

Mucor miehei'den Rennet Üretiminde Bazı Azotlu Katkı Maddelerinin Enzim Üretimine Etkisi Üzerinde Bir Araştırma

Dr. Sedat DÖNMEZ — Dr. Filiz ÖZÇELİK

A.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü, ANKARA

ÖZET

Peynir yapımında kullanılan ve değişik kaynaklardan elde edilebilen proteazların son yıllarda mikrobiyel yolla üretimi önem kazanmıştır. Bu çalışmada *Mucor miehei*'den rennet üretiminde, üretime etkili bazı faktörler, özellikle bazı azotlu katkı maddelerinin besiyerine ilavesinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Katkı maddesi olarak kullanılan malt ve soya unları ile peynir altı suyu tozunun besiyerine belirli oranlarda ilavesinin enzim aktivitesini artırdığı gözlenmiştir.

Vakum altında kurutulup toz hale getirilmiş enzimlerin, ticari enzim preparatlarına eşdeğer aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

1. GİRİŞ

Gıda sanayiinin bütün dallarında çeşitli enzimler kullanılmaktadır. Pektolitik enzimler en başta gelmekte bunu amilazlar, glukoz oksidaz ve proteazlar izlemekte, az miktarda ise naringinaz ve limoninaz kullanılmaktadır (Rombout and Wilnik, 1978). Kullanılma alanları giderek artmakta, değişik hammaddelerden yeni gıdalar eldesi ve esas olarak gıda maddesi elde edilmesi sırasında uygulanan işlemlerin hızlandırılması bunda esas amaç olmaktadır.

Proteazlar gıda sanayiinde özellikle peynir üretiminde, peynirlere özel aroma ve tad verilmesinde esas faktör olarak rol oynamaktadır. Çeşitli kaynaklardan elde edilebilen proteazların yıllık üretiminin saf enzim proteini olarak 500 ton dolaylarında olduğu tahmin edilmekte ve bu miktarın dünyadaki yıllık enzim tüketiminin % 44'ü olduğu bildirilmektedir (Wingard et. al., 1979). Bu miktarın % 5'i de süt ve ürünleri sanayiinde kullanılmaktadır.

Ülkemizde üretilen sütün yaklaşık % 20'si peynire işlenmekte, yaklaşık 2 milyon ton olan bu miktarın peynire dönüştürülmesi için çeşitli kaynaklardan elde edilen ve değişik isimler altında pazarlanan «Peynir Mayaları» kullanılmaktadır. Türkiyede hayvansal kaynaklardan

elde edilen peynir mayasının 200 ton olduğu sanılmakta, ülke tüketimine yetmeyen üretim açığı ise dış alım yoluyla sağlanmaktadır, (Topal, 1985). Bu durum büyük oranda döviz kaybına neden olduğu gibi erken kesimlerden dolayı canlı hayvan ve et kaybına da neden olmaktadır.

Son yıllarda mikrobiyel proteazların peynir yapımında kullanılması yoğunlaşmış, 100 milyon dolarlık bir pazara sahip rennet üretiminde, verimli ve uygun özellikte mikroorganizmanın elde edilmesi için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Anonymus, 1985). Bu alanda kullanılan *Mucor miehei* süt pıhtılaştırma aktivitesi yüksek, spesifik olmayan proteaz aktivitesi düşük rennet üretmesi nedeniyle dikkatleri çekmiştir (Pintauro, 1979). Bu çalışmada peynir üretiminde kullanılacak peynir mayası rennet üreten *Mucor miehei*'nin proteaz üretimine etkili bazı faktörler, özellikle azotlu katkı maddelerinin enzim miktarı ve aktivitesine etkisi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyal

Araştırmada kullanılan *Mucor miehei* CBS 370 : 65 Centralbureau Voor Schimmelcultures'den sağlanmıştır. Besiyerinde kullanılan çeşitli kepekler A.Ü. Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan, malt ve arpa ise Tekel Ankara Bira Fabrikasından sağlanmıştır.

Süt ve peynir altı suyu tozu (Pınar) Ankara piyasasından sağlanmış, soya ve yer fıstığı küspesi laboratuvarlarda hazırlanmıştır. Yağsız soya ve yerfıstığı küspesi ise eter ekstraksiyonu ile elde edilmiştir.

