

## Enzymy bakterií, kvasinek a plísň — 1. část \*)

Všechny mikrobiologické procesy, ať už kvasné, oxydační nebo syntetické, jsou v podstatě založeny na činnosti enzymů. Největší část těchto procesů je prováděna enzymatickými reakcemi ve spojení s živými a ve většině případů rostoucími buňkami mikroorganismů. Předmětem našeho pojednání jsou však biochemické procesy, které probíhají nezávisle na živé buňce, t. j. procesy používající více nebo méně upravených enzymových přípravků, získaných činností mikroorganismů, t. j. bakterií, aktinomycet a hub. Posledních padesát let technické mikrobiologie přineslo tolik novinek, že technologie a výroba mikrobiálních enzymů tvoří dnes významný obor, jehož dosavadnímu rozsahu a perspektivám je věnováno mnoho pozornosti v současném světovém odborném tisku, z něhož je třeba uvést alespoň základní monografie a přehledné články [1, 2, 3, 4, 5, 7, 8].

Teoretickým otázkám vzniku a činnosti enzymů je věnováno (kromě nepřehledného množství původních prací) několik nejnovějších kompilací, monografií a učebnic [6, 12, 13, 14] a též ročně pravidelně vycházející *Ergebnisse der Enzymforschung*, *Advances in Enzymology* a obsáhlá pojednání v *Annual Review of Biochemistry* a *Annual Review of Microbiology*.

Enzymové preparáty, náležející do shora vymeze-

ného rámce, jsou tohoto typu: 1. enzymy oddělené různým způsobem od produkčního mateřského mikroorganismu a 2. enzymy, jejichž preparát obsahuje i životaschopné mateřské organismy. K první skupině patří enzymy různě purifikované a částečně izolované, a to především komplexní systémy, obsahující často celý pestrý soubor individuálních enzymů, avšak charakterisované nebo přicházející na trh na podkladě aktivity jedné nebo dvou složek. Nejlépe známé a také nejvíce užívané jsou enzymy hydrolytické, především amylázy, pektinmethylesterázy, lipázy, invertáza, proteinázy atd., avšak v poslední době i enzymy oxydoredukční, dekarboxylázy a pod.

Amylázy [viz též 40, 48, 51, 132, 159] ve formě preparátů byly zavedeny již dříve než před padesáti lety Jokichi Takaminem, který využil zkušeností s t. zv. kodži, které ve Východní Asii je obdobou našeho sladu a získává se od nepaměti z rýžových otrub, které se nechávají prorůst kulturami plísň především ze skupiny *Aspergillus flavus-oryzae*. Takamine připravil různé obdoby t. zv. takadiastázy, preparátu s vysokou amylolytickou aktivitou, získaného ze substrátu, na němž rostly jmenované aspergily. Tyto amylázové preparáty vykazují značnou aktivitu  $\alpha$ -amylázy, t. j. štěpí dlouhé polyhexosové řetězce s  $\alpha$ -1,4 glykosidickými vazbami na kratší dextriny a uvolňují maltosu a glukosu. Jsou tedy obdobné sladovým amylázám a byly

\*) 2. část bude otištěna v nejbližším čísle Kvasného průmyslu.



přípravěny vysoce purifikované nebo i krystalické [9, 55, 10, 11].

S úspěchem bylo užito k jejich izolaci i papírové chromatografie [44, 95, 153] a elektroforesy na papíře [153]. Těmito metodami byly ve filtrátu z *Aspergillus oryzae* zjištěny i další enzymy jako maltáza,  $\beta$ -glukosidáza, sacharáza, různé transglykosidázy, proteáza, kataláza, celulóza, fosfatáza a jiné esterázy [96, 133].

Rovněž mechanismu jejich účinku na složky škrobu (t. j. amylózu a amylopektin) byl věnován velký zájem [15, 16, 17, 18, 19, 20, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 49, 58, 59, 65, 73].

Je uvažováno i o přítomnosti  $\beta$ -amylázy u plísní [21].

