Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Hydroliza skrobi przez unieruchomioną glukoamylazę

Ćwiczenie ma na celu poznanie jednej z metod unieruchamiania enzymów oraz przeprowadzenie procesu ciągłej hydrolizy skrobi przez unieruchomioną glukoamylazę.

Wprowadzenie

Amylazy to grupa enzymów, która katalizuje hydrolizę skrobi rozrywając wiązanie α-1,4 O-glikozydowe. Występują u zwierząt i roślin, syntetyzowane są również przez liczne mikroorganizmy. Wśród amylaz wyróżniamy endoamylazy, które hydrolizują wiązania wewnątrz cząsteczek substratu (α-amylaza), oraz egzoamylazy, katalizujące hydrolizę wiązań od nieredukującego końca cząsteczki polisacharydu, uwalniając β-maltozę (β-amylaza) czy β-D-glukozę (glukoamylaza).

Glukoamylaza

Glukoamylaza (glukohydrolaza α-1,4-glukanu, EC 3.2.1.3) katalizuje hydrolizę wiązań α-1,4-glikozydowych uwalniając β-D-glukozę z nieredukującego końca cząsteczki skrobi oraz pokrewnych poli- i oligosacharydów. Oprócz wiązania α-1,4-, enzym ten hydrolizuje również wiązania α-1,6- czy α-1,3-glikozydowe, ale reakcje te zachodzą z mniejszą szybkością. Obliczono, że aktywność glukoamylazy w stosunku do wiązań α-1,6-glikozydowych (k_{cat}/K_m), stanowi tylko 0,2% w porównaniu do szybkości hydrolizy preferowanych wiązań α-1,4-glikozydowych.

Glukoamylaza syntetyzowana jest przez mikroorganizmy, przede wszystkim grzyby (z rodzaju *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Penicillium* i innych) i bakterie (*Clostridium*, *Flavobacterium*), występuje również w tkankach zwierzęcych i u roślin wyższych. Glukoamylaza syntetyzowana przez drobnoustroje jest wydzielana do otoczenia. Rozkłada polisacharydy, zwiększając pulę cukrów prostych, które zużywane są jako materiał energetyczny lub budulcowy. Ze względu na stosunkowo prosty sposób otrzymywania preparatów enzymatycznych, glukoamylazę uzyskuje się na skalę przemysłową głównie z grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Te glukoamylazy charakteryzują się odpornością na zmiany pH, wykazując aktywność katalityczną w bardzo szerokim przedziale pH, nawet od pH 1,8 do 10,5. Zaobserwowano, że optima aktywności glukoamylaz zawierają się w przedziale pH 4,0 – 5,6. Optymalną temperaturą działania glukoamylaz jest temperatura w zakresie 40 – 65°C. Aktywatorami tego enzymu są jony Fe^{2+}, Co^{2+} i Mg^{2+}, natomiast jonami, które hamują aktywność enzymu są: Hg^{2+}, Ag^{2+} i Pb^{2+}.

Pod względem budowy glukoamylaza zaliczana jest do glikoproteidów, ponieważ zawiera w swym składzie 6-30% sacharydów. W skład reszty cukrowej wchodzą D-mannoza, D-glukoza, D-galaktoza, D-glukozamina i D-ksyloza. Reszty cukrowe związane są z częścią białkową poprzez reszty hydroksylowe seryny i treoniny wiązaniem O-glikozydowym. Uważa się, że wysoka zawartość grup cukrowych w enzymie pozwala na utrzymanie biologicznie aktywnej konformacji oraz wpływa na jego stabilność w warunkach podwyższonej temperatury, czy w szerokim zakresie pH (od 4 do ok. 10). Masy cząsteczkowe glukoamylazy wahają się od 40 kDa do nawet 250 kDa, np.: większość szczepów *A. niger* wydziela dwie główne formy glukoamylazy różniące się masą cząsteczkową (forma G1 – 99kDa, G2 – 112 kDa) przy czym obie posiadają podobną budowę części białkowej, a różnią się udziałem

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

części cukrowej (we frakcji cięższej udział reszt cukrowych jest dwa razy większy). Część białkowa składa się z dwóch domen, domeny katalitycznej i domeny wiążącej skrobię. Domena katalityczna składa się z 13 α-helis, z czego 12 tworzy kształt podobny do beczki [$(\alpha/\alpha)_6$-barrel]. Wewnątrz niej znajduje się centrum aktywne, utworzone przez 6 wysoce konserwatywnych odcinków α→α. Tu znajdują się kluczowe dla reakcji hydrolizy aminokwasy kontaktowe (*A. awamori* – Glu 179 i Glu400). Do C-terminalnej części domeny katalitycznej przyłączona jest, poprzez giętki łącznik, domena wiążąca skrobię. Po przeciwległych jej stronach znajdują się dwa regiony odpowiedzialne za przyłączanie substratu. Domena ta wiąże skrobię rozrywając jej zbitą strukturę, co wydatnie ułatwia jej hydrolizę przez domenę katalityczną.

