

KATARZYNA JANDA¹, KRZYSZTOF ULFIG²

BADANIA SKŁADU ILOŚCIOWEGO I JAKOŚCIOWEGO GRZYBÓW W SUSZACH ROŚLIN LECZNICZYCH

STUDY ON THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION
OF FUNGI IN DRIED MEDICINAL PLANTS

¹Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska

Akademia Rolnicza

71-434 Szczecin, ul. J. Słowackiego 17

e mail: kjanda@agro.ar.szczecin.pl

Kierownik: *prof. dr hab. A. Nowak*

²Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Politechnika Śląska

41-100 Gliwice, ul. Akademicka 2

Kierownik: *prof. dr hab. inż. K. Miksch*

Określono skład ilościowy i jakościowy grzybów w suszach wybranych roślin leczniczych. Badania obejmowały całkowitą populację grzybów oraz gatunki termofilne i termotolerancyjne. Udział grzybów termofilnych i termotolerancyjnych oraz drożdży w całkowitej populacji grzybów zależał od badanej próbki suszu. Znaczący udział w populacji grzybów w suszach miały gatunki kserofilne.

Słowa kluczowe: rośliny lecznicze, grzyby, zioła, termofilne i termotolerancyjne grzyby
Key words: medicinal plants, fungi, herbal plants, thermophilic and thermotolerant fungi

WSTĘP

Mikrobiologicznej jakości surowców i przetworów zielarskich poświęca się w naszym kraju i w świecie coraz więcej uwagi. Z powodu coraz powszechniejszego stosowania ziół w lecznictwie i profilaktyce, zanieczyszczenie ich suszów, w tym grzybami może stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi. Drobnoustroje mogą przyczyniać się również do pogorszenia jakości suszów.

W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest badań dotyczących zanieczyszczenia suszów roślin leczniczych grzybami. W większości prac izolowano z suszów grzyby mezofilne, które mogą być wytwarzać niebezpieczne dla zdrowia mikotoksyny [1, 3, 4, 7, 14, 22]. Zaledwie w kilku pracach scharakteryzowano całkowitą populację grzybów w suszach [2, 12, 15].

Niniejsze badania miały charakter wstępny. Celem ich było określenie składu ilościowego i jakościowego grzybów w suszach wybranych roślin leczniczych oraz wytyczenie kierunków dalszych badań.

MATERIAŁ I METODY

Próbki suszów roślin leczniczych zakupiono w ilości po 0,5 kg w jednym ze sklepów zielarskich w Szczecinie. Były to susze najczęściej kupowane przez klientów, a mianowicie: kwiat rumianku (*Flos Chamomillae*), liść mięty pieprzowej (*Folium Menthae piperitae*), liść melisy (*Folium Melissa*), ziele dziurawca (*Herba Hyperici*) oraz mieszanki ziołowe nr 1 (16 składników) i nr 2 (12 składników). Bezpośrednio po zakupie wykonano badania składu ilościowego i jakościowego grzybów w suszach. Badania te wykonano klasyczną metodą rozcieńczeń w fizjologicznym roztworze chlorku sodu i metodą płytek lanych. W pierwszym rozcieńczeniu 10-gramowe porcje suszów umieszczono w 500-ml kolbkach stożkowych zawierających po 90 ml jałowego 0,85%-owego roztworu chlorku sodu. Kolbki te intensywnie wytrząsano przez 30 minut, a następnie – po opadnięciu materiału roślinnego – z cieczy nadosadowej wykonano kolejne rozcieńczenia. Zastosowano rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-6} oraz dwie pożywki: DG18 i MEA. Pierwszą z nich – DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar) dostarczoną przez firmę Oxoid i zalecaną w badaniach suchych produktów żywnościowych [23], wykorzystano do oznaczania całkowitej populacji grzybów, zaś drugą – MEA (Malt Extract Agar), produkowaną przez firmę Merck – do oznaczania grzybów termofilnych i termotolerancyjnych. Do pożywek dodano chloramfenikol w ilości 100 mg/l. Posiewy z każdego rozcieńczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. Płytki z pożywką DG18 inkubowano w 25°C przez 10 dni, a płytki z pożywką MEA – w 45°C przez 5 dni. Czyste szczepy grzybowe oznaczano do gatunku na podstawie cech makro- i mikromorfologicznych, z wykorzystaniem wybranych pozycji piśmiennictwa taksonomicznego [5, 11, 18, 20, 24].