V souvislosti s těmito problémy byly vypracovány nové metody hodnocení činnosti těchto enzymů. Bylo zavedeno testování amyláz difusní metodou pomocí papírových disků na škrobovém agaru [22, 23], popsány nové modifikace viskosimetrického sledování ztekucování škrobu [24, 63] i ve spojení s dextrinizační zkouškou [25, 26, 27, 43, 64].

Významně se zde uplatňuje i papírová chromatografie [70, 71, 146, 147], po příp. kolorimetrická metoda založená na schopnosti škrobu vázat barvivo [80] nebo stanovení cukrů pomocí selektivního odkvašování [116, 150]. Studovány byly podmínky, ovlivňující produkci amyláz během kultivace [69, 72, 97, 77, 60, 98, 148].

Amylolytické preparáty se připravují v podstatě dvojím způsobem: velmi rozšířená je kultivace produkčních mikrobů na pevných půdách, jako na př. na upařených pšeničných otrubách, rozestřených na liskách a naočkováných sporami produkční plísně. Po ukončení kultivaci, při níž se kontroluje teplota, vlhkost atd., přicházejí plísňové otruby do perkolátorů a enzym je extrahován rozpouštědly (vodnými), ze kterých je pak srážen alkoholem, rychle odcentrifugován a zbaven alkoholu, aby nedošlo k poškození enzymu. Suchý prášek je pak různě upravován stabilizátory, aktivátory, ústojnými solemi a pod. [81].

Tohoto principu je užíváno i u jiných produkčních kmenů (*A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *B. subtilis* a podobně) a enzymů též v kontinuální úpravě [131].

Druhý způsob užívá tekutých půd především za submersních podmínek, t. j. vzdušnění a míchání. Tyto podmínky vyhovují lépe bakteriím, avšak ani u nich nebyla ovládnuta značná variabilita, která se projevuje v nestejné rovnováze souboru produkovaných enzymů. Protože submersní metoda je postupem, který dovede výrobu mikrobiálních enzymů postavit na ekonomický základ, je třeba zvýšit zájem o jeho aplikaci v tomto úseku. Předpokladem ovšem je ovládnutí variability produkčního kmene, což však lze jen po poznání jeho vlastností a respektování požadavků tohoto živého organismu. To je tedy úkol základního výzkumu. Zde již byly získány slibné výsledky, jako na př. varianty *A. oryzae* po působení ultrazvuku s vyšší produkcí amyláz [54], po ozáření ultrafialovými paprsky [141, 142] nebo pomocí vegetativní hybridizace [75]. Pozornost je věnována i selekci po monosporickém výsevu [61, 62] a samozřejmě i úpravě media [69, 92, 93, 94].

Oba popsané způsoby výroby původně určené pro přípravu amyláz jsou s úspěchem užívány po náležitých úpravách i pro získání jiných enzymů. Amylázové preparáty plísňového původu mají širokou možnost užití a proti sladovým amylázám mají tu

výhodu, že vhodným způsobem přípravy lze získat preparáty s požadovanými vlastnostmi. Tak t. zv. „Clarase Pectin“ neobsahuje pektinmethylesterázu a polygalakturonázu a je proto hojně užíván k čišťení pektinových výrobků z jablečných hydrolyrátů, normálně zakalených škrobem. Ze zkušenosti víme, že prostý výluh z plísňových otrub *Aspergillus oryzae* štěpí škrob v těchto hydrolyzátech, při čemž rozsolovací mohutnost pektinu není dotčena [149, 151].

Aby bylo zjištěno, že v preparátu případně přítomné stopy pektolytických enzymů nebudou destruuovat pektin, lze přidat do preparátů malé množství močoviny nebo thiomočoviny, které tyto enzymy inaktivují [99]. Jiným místem, kde se s úspěchem užívá amylolytických plísňových preparátů [100, 101, 156, 130], je výroba chleba. Amyláza z *Aspergillus oryzae* přidaná do chlebového těsta zlepšuje jeho vlastnosti tak, že se lépe zpracovává a chléb má lepší stabilitu i jakost. Enzymový preparát musí mít též určitou aktivitu proteolytickou, protože se požaduje mírné naštěpení glutenu. Dále má preparát atakovat škrobová zrna a produkovat hojně maltózy, avšak méně dextrinů, aby chléb nebyl lepkavý. Tyto požadavky ovšem splňují jen některé kmeny vhodně vedené [139, 157].

