLC z kolumną APS-2 Hypersil (Thermo Electron Corporation) i detektorem refraktometrycznym (La Chrom L-7490, Merck). Przed naniesieniem na kolumnę, próbki oczyszczano przez termiczne strącenie białek (110°C), adsorpcję pozostałości na węglu aktywnym i filtrację przez 0,2 µm Puradisc™ filter (Whatman). Chromatogram rozwijano w temperaturze 25°C stosując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitryl/woda (3:1, v/v) przepływającą z szybkością 0,6 ml/min. Jako wzorce stosowano roztwory: maltozy, trehalozy i glukozy o stężeniach 10 mg/ml. Jednostką aktywności syntazy trehalozy jest taka ilość enzymu, która w optymalnych warunkach reakcji katalizuje wytwarzanie 1 µmola trehalozy/min.

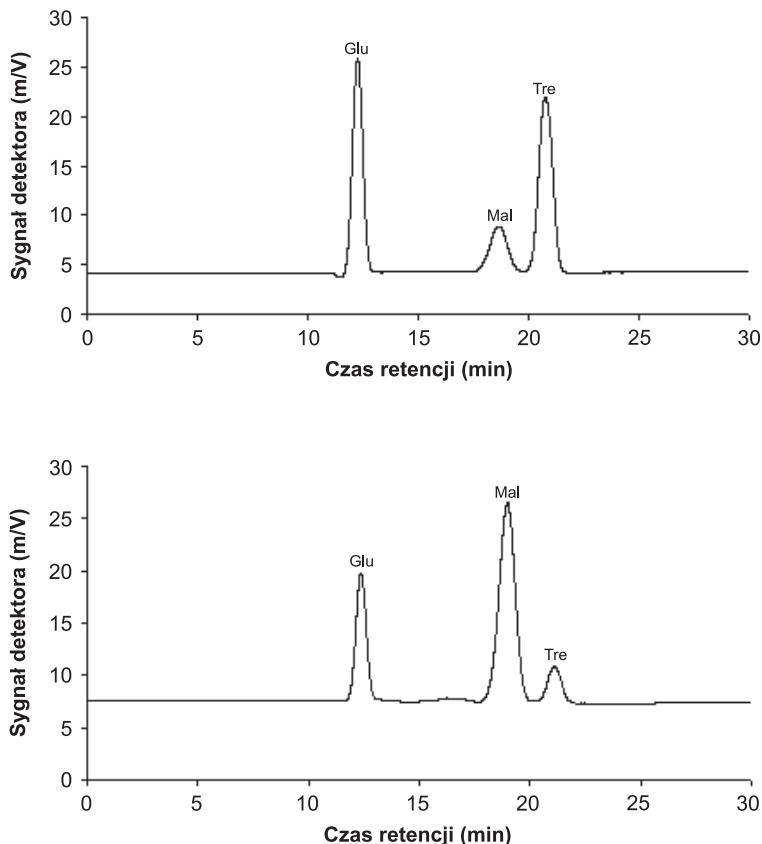
### 2.4. Oznaczanie termostabilności

Termostabilność syntazy trehalozy oznaczano porównując aktywności roztworów enzymu w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 6,0 lub 7,0 inkubowanych temperaturach zmienianych w zakresie od 40 do 80°C przez 1 godz., z aktywnością nie ogrzewanych prób kontrolnych. Aktywność syntazy trehalozy w próbach badanych i kontrolnych oznaczano jak opisano w rozdziale 2.3, w temperaturze 65°C w pH 6,5.

## 3. Omówienie wyników

W wyniku identyfikacji produktów konwersji maltozy katalizowanej ekstraktem białek komórkowych *Thermus ruber* przeprowadzonej metodą HPLC wykazano wytwarzanie trehalozy i glukozy (rys. 1). Nie stwierdzono natomiast tworzenia trehalozy w przypadku, gdy jako substrat reakcji stosowano maltotetraozę, maltoheksaozę lub skrobię. Z badań innych autorów wynika, że cukry te są przekształcane na trehalozę przez enzymy występujące w komórkach *Sulfolobus shibatae*, *Arthrobacter* sp. i kilku innych mikroorganizmów (15). Świadczy to o występowaniu w komórkach *Thermus ruber* syntazy trehalozy (EC 5.4.99.16), katalizującej wytwarzanie trehalozy





Rys. 1. Chromatogram (HPLC) produktów (glukoza-Glu, trehaloza-Tre) uzyskanych po 15 min (A) oraz 120 min (B) konwersji maltozy (Mal) katalizowanej białkami komórkowymi *Thermus ruber* w temp. 65°C w pH 6,5.

poprzez izomeryzację występującego w maltozie wiązania  $\alpha$ -1,4- do  $\alpha$ -1,1-glikozydowego, bo syntaza trehalozy nie wykazuje aktywności enzymatycznej w obecności takich substratów jak maltotetraoza i inne oligosacharydy oraz amyloza i amylopektyna (13). Reakcja izomeryzacji jest odwracalna i przy nadmiernym stężeniu trehalozy może prowadzić do spadku wydajności procesu wskutek odtwarzania maltozy. Produktem ubocznym tych reakcji jest zawsze pewna ilość glukozy (16).