Kıyaslama materyali olarak esas alınan ticari peynir mayaları piyasadan ve rennet Sigma (No. R. 5876) dan sağlanmıştır.

2.2. Yöntem

Araştırmada kullanılan küf mantarı *Mucor miehei*, Patato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde

rinde geliştirilmiş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Araştırmada PDA dışında aşılama materyali olarak kullanılan spor süspansiyonunun hazırlanacağı YSSPP besiyeri ile enzim üretimi için sıvı ve katı besiyerleri kullanılmıştır (U.S. Pat. 3.988.207).

Spor süspansiyonu olarak kullanılan YPPSS Agar Besiyeri bileşimi şöyledir: Bir litre damıtık su için 4 g. maya ekstraktı, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄.7H₂O, 12 g eriyebilir nişasta, 20 g agar.

Sıvı besi yerinin bileşimi bir litre besiyeri için; 40 g patates nişastası, 100 g arpa öğütüğü, 30 g soya unu, 5 g CaCO₃ dir. Araştırmada çeşme ve damıtık su ayrı ayrı besiyerinde kullanılarak denenmiş, yağlı ve yağı alınmış soya unu ile de denemeler yapılmıştır. Araştırmanın aşamaları içerisinde yukarıda belirtilen sıvı besiyeri içerisindeki % 10 arpa unu yerine değişik oranlarda malt unu kullanılmıştır. Katkı olarak kullanılan malt enzimlerinin etkisini sağlamak için 70°C ve 45 dakika su banyosunda tutulmuştur.

Besiyerlerinin pH'ları N/4'lük NaOH ve HCl ile ayarlanmıştır. Katı besiyeri olarak buğday veya pirinç kepeği, çeşme suyu ile (1/1) oranında karıştırılmıştır. Değişik oranlardaki katkı maddeleri bu esas besiyerine ilave edilmiştir.

2.2.1. Aşılama ve İnkübasyon :

Besiyerleri 121°C'de 20 dakika sterilize edildikten sonra YPPSS - Agar'da geliştirilmiş kültürlerden, steril fizyolojik su ile hazırlanmış ve 20 x 10⁶ adet/ml spor içeren süspansiyonla % 10 oranında aşılanmıştır.

İnkübasyon sıvı besiyerleri için 35°C de ve 150 rpm'de, katı besiyerleri için 40°C'de yapılmıştır.

2.2.2. Enzimin Ekstrakte Edilmesi :

Katı besiyerlerinde küf gelişmesi tamamlandıktan sonra 200 ml damıtık su ile belirli (1 saat ve 24 saat) ekstrakte edilmiş ve enzim sıvısı katı kısımdan santrifüjle ayrıldıktan sonra proteaz ve süt pıhtılaştırma aktiviteleri

saptanmıştır. Sıvı besiyerleriyle çalışmada ise, inkübasyon sonunda santrifüjle katı kısımdan ayrılan enzim sıvısının özellikleri saptanmıştır.

Toz halde enzim elde edilmesinde ise, 50 ml enzim sıvısı 150 ml +4°C'ye soğutulmuş etil alkol ile yavaş yavaş karıştırılmış ve oluşan tortu 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek ayrılmış ve 40 - 43°C de vakum altında kurutulmuştur (Wang et al. 1979). Kuru enzimlerle yapılan testlerde, enzimin saf sudaki % 1 lik çözeltileri kullanılmıştır.

2.2.3. Froteaz Aktivitesinin Saptanması :

Enzim çözeltilerinin proteaz aktiviteleri «Casein Digestion Method» ile 660 nm dalga boyunda Tyrosin standart olarak alınarak saptanmıştır (Keay and Wildi, 1970).