Při přípravě sladkých syropů ze škrobu se též užívá plísňových amyláz (*Aspergillus flavus*). Syropy nekystalisují, obsahují hojně nízkomolekulárních dextrinů a maltózy, avšak málo glukózy. Rovněž ve farmaceutickém průmyslu při extrakci alkaloidů lze s výhodou užít amyláz, které odstraňují polysacharidické složky [68]. Ve farmaceutickém průmyslu lze užít diastatických enzymů k odstranění pyrogenů [155].

Zvyšuje se zájem i o bakteriální amylázy. Byly studovány amylázy u klostridií máselného [34] a butanolacetonového kvašení [45, 46], aktinomycet [129], které jsou pozoruhodné tím, že produkují jen  $\alpha$ -amylázu, a řady jiných bakterií [38, 39, 50, 56, 78, 154]. Byl též patentován submersní postup kultivace [87, 88].

Pro maximální produkci enzymu u *B. mesentericus* je třeba silného vzdušnění [134] a teploty 35°, t. j. vyšší než pro maximální růst (30°) [135] a konečně vhodného složení substrátu (škrob, ethanol a pepton) [136]. Jiné kmeny ovšem vyžadují jiné podmínky a k jejich fermentaci lze užít i různých odpadních vod, jako na př. vody i zbylého mycelia po fermentaci penicilinu [137].

Produkci bakteriálních amyláz lze zvýšit přidáním taninu do media [91] a vhodnou úpravou media [34, 56].

Amyláza z *B. subtilis* má vynikající vlastnost ve své vysoké thermoresistenci. Enzym je plně aktivní při 95° a udrží si aktivitu i po několikaminutovém varu v přítomnosti škrobu. Tím se dostává na př. textilnímu průmyslu možnost odstraňovat škrobovou apreturu z vláken kontinuálně, rychle a za vysokých teplot. Škrob mírně naštěpený tímto enzymem se rovněž často užívá v textilním a papírenském průmyslu (lepení).

Při hydrolyse škrobu se významně uplatňují též enzymové přípravky, které je třeba zařadit do druhé skupiny enzymových preparátů, t. j. takových, které nebyly separovány od mateřského organismu. Na prvním místě jsou to opět plísňové otruby a podobné výrobky s amylolytickými vlastnostmi. Jejich příprava byla zhruba popsána výše. Rozdíl je v tom, že se těchto plísňových otrub užívá buď přímo přimícháním do substrátu, nebo jsou před



použitím vyluhovány vodným roztokem nárazníkových solí, čímž se získá aktivní enzymový filtrát. Takto se používá amylolytických plísňových otrub především na místě sladové diastázy ke zcukřování škrobu při přípravě zápar pro alkoholové kvašení. Při přípravě amylolytických přípravků se hojně užívá povrchové lískové metody [90, 102]. Rovněž submersní přípravou amylolytických roztoků se zabývalo více prací [35, 37, 57, 60, 76, 77, 82, 83, 84, 85, 86, 89, 103] a doporučují užívat takto připravených plísňových amyláz ke zcukřování obilných zápar pro alkoholové kvašení [36, 41, 42, 47, 66, 67, 74, 79].

Výhodou při tomto procesu je sekundární štěpení oligosacharidů (dextrinů) při vlastním kvašení [52, 53] i možnost využití různých odpadních látek, jako složek fermentačního media (výpalky po butanolacetonovém nebo lihovém kvašení [138]). Pro bramborové zápary jsou plísňové amylázy vhodné [41, 42, 106, 152] právě tak jako pro různé obilí [92, 107].