Ogólna aktywność syntazy trehalozy przypadająca na litr hodowli zależy od wydajności biomasy i od ilości enzymu we frakcji białek komórkowych. Największą ilość mokrej biomasy (5,95 g/l podłoża) uzyskiwano po 48 godz. hodowli w temperaturze 55°C. Skutkiem podwyższenia temperatury hodowli bakterii do 60 lub 65°C było zmniejszenie biomasy komórek do 3,75 g/l oraz 2,78 g/l płynu pohodowlanego. Po przekroczeniu optymalnej temperatury wzrostu bakterii następowało też dość znaczne obniżenie wydajności syntazy trehalozy uzyskiwanej z jednego litra podłoża

(tab. 1). Główną tego przyczyną jest zmniejszenie ilości biomasy, na co wskazują niewielkie (w granicach 0,016-0,028 U/mg białka) zmiany aktywności specyficznej badanych ekstraktów, wskazujące na podobną zawartość syntazy trehalozy we frakcji białek komórkowych *Thermus ruber*. Wzbogacenie podłoża peptonowego z wyciągiem drożdżowym, 0,5% dodatkiem sacharozy, trehalozy lub skrobi zwiększało wydajność syntazy trehalozy uzyskiwanej z jednego litra hodowli odpowiednio o 64, 161 oraz 269,8% wartości uzyskiwanej bez udziału tych cukrów (tab. 2). Największy, około 3,9-krotny wzrost wydajności powodowała maltoza. Wyniki przedstawione w tabeli 2 wskazują, że dominujące znaczenie ma wzrost zawartości syntazy trehalozy w puli białek komórkowych. Pod wpływem cukrów dodanych do podłoża następuje wprawdzie zwiększenie ilości biomasy, ale nie jest ono tak duże jak przyrost specyficznej aktywności syntazy trehalozy w wyekstrahowanych białkach.

Tabela 1

Zależność wydajności syntazy trehalozy (U/l podłoża) od temperatury i czasu hodowli *Thermus ruber* na podłożu peptonowym zawierającym wyciąg drożdżowy

Temperatura (°C)	Aktywność ogólna (U/l podłoża) po czasie:	
	24 godz.	48 godz.
50	1,34 ± 0,11	1,75 ± 0,14
55	2,95 ± 0,20	3,59 ± 0,09
60	3,10 ± 0,10	1,38 ± 0,05
65	1,28 ± 0,06	0,99 ± 0,08

Wyniki są średnią z 3 odrębnych hodowli ± odchylenie standardowe.

Tabela 2

Wpływ węglowodanów dodanych do podłoża peptonowego zawierającego wyciąg drożdżowy na wydajność biomasy *Thermus ruber* i aktywność specyficzną syntazy trehalozy w ekstrakcie białkowym

Rodzaj węglowodanu	Aktywność specyficzna (U/mg białek)	Aktywność względna (%)	Względny wzrost wydajności (%):	
			enzymu (U/l podłoża)	biomasy (g/l podłoża)
próba kontrolna	0,022 ± 0,006	100,0	100,0	100,0
maltoza	0,086 ± 0,002	390,9	391,4	115,7
trehaloza	0,053 ± 0,004	240,8	261,0	126,3
skrobia	0,064 ± 0,002	290,9	369,8	134,5
sacharoza	0,028 ± 0,007	127,2	164,0	124,6

Prezentowane wyniki są średnią z trzech oznaczeń ± odchylenie standardowe. Wydajność biomasy bakterii w próbie kontrolnej bez 0,5 % dodatku węglowodanów wynosiła 5,95 g/l podłoża.



Płyn pohodowlany zagęszczony przez ultrafiltrację nie wykazywał aktywności konwersji maltozy, co wskazuje, że syntaza trehalozy jest enzymem wewnątrzkomórkowym. Aktywności enzymu nie stwierdzono też we frakcji białek uwolnionych z przestrzeni peryplazmatycznej pod wpływem 8% roztworu lizozymu w 0,4 M buforze maleinowym o pH 6,0.