2.2.4 Süt Pıhtılaştırma Aktivitesinin Saptanması :

Enzim çözeltilerinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri 0.05 M CaCl₂ içerisinde hazırlanmış % 12 lik 5 ml yağsız sütte çözeltilerinde yapılmıştır (Khan et al., 1979, Somkuti and Babel, 1967).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Sıvı Besiyerlerinde Elde Edilen Sonuçlar :

Enzim üretimi için uygun pH'nın saptanması amacıyla 2 - 10 pH aralığında hazırlanan besiyerlerinde 5 günlük inkübasyon sonunda elde olunan proteaz ve süt pıhtılaştırma aktiviteleri Tablo 1'de görülmektedir. Tablodan anlaşılacağı gibi 6 - 8 pH'larda süt pıhtılaştırma aktivitesi en yüksek düzeyine erişmiştir. Denenen bütün pH'larda proteaz aktiviteleri düşük düzeylerde saptanmıştır. Bu koşullarda süt pıhtılaştırma aktiviteleri literatür bulgularının çok altında kalmıştır (Pintauro, 1979, U.S. Pat. 3.988.207, Somkuti and Babel, 1967). Düşük düzeylerde kalan proteaz aktivitesi istenen bir özellik olmasına karşın süt pıhtılaştırma aktivitesinin de düşük olması yüzünden pratik bir önemi olmayacaktır. Yine aynı tablodan anlaşılacağı gibi inkübasyon süresi sonunda bütün pH'larda (2 ve 3 pH dışında) nötral pH'ya doğru bir kayma olmuştur. Bu pH da süt pıhtılaştırma aktivitesi de nispeten yüksek olduğun-

dan bundan sonraki çalışmalarda besiyerlerinde 6-8 pH aralığı esas alınmıştır.

Tablo 1. Sıvı besiyerinde değişik pH'larda elde olunan enzim sıvısının süt pıhtılaştırma ve proteaz aktiviteleri

Başlangıç pH'sı	Proteaz (Tyrosin µg/ml)	Süt pıhtılaştırma (Soxhelet Unit - S. U.)	Gelişme sonrası pH
2	68.6	—	2.12
3	26.5	—	3.48
4	30.3	261	6.42
5	40.7	295	7.07
6	37.1	348	6.96
7	29.6	828	7.00
8	40.2	667	7.06
9	37.4	436	7.13
10	59.6	211	6.79

Sıvı besiyerinde kullanılan % 10 arpa unu yerine malt unu kullanılarak yapılan çalışmada, gelişmenin 3. gününden itibaren ölçülen enzim aktiviteleri Tablo 2'de görülmektedir. Besiyerinin pH'sını ayarlamadan aşılardan örneklerden birisine malt ilavesinden sonra ısı işlemi de uygulanmamıştır. Tablo 2'den anlaşılacağı gibi ısıtma işlemi uygulanmamış örnek-

lerde süt pıhtılaştırma aktivitesi inkübasyon süresi ile birlikte artmış ve 7. günde en yüksek değerine erişmiştir. Isıtma işlemi uygulanan örneklerde ise bu aktivite inkübasyonun 5. gününe kadar artmış ve daha sonra düşmeye başlamıştır. Bacillus ve Aeromonaslarla yapılan enzim üretim çalışmalarında da değişik dört besiyerinde gelişen bazı suşlarda proteaz aktivitesinin inkübasyonun 4. gününe kadar yükseldiği ve daha sonra düştüğü bildirilmiştir (Keay and Wildi, 1970, Keay et al., 1979). Buradan da anlaşılacağı gibi değişik besiyerlerinde maksimum enzim aktivitesine ulaşılan süre mikroorganizma ve besiyerine bağımlılık göstermektedir. Bu koşullarda maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi 8 pH'da elde edilmiş, ancak proteaz aktivitesinin inkübasyon süresi ile değişmemesi dikkati çekmiştir.

Besiyeri bileşiminde bulunan arpa unu yerine malt unu kullanıldığında enzim aktivitesini artırmak için ısı uygulanmıştır. Bu koşullarda en yüksek süt çöktürme aktivitesine 5. günde erişilmiş (327 S.U.), ısı uygulanmamış örneklerde ise 7. günde 263. S.U. değerine ulaşılmıştır. Yine tablo 2'de görüleceği gibi başlangıçta 6-8 arasında, 0.5 artırılarak ayarlanan pH'lar inkübasyon sonunda 6 civarında bulunmuştur.