Velká pozornost byla věnována v této souvislosti vzniku nezkvasitelných oligosacharidů a jejich štěpení [112, 113, 114, 115, 117, 119, 123, 116, 126, 127, 128, 150] a funkci transglykosidických enzymů, ovlivňujících dynamiku hydrolysy škrobu [118, 120, 121, 122, 124, 125, 147, 150].

Submersní fermentace však musí být chráněna před infekcí, protože některé kontaminující bakterie mohou vytvořit amylolytické enzymy opět štěpit. Podle seriosních zpráv [104, 105, 111] je výtěžek alkoholu z takto připravených zápar vyšší než ze zápar zcukřených sladem. Jsou-li plísňové nebo bakteriální amylolytické přípravky submersně, lze dosáhnout i zlevněné ceny lihu proti normálnímu postupu se sladem. Velmi ovšem záleží na aktivitě preparátu. U plísňových otrub jsme na př. shledali, že při zachování potřebných podmínek, jako je přístup vzduchu, regulace teploty a vlhkosti, výška vrstvy otrub a konečná volba vhodného kmene, lze získat preparáty, které mají vysokou aktivitu, zdaleka převyšující preparáty z jiných substrátů. Proti sladu mají plísňové a bakteriální amylolytické čtené výhody, ale i některé nevýhody. Výhodou je jejich dlouhá skladovatelčnost ve vysušeném stavu, možnost levné a jednoduché přípravy méně náročné než je sladování, přítomnost t. zv. limit-dextrinázy a i jiných enzymů podílejících se na hlubším rozštěpení škrobu za vzniku většího množství zkvasitelných cukrů. Největší výhodou je, že lze řídit vzájemný poměr složek amylolytického enzymového systému jednak výběrem produkčních kmenů, jednak úpravou kultivačních podmínek, jak jsme již ukázali v našich pracích, které byly publikovány nebo předneseny [147, 148]. Nevýhodou některých plísňových amyláz může být charakteristická změna chuti alkoholu, která však není nepřijatelná a výrobku lze použít jak k pitným, tak i k technickým účelům. Plísňové amylázy mají slabší ztekucovací schopnost než sladové, jsou však v tomto ohledu výhodnější než bakteriální [140]. Doporučuje se proto přidávat malé množství sladu nebo provést některé úpravy technologického postupu [152, 160, 161].

Na příbuzném principu založený amyloproces se nyní užívá hlavně na Dálném Východě [108, 109, 110]. Japonští badatelé studovali různé *aspergily* (*A. niger*, *A. usami*, *A. oryzae*, *A. awamori*) při zcukřování zápar u dvoufázového procesu a dosáhli 88 % teoretického výtěžku [143]. U jednofázového

procesu se osvědčil *Rhizopus javanicus* [144]. Rychlejšího ztekucení bylo dosaženo hydrolysou husté zápary zředěnou kyselinou. Plísňové enzymy pak provedou dokonalé zcukření [145].

Na problému náhrady obilních zelených a suchých sladů amylolytickými plísňovými preparáty se u nás pracuje již od r. 1949 a některé výsledky byly již publikovány [40, 41, 42, 152]. Po laboratorních a poloprodučních zkouškách byly výsledky převedeny přes pokusné provozy v zemědělských lihovarech (Záborná, Staré Ždánice a Štítina) do praktického provozu. Dnes již mimo vlastní výroby plísňových preparátů (pracující lískovým způsobem a přidružené k lihovaru) pracuje v ČSR podle nových technologických postupů vypracovaných pracovníky Výzkumného ústavu kvasného průmyslu v Praze v čele s Dr. Ing. J. Malcherem 20 lihovarů. Další rozšíření závisí na výstavbě nových výroben. Podle zprávy J. Malchera [162] použití suchých plísňových preparátů umožňuje okamžité zahájení výroby, odstraňuje namáhavé práce při výrobě zemědělského lihu, usnadňuje mechanizaci výrobního procesu a zlepšuje vlastní techniku výroby zemědělského lihu. Postupně bylo v našich poměrech plísňovými preparáty nahrazeno v kampani 1952–53 souhrnně 7 tun ječmene, v r. 1953–54 15 tun, v r. 1954–55 30 tun a v kampani 1955–56 klesla spotřeba ječmene o 45 tun. Do příští kampaně má být dokončena mechanizace výroby plísňových preparátů na jednom pracovišti u Slezských lihovarů s roční kapacitou 250 tun suchého produktu a pro další rok je počítáno s další výrobou se stejnou kapacitou.