Syntaza trehalozy z *Thermus ruber* ma najwyższą aktywność w temperaturze 65°C, podobnie jak analogiczne enzymy z *Thermus aquaticus* (65°C) oraz *Thermus thermophilus* (65°C) (12,17). Niższa jest natomiast optymalna temperatura działania (20°C) syntazy trehalozy z *Pimelobacter* sp. R48 (13). Połowiczny zanik aktywności enzymu z *Thermus ruber* następował po 60 min ogrzewania w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o temp. 65°C. Podwyższenie temperatury inkubacji do 70°C powodowało prawie zupełną inaktywację preparatu (tab. 3). W celu ograniczenia cieplnej inaktywacji biokatalizatora podczas długotrwałego procesu wskazane jest zatem obniżenie temperatury reakcji do około 60°C, przy której enzym zachowuje, po 1 godz. ogrzewania, około 80% początkowej aktywności. Zmiana pH buforu w zakresie od 6,0 do 7,0 nie wpływała w istotnym stopniu na termostabilność enzymu. Syntaza trehalozy z *Thermus ruber* nie różni się pod względem optymalnej kwasowości środowiska reakcji od analogicznego enzymu z *Thermus aquaticus* (12) i osiąga maksymalną aktywność przy pH 6,5. Wyższe jest natomiast optymalne pH działania syntazy trehalozy z *Pimelobacter* sp. R48 (13), równe 7,5.

Tabela 3

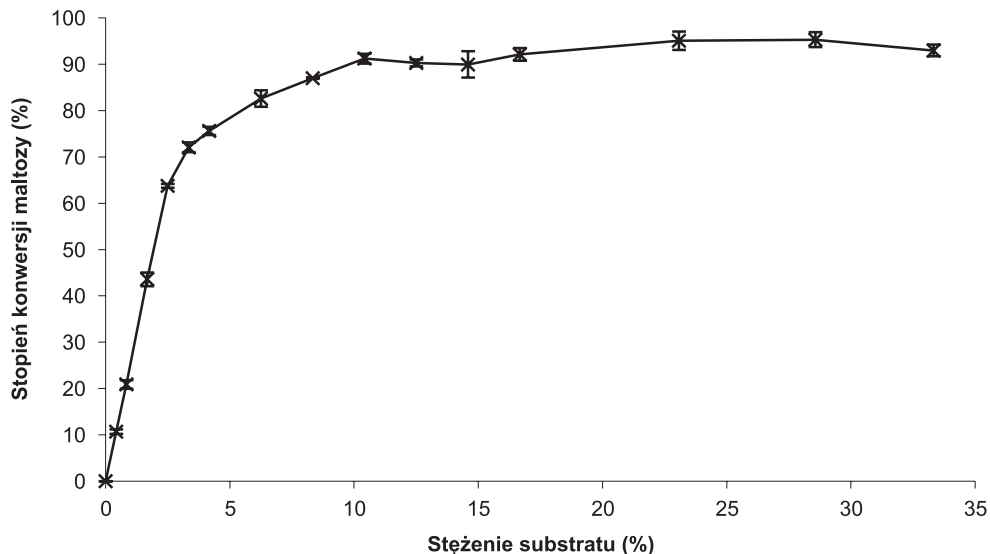
**Zmiany aktywności syntazy trehalozy we frakcji białek *Thermus ruber* ogrzewanych przez 1 godz. w 0,1 M buforach fosforanowo-cytrynianowych o pH 6,0 lub 7,0**

pH	Aktywność względna (%) po inkubacji w temperaturze (°C)						
	40	45	50	55	60	65	70
6,0	100	98,6 ± 1,6	95,6 ± 1,3	88,8 ± 1,7	79,7 ± 1,5	37,8 ± 1,1	0,0
7,0	100	97,5 ± 2,5	92,4 ± 1,3	86,2 ± 1,6	75,7 ± 1,3	52,9 ± 1,4	0,0

Przedstawione wyniki są średnią z 4 oznaczeń ± odchylenie standardowe.

Maksymalny, prawie 90% stopień konwersji uzyskiwano przy 10% stężeniu maltozy po około 2 godz. reakcji w temperaturze 60°C przy pH 6,5 (rys. 2). Dalsze zwiększanie stężenia substratu nie powodowało już wzrostu wydajności reakcji przypuszczalnie z powodu odtwarzania maltozy w reakcji odwrotnej, nasilającej się wskutek nagromadzenia trehalozy.





Rys. 2. Zależność stopnia konwersji maltozy od jej stężenia w środowisku. Reakcja była katalizowana przez 2 godz. inkubację roztworu maltozy z ekstraktem białek komórkowych *Thermus ruber* w temp. 60°C, pH 6,5.