WYNIKI

Wyniki dotyczące liczby grzybów w suszach roślin leczniczych przedstawiono w tabeli I. Najwyższą całkowitą liczbę grzybów na pożywce DG18 w 25°C stwierdzono w suszu liści mięty pieprzowej ($7,8E+06$ jtk/g), a najniższą – w suszu kwiatu rumianku ($5,0E+03$ jtk/g). Liczba grzybów w pozostałych próbkach mieściła się w zakresie od $4,7E+04$ do $9,5E+04$

Tabela I. Liczba grzybów w suszach roślin leczniczych
The number of fungi in dried medicinal plants

Próby suszów ziołowych	Całkowita liczba grzybów [jtk/g]	Udział drożdży [%]	Liczba grzybów termofilnych [jtk/g]	Udział grzybów termofilnych [%]
Kwiat rumianku <i>Flos Chamomillae</i>	$5,0E+03$	<1	$3,5E+03$	70
Liść mięty pieprzowej <i>Folium Menthae piperitae</i>	$7,8E+06$	82,6	< $5,0E+02$	<1
Liść melisy <i>Folium Melissa</i>	$4,8E+04$	<1	< $5,0E+02$	<1
Ziele dziurawca <i>Herba Hyperici</i>	$4,7E+04$	<1	< $5,0E+02$	<1
Mieszanka ziołowa nr 1	$9,5E+04$	52,6	$5,0E+03$	5,3
Mieszanka ziołowa nr 2	$8,3E+04$	6,1	$1,5E+04$	18,2

jtł/g, a więc w tym samym rzędzie wielkości. W suszu liści mięty pieprzowej drożdże stanowiły aż 82,6% całkowitej populacji grzybów, a w mieszankach ziołowych nr 1 i 2 – odpowiednio 52,6 i 6,1%. Grzyby termofilne i termotolerancyjne (na pożywce MEA w 45°C) wykryto w suszu kwiatu rumianku, w którym stanowiły 70% całkowitej liczby grzybów,

Tabela II. Skład jakościowy grzybów w suszach roślin leczniczych (pożywka DG18 w 25°C)
The qualitative composition of fungi in dried medicinal plants (results obtained on DG18 at 25°C)

Gatunki grzybów	Kwiat rumianku <i>Flos Chamomillae</i>	Liść mięty pieprzowej <i>Folium Menthae piperitae</i>	Liść melisy <i>Folium Melissa</i>	Ziele dziurawca <i>Herba Hyperici</i>	Mieszanka ziołowa nr 1	Mieszanka ziołowa nr 2
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc & Trott ²	-	-	-	-	-	+
<i>Aspergillus flavus</i> Link:Fr. ²	-	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus niger</i> v. Thegh. ¹	-	-	-	-	+++	+++
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi ¹	-	-	+++	-	-	-
Białe drożdże	-	++	-	-	+++	++
<i>Eurotium amstelodami</i> Mangin	-	++	++	+++	++	+++
<i>Eurotium herbariorum</i> (Wiggers) Link ¹	-	-	-	++	++	-
<i>Eurotium rubrum</i> Kong, Spickermann & Bremer	-	-	++	-	-	-
<i>Mycelia sterilia</i> (pomarańczowa)	-	++	-	-	-	-
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel ¹	-	-	+	-	+	-
<i>Rhizopus microsporus</i> v. Tiegh. Var. <i>rhizopodiformis</i> Cohn ²	++	++	-	+	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Pristen Geerling ¹	+	-	-	+	+	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.:Fr) Vuill. ¹	-	-	-	-	-	+
Różowe drożdże	-	+++	-	-	-	-
<i>Wallemia sebi</i> (Fr.) v. Arx ¹	-	-	+	-	-	-
Liczba gatunków	2	5	5	4	6	5

¹ – BioSafety Level 1

² – BioSafety Level 2

+ – występowanie sporadyczne

++ – występowanie w średniej liczbie

+++ – występowanie w dużej liczbie

oraz w mieszankach ziołowych 1 i 2, w których stanowiły odpowiednio 5,3 i 18,2% całkowitej populacji grzybów. W pozostałych próbkach zastosowaną metodą i z wykorzystaniem pożywki MEA grzybów tych nie wykryto.

Skład jakościowy całkowitej populacji grzybów w badanych suszach na pożywce DG18 w 25°C przedstawiono w tabeli II. Zidentyfikowano łącznie ponad 15 gatunków grzybów. Tylko dwa gatunki – *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* i *Rhizopus oryzae* – wyodrębniono z suszu kwiatu rumianku. W pozostałych próbkach liczba gatunków mieściła się w zakresie od czterech do sześciu. Z wyjątkiem suszu kwiatu rumianku, *Eurotium amstelodami* występował w badanych suszach w dużej lub średniej liczbie. W suszu liści mięty pieprzowej dominowały drożdże o różowej barwie kolonii, w mniejszej liczbie występowały *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *Mycelia sterilia* o pomarańczowej barwie grzybni i drożdże o białej barwie kolonii. W suszu liści melisy dominował *Aspergillus versicolor*, w średniej liczbie występowały gatunki kserofilne, wspomniane już *Eurotium amstelodami*, jak również *E. rubrum* i *Wallemia sebi*. W suszu ziela dziurawca dominował *Eurotium amstelodami*, w mniejszej liczbie występował *E. herbariorum*, a inne gatunki izolowano z tej próby sporadycznie. Mieszanka ziołowa nr 1 była najbogatsza pod względem liczby gatunków. W mieszance tej dominował *Aspergillus niger* i drożdże o białej barwie kolonii, w mniejszej liczbie występowały grzyby z rodzaju *Eurotium*. Z wyjątkiem nieobecności *Eurotium herbariorum*, skład gatunkowy grzybów w mieszance ziołowej nr 2 był zbliżony do składu grzybów w mieszance ziołowej nr 1.