Plísni se u nás používá jak při výrobě lihu z havorovaného obilí, tak při výrobě lihu z bramborů. Nedostupným zcukřujícím prostředkem jsou plísni při kombinované výrobě škrobárensko-lihovarské, neboť dávají možnost uskutečnit výrobu v lihovaru se dvěma zaměstnanci.

Obdobné zkušenosti jsou hlášeny i ze SSSR [158, 161].

Uvažíme-li, že asi čtvrtina světové produkce ječmene je sladována, mohou plísňové amylázy znamenat značnou úsporu obilovin.

#### Literatura

- [1] Tauber H.: The Chemistry and Technology of Enzymes (1949).
- [2] Reed G.: Chem. Ind. 66 (1950) 30.
- [3] Wallerstein L.: Ind. Eng. Chem. 31 (1939) 1218.
- [4] Smythe C. V.: Econ. Botany 5 (1951) 126.
- [5] Lockwood L. B.: Trans. N. Y. Ac. Sci. Ser. II 15 (1952) 2.
- [6] Sumner J. B., Myrbäck K.: The Enzymes, vol. I–IV (1951).
- [7] Horwood M.: Chem. Ind. 62 (1952).
- [8] Bernhauer K.: Erg. d. Enzymf. 11 (1950) 304.
- [9] Bovard F. C.: Iowa St. Coll. J. Sci. 27 (1953) 132.
- [10] Fischer E. H., de Montmollin R.: Helv. Chim. Acta 34 (1951) 1987.
- [11] Underkofler L. A., Roy D. K.: Cereal Chem. 28 (1951) 18.
- [12] Sumner J. B., Somers G. F.: Chemistry and Methods of Enzymes (II. vyd. — 1947).
- [13] Bersin T.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie (IV. vyd. — 1954).
- [14] Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R.: Crystalline Enzymes (1948).
- [15] Hopkins R. H., Jelinek B.: Biochem. J. 56 (1954) 136.
- [16] Bird R., Hopkins R. H.: Biochem. J. 56 (1954) 140.
- [17] Bird R., Hopkins R. H.: Biochem. J. 56 (1954) 86.
- [18] Pazur J. H., French D., Knapp D. W.: Proc. Iowa Ac. Sci. 57 (1950) 203.
- [19] Pazur J. H.: J. Biol. Chem. 205 (1953) 75.