#### 4. Podsumowanie

Termofilna bakteria *Thermus ruber* może być wykorzystana jako źródło enzymu katalizującego wytwarzanie trehalozy na drodze izomeryzacji występującego w maltozie wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego. Zdolność katalizowania transglikozylacji z wytworzeniem wiązania  $\alpha$ -1,1-glikozydowego ma również syntaza maltooligotrehalozy występująca np. w komórkach *Sulfolobus shibatae*. Wymienione enzymy różnią się jednak specyficznością substratową. Syntaza maltooligotrehalozy nie działa na maltozę, izomeryzując jedynie końcowe wiązanie  $\alpha$ -1,4-glikozydowe w cząsteczkach maltooligosacharydów, do oddzielenia reszt glukozylowych połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,1-glikozydowym niezbędne jest zatem współdziałanie odrębnego enzymu. W przeciwieństwie do syntazy maltooligotrehalozy, syntaza trehalozy (EC 5.4.99.16) nie powoduje konwersji maltooligosacharydów, wytwarzając trehalozę w jednoetapowej reakcji transglikozylacji maltozy. Możliwość produkcji wymienionego disacharydu w reakcji katalizowanej tylko jednym enzymem ma duże znaczenie dla przemysłu ze względu na znaczne uproszczenie procesu.

Maksymalny stopień konwersji substratu przy udziale syntazy trehalozy z *Thermus ruber* wynosi około 90% i jest o 10% większy niż w przypadku stosowania analogicznego enzymu z *Pimelobacter* sp. R48 (13). Wskazuje to na większe przesunięcie równowagi reakcji w kierunku wytwarzania trehalozy, spowodowane podwyższeniem temperatury procesu do około 60°C. Wzrost stopnia konwersji substratu w przypad-





ku stosowania enzymów o wyższej termostabilności stwierdzono także w przypadku innych izomeraz nie ulegających zbyt szybko inaktywacji w podwyższonej temperaturze (18). Enzym z *Thermus ruber*, podobnie jak inne dotychczas zbadane syntazy trehalozy, wykazuje niewielką aktywność hydrolityczną, czego skutkiem jest zanieczyszczenie produktu pewną ilością glukozy. Pomimo to syntaza trehalozy jest najlepszym enzymem do wytwarzania trehalozy, m.in. ze względu na dostępność maltozy, którą można łatwo uzyskać ze skrobi. O przydatności *Thermus ruber* jako źródła enzymu katalizującego wytwarzanie trehalozy decyduje też stosunkowo wydajna hodowla bakterii przebiegająca w warunkach tlenowych. Zaletą są ponadto niskie wymagania pokarmowe tego drobnoustroju, umożliwiające jego rozwój w nieskomplikowanych podłożach bez wytwarzania szkodliwych metabolitów. Podwyższona temperatura hodowli *Thermus ruber* zapobiega zanieczyszczeniu hodowli niepożądanymi mikroorganizmami (19).

## Literatura

1. Wolska-Mitaszko B., (2001), *Biotechnologia*, 2, 36-53.
2. Richards A. B., Krakowka S., Dexter L. B., Schmid H., Wolterbeek A. P. M., Waalkens-Berendsen D. H., Arai S., Kurimoto M., (2002), *Food Chem. Toxicol.*, 40, 871-898.
3. Crove J. H., Crove L. M., (2000), *Nature Biotechnol.*, 18, 145-147.
4. Schiraldi C., Di Lernia I., de Rosa M., (2002), *Trends Biotechnol.*, 20, 420-425.
5. Roser B., (1991), *Trends Food Sci. Technol.*, 2, 166-169.
6. Zdziebło A., Synowiecki J., (2005), *Medycyna Wet.*, 61(1), 31-34.
7. Yoshikawa Y., Matsumoto K., Nagata K., Sato T., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1226-1230.
8. Koen A. L., de Smet A., Weston A., Brown I. N., Young D. B., Robertson D. B., (2000), *Microbiology*, 146, 199-208.
9. Ma Y., Xue L., Sun D. W., (2006), *J. Food Eng.*, 77, 342-347.
10. Di Lernia I., Morana A., Ottombrino A., Fusco S., Rossi M., de Rosa M., (1998), *Extremophiles*, 2, 409-416.
11. Seto A., Yoshijima H., Toyomasu K., Ogawa H. O., Kakuta H., Hosono K., Ueda K., Beppu T., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 794-799.
12. Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 835-839.
13. Nishimoto T., Nakano M., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 640-644.
14. Bradford M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
15. Kato M., Miura Y., Kettoku M., Shindo K., Iwamatsu A., Koabyashi K., (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 263-266.
16. Koh S., Shin H. J., Kim J. S., Lee D. S., Lee S. Y., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 757-761.
17. Zdziebło A., Synowiecki J., (2006), *Food Chem.*, 96, 8-13.
18. Kim P., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 243-249.
19. Spanevello M. D., Patel B. K. C., (2004), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 50, 63-73.