Glukoamylaza katalizuje hydrolizę wiązań glikozydowych z inwersją konfiguracji przy anomerycznym atomie węgla uwalnianego produktu. Zjawisko to zostało nazwane przegrupowaniem Waldena. Wynika ono z mechanizmu katalizowanej przez enzym reakcji. Mechanizm katalizy obejmuje przeniesienie protonu na glikozydowy atom tlenu przecinanego wiązania. Proton ten pochodzi z głównego katalizatora kwasowego jakim jest Glu 179 w glukoamylazie z *A. niger*. Drugi etap to nukleofilowy atak cząsteczki wody z udziałem głównego katalizatora zasadowego (Glu 400). Atak cząsteczki wody przebiega od strony głównego katalizatora zasadowego i w konfiguracji β przecinanego wiązania glikozydowego, stąd też uwolniona cząsteczka glukozy jest anomerem β.

Zastosowanie glukoamylazy w przemyśle

Skrobia jest głównym materiałem zapasowym roślin. Znanych jest kilka procesów, w trakcie których skrobia jest hydrolizowana. Na skalę techniczną stosuje się kwaśną hydrolizę lub też metody enzymatyczne. Wydajność procesu kwaśnej hydrolizy skrobi nie przekracza 80% w wyniku rewersji lub też rozkładu glukozy. Dlatego też metoda ta jest coraz rzadziej wykorzystywana i zastępowana tańszą i wydajniejszą o 5 – 12% metodą hydrolizy enzymatycznej. Otrzymuje się w ten sposób hydrolizaty o wyższej jakości, bez konieczności stosowania materiałów odpornych na działanie silnych kwasów i wysokiej temperatury. Opracowano kilka metod enzymatycznej hydrolizy skrobi na skalę przemysłową, z czego najczęściej stosowane są dwie: metoda kwas-enzym i metoda enzym-enzym. Oba procesy technologiczne przebiegają w dwóch etapach. W pierwszym skrobia jest częściowo hydrolizowana (upłynniana) za pomocą kwasu solnego (kwas-enzym) lub enzymatycznie (metoda enzym-enzym) przy zastosowaniu termostabilnych α-amylaz bakteryjnych. Drugi etap obejmuje scukrzanie skrobi preparatem zawierającym glukoamylazę. Produktem całkowitej hydrolizy skrobi jest glukoza. Stosowana jest w przemyśle cukierniczym, piekarskim, owocowo-warzywnym, mleczarskim i farmaceutycznym. Ponadto, glukoamylaza znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle fermentacyjnym. Źródłem skrobi do produkcji etanolu mogą być kukurydza, pszenica, ziemniaki, maniok. Przetworzenie skrobi w alkohol wymaga jej scukrzenia przed właściwą fermentacją zachodzącą pod wpływem drożdży. Zastosowanie preparatów enzymatycznych przyczyniło się do zmniejszenia zużycia słodu, uzyskania lepszych warunków hydrolizy skrobi, skrócenia czasu produkcji i ograniczenia ilości powstających w procesie technologicznym ścieków.

Immobilizacja enzymów

Immobilizacja to unieruchomienie związku rozpuszczalnego na nierozpuszczalnym nośniku. Najczęściej procesowi immobilizacji poddaje się enzymy, lecz unieruchamia się również

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

mikroorganizmy, a także antybiotyki, co znajduje coraz szersze zastosowanie w medycynie. Prace nad technikami immobilizacji rozpoczęto już w latach 60-tych. Kierunek ten rozwinął się szybko, zarówno od strony badawczej, jak i pod kątem możliwości zastosowania opracowanych metod w praktyce przemysłowej. Immobilizacja enzymów przynosi wiele korzyści: możliwość wielokrotnego użycia enzymów, możliwość użycia enzymów w reaktorach przepływowych, brak zanieczyszczenia produktu enzymem, lepszą kontrolę warunków reakcji oraz „poprawienie" niektórych właściwości enzymów (przesunięcie optimum pH do wartości bardziej dogodnych dla procesu technologicznego, często zwiększenie termostabilności, immobilizacja może również zapobiegać autoinaktywacji unieruchomionych enzymów). Wadami unieruchamiania enzymów są: wysokie koszty, częściowa utrata aktywności oraz konieczność stosowania tylko rozpuszczalnych substratów. Stosowane w immobilizacji nośniki powinny być fizycznie i chemicznie stabilne, odporne na działanie drobnoustrojów; złoże powinno mieć odpowiednią strukturę aby utrzymać odpowiedni poziom dyfuzji; pory nośnika powinny mieć odpowiednią wielkość tak aby związały enzym i nie ograniczały wiązania przez enzym substratu; nośnik powinien być tani.