- [20] Whelan W. J., Roberts P. J. P.: J. Chem. Soc. 261 (1953) 1298.
- [21] Meeuse B. J. B.: J. Rsp. Bot. 3 (1952) 52.
- [22] Stark E. a sp.: Appl. Microbiol. 1 (1953) 236.
- [23] Dingle T. a sp.: J. Food Agr. Sci. 3 (1953) 149.
- [24] Landis Q., Redfern S.: Cereal Chem. 24 (1947) 157.
- [25] Landis Q.: Cereal Chem. 22 (1945) 1.
- [26] Redfern S., Landis Q.: Cereal Chem. 23 (1946) 1.
- [27] Redfern S.: Cereal Chem. 24 (1947) 259.
- [28] Okazaki H.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 24 (1950) 88.
- [29] Okazaki H.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 24 (1951) 201.
- [30] Okazaki H.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 25 (1951) 224.
- [31] Okazaki H.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 25 (1952) 317.
- [32] Okazaki H.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 25 (1952) 321.
- [33] Williams R. T. (editor): Biological Transformations of Starch and cellulose. Biochemical Society Symposia 11 (1953).
- [34] Whelan W. J., Nasr H.: Biochem. J. 48 (1951) 416.
- [35] Van Lanen J. M., Le Mense E. H.: J. Bact. 51 (1946) 595.
- [36] Underkofler L. A. a sp.: Ind. Eng. Chem. 38 (1946) 980.
- [37] Tsuchiya H. M. a sp.: Cereal Chem. 27 (1950) 322.
- [38] Stark E., Tetrault P. A.: Canad. J. Bot. 29 (1951) 91.
- [39] Stark E., Tetrault P. A.: Canad. J. Bot. 29 (1951) 104.
- [40] Sova V.: Prům. potravin 4 (1953) 151.
- [41] Sova V.: Prům. potravin 2 (1951) 458.
- [42] Sova V.: Prům. výživy 1 (1950) 261.
- [43] Smith N. G., Stocker C.: Arch. Biochem. 21 (1949) 95.
- [44] Simonart P., Yü Chow K.: Enzymologia 14 (1951) 356.
- [45] Scott D., Hedrick L. R.: J. Bact. 63 (1952) 795.
- [46] Roy D. K., Roy M. K.: Sci. and Culture (Indie) 18 (1953) 339.
- [47] Roberts M. a sp.: India Eng. Chem. 36 (1944) 811.
- [48] Redfern S.: Wallers. Lab. Comm. 13 (1950) 89.
- [49] Rau R. S. J. a sp.: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 37 (1948) 513.
- [50] Peltier G. L., Beckord L. D.: J. Bact. 50 (1945) 711.
- [51] Peat S.: Adv. Enzymol. 11 (1951) 339.
- [52] Pan S. C., Andreasen A. A., Kolachov P.: Arch. Biochem. 30 (1951) 6.
- [53] Pan S. C., Andreasen A. A., Kolachov P.: Ind. Eng. Chem. 47 (1950) 1783.
- [54] Oda M. a sp.: J. Ferm. Technol. Japan 30 (1952) 120.
- [55] Meyer K. H. a sp.: Experientia 3 (1947) 411.
- [56] Lulla B. S.: Bioch. Biophys. Acta 7 (1951) 244.
- [57] Le Mense a sp.: J. Bact. 54 (1947) 149.
- [58] Klimovskij D. M., Rodzevič V. Z.: Mikrobiologija 19 (1950) 60.
- [59] Klimovskij D. M., Rodzevič V. Z.: Biochimija 1 (1949) 26.
- [60] Kleinzeiler A., Lacko L.: Chem. listy 46 (1952) 679.
- [61] Imšeneckij A. A., Perova K. Z.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 81 (1952) 685.
- [62] Imšeneckij A. A., Perova K. Z.: Mikrobiologija 22 (1953) 133.
- [63] Hultin A.: Acta Chem. Scand. 1 (1947) 1.
- [64] Hultin A.: Acta Chem. Scand. 3 (1949) 886.
- [65] Hobson a sp.: J. Chem. Soc. (Brit.) (1951) 1451.