Tablo 2. Değiştirilmiş sıvı besiyeri^a ile değişik pH'larda elde olunan enzim sıvısının süt pıhtılaştırma ve proteaz aktiviteleri.

Başlangıç pH'sı	(µg/ml Tyrosin) Proteaz Aktivitesi					Aktivitesi (S. U.) Süt Pıhtılaştırma					İnkübasyon Sonrası pH ^d
	İnkübasyon Süresi (Gün)					İnkübasyon Süresi (Gün)					
	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	
6.4 ^b	94.6	90.4	108.8	99.4	94.6	122	195	218	232	263	5.99
6.3 ^c	127.8	120.6	117.3	120.6	115.9	145	248	327	270	251	5.94
6.0	108.8	100.3	114.5	118.3	118.3	173	251	332	260	240	5.54
6.5	9.94	101.7	114.5	112.2	106.5	144	214	270	230	209	5.93
7.0	115.9	118.8	120.7	125.4	125.4	172	230	318	240	225	5.83
7.5	115.9	123.6	127.8	132.5	137.3	166	235	277	264	216	6.17
8.0	146.7	130.1	142.0	146.7	146.7	227	284	348	360	357	6.19

a. Besiyeri bileşimi : % 4 Nişasta, % 10 Malt unu, % 3 soya unu, % 0.5 CaCO₃

b. Isı uygulanmamış orijinal pH

c. Isı uygulanmış orijinal pH

d. 7 günlük inkübasyon sonrası pH

Sıvı besiyerleri ile yapılan diğer bir çalışmada, besiyerindeki % 10 arpa unu yerine % 8 arpa unu ve % 2 malt unu kullanılmış ve belli oranlardaki malt ununun etkisi araştırılmıştır. İnkübasyonun 3. gününden 8. gününe kadar saptanan değerler Tablo 3'de görülmektedir. Bu koşullarda süt pıhtılaştırma aktivitesi İnkübasyonun 6. gününde en yüksek değerine ulaşmasına karşın (600 S.U.) proteaz aktivitesi İnkübasyon süresiyle birlikte artma göstermiş, başlangıç pH'sı 7 olan örnekte 8. günde 164.7

µg/ml'e ulaşmıştır. Tablo 2 ve 3'ün birlikte incelenmesinden anlaşılacağı gibi, asıl besiyeri içerisindeki % 10 arpa unu yerine malt unu kullanarak ve sterilizasyon öncesi ısı uygulanarak daha kısa İnkübasyon süresinde daha yüksek pıhtılaştırma aktivitesi gösteren enzim eldesi olasıdır. Sıvı besiyerleri ile yapılan bütün çalışmalarda elde olunan değerler, literatür değerlerinin oldukça altında kalmıştır (Wingard, 1979, Pintauro, 1979, Khan et al. 1979).

Tablo 3. Değiştirilmiş sıvı besiyeri^a ile değişik pH'larda elde olunan süt pıhtılaştırma ve proteaz aktivitesi değerleri

Başlangıç pH'sı	Proteaz aktivitesi (µg/ml Tyrosin)					Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi (S.U.)				
	İnkübasyon Süresi (Gün)					İnkübasyon Süresi (Gün)				
	3	4	5	6	8	3	4	5	6	8
6.4 ^b	74.8	92.3	97.0	100.3	102.7	144	152	177	235	95
6.3 ^c	85.2	125.4	133.4	142.0	154.8	450	470	543	600	184
6.0	94.6	118.3	132.5	131.5	155.2	568	584	387	572	182
6.5	108.8	131.5	132.8	137.2	142.0	360	323	286	429	111
7.0	104.1	134.9	149.5	149.6	164.7	318	264	229	462	163
7.5	105.0	134.9	151.4	160.9	161.0	408	379	312	558	229
8.0	116.9	146.7	157.6	166.6	163.8	228	232	273	414	123

a) Besiyeri bileşimi : % 4 nişasta; % 8 arpa unu, % 2 malt unu, % 3 soya unu, % 0.5 CaCO₃

b) Isı uygulanmamış orijinal pH

c) Isı uygulanmış orijinal pH

3.2. Katı Besiyerinde Elde Edilen Sonuçlar

Çeşitli katkı maddeleri ilave edilmiş katı besiyerlerinde 40°C'de 3 gün İnkübasyondan sonra oluşan enzim 200 ml damıtık su ile belirli süreler sonunda ekstrakte edilerek alınmış ve analiz sonuçları Tablo 4'de özetlenmiştir.