Techniki unieruchamiania enzymów można podzielić na:

- adsorpcję na nierozpuszczalnych nośnikach,

- inkluzję w sieci polimerowej,

- mikrokapsułkowanie wewnątrz półprzepuszczalnych membran,

- wiązanie kowalencyjne,

- sieciowanie czynnikami dwufunkcyjnymi.

W metodzie immobilizacji adsorpcyjnej enzym wiąże się do nośnika za pomocą oddziaływań elektrostatycznych, wiązań wodorowych i oddziaływań van der Waalsa. Nie następują zazwyczaj zmiany struktury enzymów, które mogłyby spowodować zmniejszenie aktywności enzymu. Zastosowanie techniki adsorpcji ogranicza się jednak do enzymów cechujących się wysokim powinowactwem do nośnika i do mieszanin o niskiej zawartości soli, gdyż w przypadku immobilizacji adsorpcyjnej może dochodzić do zjawiska desorpcji (wymywanie cząsteczek enzymu z powierzchni adsorbentu). Nośnikami najczęściej stosowanymi w metodzie adsorpcyjnej są tlenki metali (np. glinu), krzemionka, szkło porowate, ziemia okrzemkowa, węgiel aktywny czy jonowymieniacze (np. DEAE-celuloza czy CM-celuloza). Aby zwiększyć siłę wiązania enzymu do sorbentu (np. szkło porowate), nośnik pokrywa się materiałami o dużej gęstości i dostępności ładunku, m.in. polietylenoiminą czy chitozanem.

Inną, często stosowaną metodą immobilizacji jest inkluzja w sieci polimerowej (pułapkowanie). Nośnikami są zwykle polimery pochodzenia naturalnego (najczęściej agar) lub polimery syntetyczne (poliakryloamid). Podczas unieruchamiania enzymy zamykane są w porach żelu. Immobilizowane w ten sposób enzymy mogą być wymywane, mają też ograniczony dostęp do substratów o wysokiej masie cząsteczkowej. Ponadto użycie biopolimerów wyklucza ich zastosowanie do unieruchamiania niektórych enzymów hydrolitycznych, a także obniża odporność złoża na działanie mikroorganizmów.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Mikrokapsułkowanie polega na oddzieleniu enzymu od środowiska poprzez zamknięcie wewnątrz półprzepuszczalnej membrany np.: nylonowej. Mikrokapsułkowanie jest jednak ograniczone do immobilizacji enzymów katalizujących przemiany substratów o niskiej masie cząsteczkowej.

Wiązanie kowalencyjne jest najtrwalszym połączeniem enzymu z nośnikiem. Enzym może być przyłączany przez grupy -SH cysteiny, grupy aminowe i karboksylowe (m.in. z udziałem aminokwasów C- i N-końcowych), hydroksylowe, pierścień imidazolowy histydyny czy pierścień fenolowy tyrozyny. W wyniku immobilizacji kowalencyjnej dochodzi do obniżenia aktywności enzymu związanego ze złożem w skutek tworzenia się wiązań kowalencyjnych z grupami znajdującymi się w bezpośrednim sąsiedztwie centrum aktywnego, bądź też w samym centrum aktywnym. Aby tego uniknąć proces immobilizacji prowadzi się w obecności substratu lub inhibitora. Jako nośniki stosuje się zazwyczaj celulozę, szkło porowate, szkło powlekane, złoża dekstranowe i inne.

Innym sposobem immobilizacji z wykorzystaniem wiązania kowalencyjnego jest metoda sieciowania czynnikami wielofunkcyjnymi. Metoda ta polega na tworzeniu poprzecznych wiązań między cząsteczkami enzymu. Do tego celu służą m.in.: aldehyd glutarowy, dwufunkcyjne czynniki alkilujące czy pochodne benzydyny. Powstałe w wyniku sieciowania polimery charakteryzują się niską wytrzymałością mechaniczną, co znacznie utrudnia ich stosowanie w przemyśle.