- [66] Hao L. Ch., Fulmer E. J., Underkofler L. A.: Ind. Eng. Chem. 35 (1943) 814.
- [67] Hao L. Ch., Jump I. A.: Ind. Eng. Chem. 37 (1945) 521.
- [68] Gupta H. N.: J. Ind. Chem. Soc. 9 (1946) 124.
- [69] Goodman J. J.: Science 112 (1950) 176.
- [70] Giri K. V. a sp.: Naturwiss. 40 (1953) 484.
- [71] Giri K. V. a sp.: Nature 167 (1951) 859.
- [72] Feniksova R. V. a sp.: Mikrobiologija 22 (1953) 145.
- [73] Feniksova R. V.: Mikrobiologija 22 (1953) 28.
- [74] Feniksova R. V., Segal R. B.: Mikrobiologija 10 (1941) 873.
- [75] Feniksova R. V., Dvadcatova E. A.: Izv. Akad. Nauk SSSR 2 (1952) 56.
- [76] Erb N. M. a sp.: J. Bact. 55 (1948) 813.
- [77] Drews B. a sp.: Bioch. Zeitschr. 322 (1952) 1952.
- [78] Daniels H. S., Stahly G. L.: J. Bact. 52 (1946) 351.
- [79] Corman J., Langlykke A. F.: Cereal Chem. 25 (1948) 687.
- [80] Carroll B., Van Dyke J. W.: Science 116 (1952) 168.
- [81] Bordin A., Effront J.: U. S. Pat. 1,227,525 (1917).
- [82] Balanchura B. a sp.: J. Bact. 52 (1946) 594.
- [83] Asai T., Minoda Y.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 26 (1952) 190.
- [84] Asai T. a sp.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 26 (1952) 173.
- [85] Asai T. a sp.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 25 (1952) 352.
- [86] Adams S. L. a sp.: Ind. Eng. Chem. 39 (1947) 1615.
- [87] Smythe C. V. a sp.: U. S. Pat. 2,530,210 (1950).
- [88] Hoogerheide J. C., Laughery E. G.: U. S. Pat. 2,549,465 (1951).
- [89] Corman J.: U. S. Pat. 2,577,078 (1951).
- [90] Jeffreys G. A.: U. S. Pat. 2,505,360 (1950).
- [91] Ohki S., Okano K.: Jap. pat. 176,676 (1948).
- [92] Corman J., Tsuchiya H. M.: Cereal Chem. 28 (1951) 280.
- [93] Shu P., Blackwood A. C.: Can. J. Bot. 29 (1951) 113.
- [94] Hildebrandt F. M., Erb N. M.: U. S. Pat. 2,556,084 (1951).
- [95] Macek K.: Chem. listy 48 (1954) 1181.
- [96] Gillespie J. M. a sp.: Nature 169 (1952) 487.
- [97] Schlüssel H. a sp.: Bioch. Zeitschr. 322 (1951) 226.
- [98] Shu P.: Canad. J. Bot. 30 (1952) 331.
- [99] Smythe C. V., Neubeck C. E.: U. S. Pat. 2,599,532 (1952).
- [100] Pence J. W.: Agr. Food Chem. 1 (1953) 1517.
- [101] Reed G.: Trans. Am. Assoc. Cereal Chemists 10 (1952) 21.
- [102] Underkofler L. A.: Cereal Chem. 24 (1947) 1.
- [103] Le Mense a sp.: Ind. Eng. Chem. 41 (1948) 100.
- [104] Jackson a sp.: Recent Advances in the Fermentation Industries 93 (1949).
- [105] Anonym.: Chem. Ind. Week 68 (3) (1950) 19.
- [106] Reindel F. a sp.: Branntweinwirtsch. 4 (1950) 179.
- [107] Lampe B.: Branntweinwirtsch. 4 (1950) 152.
- [108] Kawamura S.: J. Ferment. Assoc. Japan 7 (1949) 86.
- [109] Ono H., Misoni M.: J. Ferment. Assoc. Japan 7 (1949) 253.
- [110] Ohara J.: J. Ferment. Technol. Japan 26 (1948) 193.
- [111] Pool E. L., Underkofler L. A.: Agr. Food Chem. 1 (1953) 87.
- [112] Aiso K. a sp.: J. Ferm. Technol. Japan 30 (1952) 316.
- [113] Aiso K. a sp.: J. Ferm. Technol. Japan 30 (1952) 311.
- [114] Bacon J. S. D.: Biochem. J. 50 (1952) XVIII.