Tabela III. Skład jakościowy grzybów termofilnych i termotolerancyjnych w suszach roślin leczniczych (wyniki dla pożywki MEA w 45°C)

The qualitative composition of thermophilic and thermotolerant fungi in dried medicinal plants (results obtained on MEA at 45°C)

Gatunki grzybów	Kwiat rumianku <i>Flos Chamomillae</i>	Liść mięty pieprzowej <i>Folium Menthae piperitae</i>	Liść melisy <i>Folium Melissa</i>	Ziele dziurawca <i>Herba Hyperici</i>	Mieszanka ziołowa nr 1	Mieszanka ziołowa nr 2
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc & Trott ²	-	-	-	-	-	++
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	-	-	-	-	++	+++
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper ²	-	-	-	-	++	+
<i>Rhizopus microsporus</i> v. Tiegh. var. <i>rhizopodiformis</i> Cohn ²	++	-	-	-	-	-
Liczba gatunków	1	0	0	0	2	3

¹ – BioSafety Level 1

² – BioSafety Level 2

+ – występowanie sporadyczne

++ – występowanie w średniej liczbie

+++ – występowanie w dużej liczbie

Skład jakościowy grzybów termofilnych i termotolerancyjnych w badanych suszach (na MEA w 45°C) przedstawiono w tabeli III. Zidentyfikowano łącznie cztery gatunki tych grzybów. Grzybów termofilnych i termotolerancyjnych nie stwierdzono w suszach liści mięty pieprzowej, liści melisy i ziela dziurawca. W suszu kwiatu rumianku w średniej liczbie występował *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. W mieszance ziołowej nr 1 w umiarkowanych ilościach występowały *Aspergillus fumigatus* i *Rhizomucor pusillus*. Z kolei w mieszance ziołowej nr 2 dominował *Aspergillus fumigatus*, mniej licznie występowały *Absidia corymbifera* i *Rhizomucor pusillus*.

DYSKUSJA

W opracowaniu European Herbal Infusion Association [8] podano m.in. zalecaną, dopuszczalną liczbę pleśni i drożdży w ziołach przeznaczonych do parzenia. Dla obu grup grzybów wartość ta wynosi 1×10^6 w gramie suszu. W niniejszej pracy w suszu liści mięty pieprzowej stwierdzono przekroczenie powyższej wartości. Należy jednak zaznaczyć, że większość (82,6%) wyizolowanych grzybów stanowiły drożdże, które są elementem naturalnej mykoflory suszu mięty pieprzowej i z tego powodu – według autorów powyższego opracowania – nie podlegają ilościowej ocenie. Opracowanie EHIA nie odnosi się jednak do składu gatunkowego grzybów w ziołach.

Skład gatunkowy grzybów zależał od badanej próby suszu. Z suszów wyizolowano gatunki kserofilne, tj. *Eurotium amstelodami*, *E. herbariorum*, *E. rubrum* i *Wallemia sebi*, przy czym *E. amstelodami* należał do gatunków dominujących. Wśród gatunków termofilnych i termotolerancyjnych przeważały *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* i *Aspergillus fumigatus*. Liczne były również drożdże o różowej i białej barwie kolonii. Z wyjątkiem *Aspergillus niger*, gatunki mezofilne i toksynotwórcze występowały w suszach nieznacznie. Kilka szczepów *Aspergillus flavus*, potencjalnego producenta aflatoksyn, wyizolowano z mieszanki ziołowej nr 1. Z kolei *Aspergillus versicolor*, potencjalny producent sterigmatocystyny [23], dominował w suszu liści melisy. Należy jednak podkreślić, że grzyby z rodzaju *Rhizopus* mają również zdolność do produkcji mykotoksyn, tj. związków podobnych w strukturze do aflatoksyn, alkaloidów ergotowych i rizoniny [16, 17, 21], w związku, z czym mogą także stanowić potencjalne zagrożenie dla konsumentów ziół. W porównaniu z pozostałymi próbami mykoflora kwiatu rumianku była znacznie mniej zróżnicowana pod względem gatunkowym. Można przypuszczać, że było to spowodowane silną przeciwgrzybową aktywnością związków czynnych obecnych w tym surowcu. Na silną aktywność przeciwgrzybową olejków eterycznych zwrócił uwagę m.in. *Abou-Arab* i wsp. [2]. Skład gatunkowy badanych suszów wykazywał wiele podobieństw w stosunku do składów suszów przebadanych w Egipcie i Portugalii [2, 3, 15]. W próbkach badanych w niniejszej pracy, za wyjątkiem *Aspergillus niger* i *A. fumigatus*, rodzaj *Aspergillus* był jednak stosunkowo skromnie reprezentowany, zaś grzyby z rodzaju *Penicillium* były nieobecne. Mała liczba gatunków i szczepów *Aspergillus* może być wyjaśniona warunkami klimatu umiarkowanego, panującego w naszym kraju., jednakże trudno jest w ten sposób wyjaśnić nieobecność w suszach grzybów z rodzaju *Penicillium*.