Na ćwiczeniu glukoamylaza będzie unieruchamiana metodą adsorpcji na chitozanie (produkt deacetylacji chityny). Wydajność procesu będzie kontrolowana poprzez porównanie aktywności glukoamylazy w roztworze użytym do immobilizacji z aktywnością enzymu w wycieku z kolumny (glukoamylaza, która nie związała się do złoża), co będzie stanowić podstawę do obliczenia ilości glukoamylazy unieruchomionej na chitozanie. Następnie zbadana zostanie zdolność immobilizowanej glukoamylazy do hydrolizy skrobi. W tym celu, po naniesieniu na kolumnę skrobi, oznacza się ilość uwolnionej przez unieruchomiony enzym glukozy. Stopień wiązania glukoamylazy do złoża, a także stopień hydrolizy skrobi (prowadzonej w sposób ciągły na kolumnie) będą oznaczane metodą Bernfelda. Metoda ta polega na redukcji grupy nitrowej w pozycji 3 kwasu 3,5-dinitrosalicylowego do grupy aminowej przez glukozę uwolnioną w wyniku działania glukoamylazy na skrobię. Powstałe w ten sposób pochodne aminowe mają w środowisku zasadowym barwę pomarańczową, której intensywność zależy bezpośrednio od ilości cukrów redukujących.

Odczynniki

(1) Preparat handlowy chitozanu (0,6 g na parę)

(2) Preparat handlowy glukoamylazy

(3) Bufor Mc Ilvainae'a, pH 4,5 (zmieszać 44,1 ml 0,02 M Na_2HPO_4 z 55,9 ml 0,01 M kwasu cytrynowego i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 ml, sprawdzić pH)

(4) 1% kwas 3,5 dinitrosalicylowy (DNS) – 10g DNS rozpuścić w 500 ml wody, dodać 200ml 2M NaOH i 300g winianu sodowo-potasowego, uzupełnić wodą do 1000 ml

(5) 1% roztwór skrobi rozpuszczalnej w buforze Mc Ilvaine'a, pH 4,5

(6) 0,4% roztwór skrobi rozpuszczalnej w buforze Mc Ilvaine'a, pH 4,5

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

(7) Roztwór jodu (0,3% I_2 w 3% KI)

Wykonanie

Ćwiczenie wykonywane jest w parach.

Immobilizacja enzymu

Z preparatu glukoamylazy rozcieńczonego w kolbce miarowej do 25 ml pobrać 0,5 ml do kolbki miarowej na 100 ml i uzupełnić do kreski buforem Mc Ilvaine'a, pH 4,5 (3). Roztwór ten zostanie użyty do oznaczenia aktywności glukoamylazy w roztworze wyjściowym (roztwór A).

Pozostałe 24,5 ml preparatu umieścić w zlewce o pojemności 50 ml z 0,6 g chitozanu (1). Zawiesinę mieszać przez 1 godzinę przy niewielkich obrotach na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Następnie chitozan z unieruchomionym enzymem upakować w kolumnie. W tym celu kolumnę chromatograficzną umieścić na statywie. Zamknąć wylot kolumny zaciskiem i dolać niewielką ilość (ok. 1 ml) buforu Mc Ilvaine'a (3). Przenieść całą zawartość zlewki do kolumny i odczekać kilka minut w celu osadzenia się chitozanu. Chitozan ze ścianek kolumny spłukać buforem, a powierzchnię złoża zabezpieczyć watą. Pod wylot kolumny podstawić kolbkę miarową na 50 ml, otworzyć zacisk i zbierać wyciek (przepływ ok. 20 kropli na minutę). Po odsączeniu płynu znad złoża (płyn ma się znajdować na wysokości ok. 1 mm nad złożem) przemywać kolumnę buforem Mc Ilvaine'a (3) aż do momentu zebrania 50 ml wycieku z kolumny. Roztwór w kolbce wymieszać, pobrać 1 ml i przenieść do kolbki na 25 ml. Uzupełnić do kreski buforem Mc Ilvaine'a (3) (roztwór B).

Oznaczenie aktywności glukoamylazy

Aktywność glukoamylazy oznacza się metodą Bernfelda w rozcieńczonym roztworze wyjściowym glukoamylazy (roztwór A) oraz w rozcieńczonym wycieku z kolumny (roztwór B). Do 6 ponumerowanych probówek (4 pełne i 2 materiałowe) odmierzyć po 0,2 ml skrobi (5) i wstawić na 5 minut do łaźni wodnej nastawionej na 30°C. Następnie do dwóch probówek dodać po 0,2 ml rozcieńczonego roztworu wyjściowego glukoamylazy (roztwór A), a do dwóch następnych po 0,2 ml rozcieńczonego wycieku z kolumny (roztwór B) i wymieszać. Inkubować dokładnie 15 min od czasu dodania enzymu. Następnie do wszystkich prób dodać 0,4 ml DNS (4), a do prób materiałowych odmierzyć po 0,2 ml odpowiedniego roztworu glukoamylazy. Po wymieszaniu wszystkie probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej i gotować 10 minut. Próby należy schłodzić, do każdej dodać 4 ml wody destylowanej i wymieszać. Odczytać wartość absorbancji przy 540 nm w fotometrze wyzerowanym na próbę materiałową.