- [115] Green S. R., Stone J.: Wallerst. Labs. Commun. 15 (1952) 347.
- [116] Pan S. C.: a sp.: Anal. Chem. 25 (1953) 231.
- [117] French D.: Science 113 (1951) 352.
- [118] Bealing F. J.: Biochem. J. 55 (1953) 93.
- [119] Bealing F. J., Bacon J. S. D.: Biochem. J. 53 (1953) 277.
- [120] Bealing F. J., Bacon J. S. D.: Biochem. J. LXXV (1951) 49.
- [121] Pazur J. H.: J. Biol. Chem. 199 (1952) 217.
- [122] Pazur J. H., French D.: J. Biol. Chem. 196 (1952) 265.
- [123] Pfammüller J. Noë A.: Science 115 (1952) 240.
- [124] Wallenfels K., Bernt E.: Angew. Chemie 64 (1952) 28.
- [125] Barton-Wright E. C.: Proc. Europ. Brewery Conv. Nice 98 (1953).
- [126] Bacon J. S. D., Bell D. J.: J. Chem. Soc. (516) (1953) 2528.
- [127] Gross D. a sp.: J. Chem. Soc. (5032) (1954) 1727.
- [128] Montreuil J., Scriban R.: Bull. Soc. Chim. Biol. 34 (1952) 674.
- [129] Simpson F. J., McCoy E.: Appl. Microbiol. 1 (1953) 228.
- [130] Gray P. P.: Wallerst. Labos. Comm. 16 (1953) 215.
- [131] Jeffreys G. A.: Food Inds. 20 (1948) 219.
- [132] Pronin S. J.: Amilolitičeskíe fermenty i ich rol v piščevoj promyšlennosti. Moskva (1953).
- [133] Pazur J. H.: Science 117 (1953) 355.
- [134] Matsushima K.: J. Ferm. Technol. Japan 28 (1950) 90.
- [135] Matsushima K.: J. Ferm. Technol. Japan 28 (1950) 173.
- [136] Matsushima K.: J. Ferm. Technol. Japan 30 (1952) 111.
- [137] Mizuno T., Aoyama J.: Res. Repts. Nagoya Ind. Sci. Res. Inst. 5 (1952) 64.
- [138] Beesch S. C.: U. S. Pat. 2,641,568 (1953).
- [139] Gray P. P.: U. S. Pat. 2,665,215 (1954).
- [140] Brander C. W., Pagenstedt B.: Bakers Digest 27 (1953) 17.
- [141] Oda M., Yamagata K.: J. Ferm. Technol. Japan 32 (1954) 36.
- [142] Oda M., Yamagata K.: J. Ferm. Technol. Japan 31 (1953) 154.
- [143] Murota S. a sp.: J. Ferm. Technol. Japan 31 (1953) 179, 305, 392.
- [144] Murota S. a sp.: J. Ferm. Technol. Japan 32 (1954) 8.
- [145] Murphy D.: Can. J. Chem. 30 (1952) 872.
- [146] Stárka J.: Čs. biologie 3 (1954) 230—234.
- [147] Stárka J.: Preslia 27 (2) (1955).
- [148] Stárka J.: Preslia 25 (1953) 289.
- [149] Stárka J.: Prům. potravin 3 (1952) 488.
- [150] Burger M., Beran K.: Chem. listy 48 (1954) 1394.
- [151] Stárka J.: Universitas Carolina 1 (1) — biologica (1956).
- [152] Malcher J.: Referát na I. celost. konf. techn. mikrobiol., Praha (1954).
- [153] Macek K., Hais I. M.: Chromatografie. Praha (1954).
- [154] Campbell L. L. Jr.: Arch. Bioch. Biophys. 54 (1955) 154.
- [155] Calabi V.: Chem. Tbl. 2640 (1953).
- [156] Greup D. H., Hintzer H. M. R.: II. Int. Congr. Ferm. Inds., Knocke (1952) 232.
- [157] Greup D. H.: Wallerst. Labs. Comm. 17 (1954) 105.
- [158] Komarova L. I.: Mikrobiologija 24 (1955) 646.
- [159] Underkofler L. A.: Industrial Fermentation, vol. 2, N. York (1954).
- [160] Hanson A. M., Corman J.: Div. of Agric. and Food Chem., 126th Meeting ACS, N. York (1954) (ref. Ind. Eng. Chem. 47 [1955] 1857).
- [161] Sotničenko L. P.: Spirt. promyšlennost 39 (1955).
- [162] Malcher J.: nepublikované osobní sdělení (1956).