Laboratuvar sıcaklığında gerçekleştirilen 1 saatlik İnkübasyon süresi ekstraksiyon için yeterli olmamış, +4°C'de 24 saatlik ekstraksiyon sonunda elde edilen ekstraktta daha yüksek aktivite saptanmıştır. Tabloda verilmemekle birlikte 24 saatten daha uzun süre ekstraksiyon süresi enzim aktivitesinde önemli artışlar sağlamamıştır.

Tablo 4. Katı besiyerinde değişik katkılarda elde edilen enzim ekstraktının ve bunlardan elde olunan toz enzimlerin aktiviteleri

Örnek No.	Katkılar ^a	Proteaz Akt. (Tyrozin µg/ml)		Süt Pıhtılaştırma Akt. (S. U.)		% 1'lik Toz Enzim	
		Ekstraksiyon süresi		Ekstraksiyon süresi		Tyrosin (µg/ml)	S.U.
		1 h	24 h	1 h	24 h		
1 ^b		92.3	156.2	1333	2727	142.0	6316
Malt unu							
2	1 g	99.4	166.6	1428	2857	150.0	2900
3	2 »	96.1	165.6	1368	4000	142.0	6000
4	3 »	108.8	169.4	1875	3530	150.5	7000
Soya unu							
5	1 g	113.6	186.9	2000	3000	142.0	6000
6	2 »	101.7	170.4	2000	3750	146.7	6000
7	3 »	121.1	208.2	1900	3600	146.2	4200
8	4 »	81.4	194.0	1900	4000	161.0	8600
Yağsız soya unu							
9	1 g	89.3	189.3	1463	2727	170.4	5500
10	2 »	86.1	176.0	1400	2727	175.1	7500
11	3 »	94.6	196.4	1364	3333	108.8	3500
12	4 »	115.6	220.0	1667	3750	169.4	3300
Peynir altı soya tozu							
13	0.25 g	89.9	185.5	1500	3185	169.4	8600
14	0.50 »	85.2	179.8	1300	4000	142.0	6000
15	0.75 »	86.6	183.6	1400	3160	118.8	4300
16	1.00 »	85.2	172.7	1450	3550	120.7	4150
17	1.25 »	84.6	191.6	1700	3550	137.2	5450
18	1.50 »	85.2	184.5	1350	3550	141.0	5200
R ^c						154.7	6320

a) Katkılar, 25 g Buğday kepeği + 25 ml Çeşme suyuna tabloda verilen miktarlarda ilave edilmiştir.

b) Katkı içermeyen katkı besiyeri

c) Mikrobiyal Rennet (Sigma No. A-5876)

Katı besiyerine ilave edilen katkı maddeleri, proteaz aktivitesinde önemli artışlar göstermemiş, ancak süt pıhtılaştırma aktivitelerinde dikkate değer artışlar sağlamıştır. Katı besiyerine 2 g malt unu, 4 g soya unu, 0.5 g peynir altı suyu tozu ilavesi maksimum değer olan 4000 S.U. süt pıhtılaştırma aktivitesi göstermiştir. Ancak aynı katkılarla proteaz aktivitesinin sırası ile 165.6 µg/ml, 194.0 µg/ml, 179.8 µg/ml tyrozin eşdeğerinde proteaz aktivitesi gösterdiği dikkate alınırsa, en iyi katkının 2 g malt unu olduğu anlaşılır. Katkı maddelerinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerindeki etkileri tanık olarak denemeye alınan ve katkı içermeyen Tablo 4'deki 1 no.lu örneğe ait değerler incelendiğinde daha kolayca anlaşılabilir.

Katı besiyerlerinde yapılan bütün çalışmalarda elde edilen enzim sıvısındaki değerler her koşulda sıvı besiyerleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen değerlerden fazla bulunmuş olup, literatür değerleri ile uygunluk göstermiştir (Somkuti and Babel, 1967).