Hydroliza skrobi przez unieruchomioną glukoamylazę

Odsączyć bufor znad złoża (do wysokości 1 mm nad złożem), zamknąć zacisk i nanieść na kolumnę 5 ml 0,4% roztworu skrobi (6). Pod wylot kolumny podstawić cylinder miarowy o pojemności 10 ml i otworzyć zacisk. Przepływ powinien wynosić ok. 20 kropli na minutę. Po odsączeniu roztworu kolumnę przepłukać 3-krotnie po 10 ml buforu Mc Ilvaine'a (3). Zebrać 2 frakcje wycieku z kolumny – pierwszą 10 ml i drugą 20 ml.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

W obu frakcjach należy oznaczyć zawartość glukozy. W tym celu do 2 probówek odmierzyć po 0,2 ml frakcji pierwszej i uzupełnić buforem Mc Ilvaine'a (3) do 0,4 ml, a do następnych dwóch po 0,4 ml frakcji drugiej. Do piątej odmierzyć 0,4 ml buforu Mc Ilvaine'a (3) (próba materiałowa). Do wszystkich prób dodać po 0,4 ml DNS (4) i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Następnie próby schłodzić, do każdej z nich dodać 4 ml wody, wymieszać i mierzyć absorbancję wobec próby materiałowej przy 540 nm.

W celu sprawdzenia obecności skrobi w wycieku z kolumny do 2 ml wycieku z frakcji pierwszej i drugiej dodać 2 lub 3 krople roztworu jodu (7).

Opracowanie wyników

Wydajność procesu immobilizacji glukoamylazy

Odczytać z krzywej wzorcowej ilość glukozy odpowiadającą zmierzonym wartościom absorbancji. Uwzględniając rozcieńczenie obliczyć aktywność glukoamylazy w µmolach uwolnionej glukozy w ciągu 1 minuty przez glukoamylazę zawartą w 1 ml preparatu handlowego glukoamylazy. Rozcieńczenie policzyć ze schematu rozcieńczeń.

Schemat rozcieńczeń dla roztworu A (preparat wyjściowy)

0,4 ml glukoamylazy handlowej → 25 ml → 0,5 ml → 100 ml → 0,2 ml do oznaczeń

Schemat rozcieńczeń dla roztworu B (wyciek z kolumny – frakcja nie związana ze złożem)

0,4 ml glukoamylazy handlowej → 25 ml → 24,5 ml → 50 ml → 1 ml → 25 ml → 0,2 ml do oznaczeń

Następnie porównać wyniki dotyczące wycieku z kolumny z wynikami dotyczącymi roztworu wyjściowego i obliczyć wydajność procesu immobilizacji glukoamylazy na chitozanie. Wynik podać w procentach.

Wydajność hydrolizy skrobi przez immobilizowaną glukoamylazę

Odczytać z krzywej wzorcowej ilość uwolnionej glukozy. Uwzględniając rozcieńczenia, obliczyć całkowitą ilość glukozy w obu frakcjach wycieku z kolumny (frakcja pierwsza: 10 ml → 0,2 ml do oznaczeń; frakcja druga: 20 ml → 0,4 ml do oznaczeń). Otrzymane wyniki w mg glukozy przeliczyć na mg skrobi wiedząc, że:

$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$
m.cz. 162 18 180

Obliczyć wydajność hydrolizy skrobi przez glukoamylazę wiedząc, że na kolumnę naniesiono 20 mg skrobi (5ml 0,4% skrobi). Wynik podać w procentach.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie.
Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Literatura

Bernfeld P (1955) Amylases, α and β. Methods in Enzymol 1: 149-158.

James JA, Lee BH (1997) Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology – a review. J Food Biochem 21: 1-52

Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, Roepstroff P, Svensson B (2000) Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. Biochim Biophys Acta 1543: 275-293

Sheldon RA (2007) Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Adv Synth Catal 349: 1289-1307

Synowiecki J, Wołosowska S (2007) Otrzymywanie i niektóre zastosowania unieruchomionych enzymów. Biotech 2: 7-26