3.3. Toz Enzimle Yapılan Deneme sonuçları

Çalışmanın bu aşamasında elde edilen enzim sıvılarından enzim, alkol ekstraksiyonu ile ayrılmış, vakum altında kurutulduktan sonra elde edilen toz enzimlerin aktiviteleri saptanmıştır. Tablo 4'de toz enzimlerin süt pıhtılaştırma ve proteaz aktiviteleri ticari Rennet (Sigma No. R - 5876) enzim preparatının % 1'lik çözeltisi ile kıyaslamalı olarak verilmiştir. Anlaşılacağı gibi elde edilen toz enzimlerin bazıları ticari Rennet'e eşdeğer ve bazı koşullarda da daha fazla aktivite göstermişlerdir.

SONUÇ

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, rennet üretiminde katı besiyeri kullanılmasının daha

uygun olacağı, ortama bazı katkı maddeleri ilavesinin elde edilen enzim üzerinde olumlu etkiler sağlayacağı anlaşılmıştır.

Ayrıca enzim izolasyonunda alkol kullanımının enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği ve düşük sıcaklıkta vakum altında kurutma işlemiyle enzimin toz hale getirilebileceği, bu şekilde taşınma, saklanma ve kullanılmasının kolaylaşacağı ortaya konmuştur.

Diğer ülkelerde giderek artan Rennet'in ülkemizde de üretilebilirliği saptanmıştır. Ancak ülke koşullarına uygun suş ile elde edilecek enzim preparatlarının tek başına ya da hayvansal kökenli rennin ile karışımlarının peynir yapımında denenmesi konusunda ilave araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bu şekilde döviz kaybı ve dışa bağımlılığımız azalacak, genç hayvan kesimlerinden doğan kayıplar da önlenebilecektir.

SUMMARY

In the production of cheese, it is necessary to coagulate the milk in order to be able to separate the casein from the whey. These enzyme can be obtained from various sources and microorganisms. Enzyme from *Mucor miehei* appears to possess a more favorable ratio between milk coagulating and proteolytic activity.

In this study, the effect of nitrogenous additives on enzyme activity has been searched.

Addition of ground malt, soy flour and powdered whey as nitrogen supplement to the medium showed positive effect on enzyme activity.

Vacuum dried and powdered enzyme showed almost similar activity as in commercial rennet preparate.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1985. Better Rennin Making With Microbes ASM News, Vol 51, No. 11.
- KEAY, L. and B.S., WILDI, 1970. Proteases of the Genus Bacillus. I. Neutral Proteases. Biotech and Bioeng. Vol 12, 179 - 212.
- KEAY, L., P.W. WOSTER, and B. WILDI, 1970. Proteases of the Genus Bacillus. II. Alkaline Proteases. Biotech and Bioeng. Vol. 12, 213 - 249.
- PINTAURO, N.D., 1979. Food Processing Enzymes, Recent Developments, Food Technology Reviews. No. 52 Noyes Data Corporation, Park Ridge. 420 S.
- ROMBOUTS, F.M. and W. PILNIK, 1978. Enzymes in Fruit and Vegetable Juice Technology. Process Biochemistry, August 1978. 9 - 12
- SOMKUTI, G.A. and F.J. BABEL, 1967. Conditions Influencing the Synthesis of Acid Protease by Mucor pusillus. Linat. Appl. Microbiol. Vol. 15, No. 6. 1309 - 1312.
- TOPAL, Ş., 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri. Gıda Dergisi, 10 (1): 25 - 37.
- United States Patent, No. 3.988.207 Oct. 1976.
- KHAN, M.R., J.A. BLAIN and J.D.E. PATTERSON, 1979. Extracellular Proteases of Mucor pusillus, Appl. and Env. Microbiol. Vol. 37 (4): 719 - 724.
- WANG, D.L.L., C.L. COONEY, A.L. DEMAIN, D. DUNNIL, A.E. HUMPHREY and MD. LILLY, 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John Willey and Sons, New York. 374 S.
- WINGRAD, L.B., K.K. EPRAHIM and L. GOLDSTEIN, 1979. Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol. 2 Enzyme Technology. Academic Press, New York, 306 S.