Gatunki dominujące w suszach wytwarzają wiele enzymów, m.in. lipazy, proteazy, amylazy, glukoamylazy, celulazy i inne [13, 19, 25]. Potwierdza to hipotezę, że grzyby mogą utylizować związki organiczne obecne w materiale roślinnym, w tym związki czynne, de-

terminujące właściwości lecznicze ziół [6]. Mogą zatem powodować obniżenie jakości suszów ziołowych. Należy jednak pamiętać, że szczepy izolowane z ziół mogą mieć również znaczenie z biotechnologicznego punktu widzenia jako źródło wysokowydajnych enzymów. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Jedną z wad metody rozcieńczeń jest to, że „gubi” wiele gatunków grzybów występujących w badanych próbkach w mniejszej liczbie. Widać to wyraźnie, porównując skład mykoflory suszów uzyskany powyższą metodą ze składem mykoflory uzyskanym metodą bezpośrednich posiewów [10]. Należy zatem wnosić, że w celu kompleksowego przebadania składu grzybów w suszach roślin leczniczych powinny być stosowane obie metody i kilka pożywek, włącznie z pożywką DG18.

Odrębnym problemem jest wyjaśnienie dominacji poszczególnych grup grzybów w suszach roślin leczniczych. Przewaga grzybów termofilnych i termotolerancyjnych w suszu kwiatu rumianku, w mniejszym stopniu – w mieszankach ziołowych ma przypuszczalnie związek z nieodpowiednimi warunkami przechowywania, tj. z samozagrzewaniem się materiału roślinnego wysoką temperaturą i wilgotnością. Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na skład grzybów jest tzw. aktywność wody a_w [23]. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono jednak żadnych danych na temat wpływu aktywności wody na wzrost i skład grzybów w suszach roślin leczniczych. Niniejsze badania dowiodły, że analizowane próbki suszów zasiedlały gatunki o różnych wymaganiach w stosunku do aktywności wody. Potwierdza to tezę o niewłaściwych i zmiennych warunkach przechowywania suszonych roślin leczniczych.

Wiele gatunków wyizolowanych z suszów znajduje się na liście grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka. [9]. Jest więc prawdopodobne, że konsumpcja spleśniałych ziół może stanowić potencjalne zagrożenie dla osób z uszkodzonym lub osłabionym systemem odpornościowym.

PODSUMOWANIE

Udział grzybów termofilnych i termotolerancyjnych oraz drożdży w całkowitej populacji grzybów zależał od badanej próby suszu. Znaczący udział w populacji grzybów w suszach miały gatunki kserofilne. Należy przebadać wyizolowane szczepy pod kątem produkcji enzymów, które mogłyby być wykorzystane w celach biotechnologicznych. Poprzez utylizację związków organicznych grzyby mogą powodować obniżenie jakości suszów ziołowych. W celu kompleksowego przebadania składu grzybów w suszach roślin leczniczych powinny być stosowane zarówno metoda posiewów bezpośrednich, jak i metoda rozcieńczeń oraz kilka pożywek, z DG18 włącznie. Należy określić wpływ aktywności wody na wzrost i aktywność grzybów w suszach roślin leczniczych. Rozpoczęte w toku niniejszej pracy badania powinny być kontynuowane celem określenia właściwości chorobotwórczych wyizolowanych szczepów oraz ich zdolności do produkcji mikotoksyn.

K. Janda, K. Ulfig

STUDY ON THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION
OF FUNGI IN DRIED MEDICINAL PLANTS

Summary

The quantitative and qualitative composition of fungi was determined in selected dried medicinal plants purchased in one of the herbal shops in Szczecin, Poland. The samples examined were as follows: chamomile (*Flos Chamomillae*), peppermint (*Folium Menthae piperitae*), lemon balm (*Folium Melissa*), St. John's wort (*Herba Hyperici*), and two herbal mixtures. The fungal composition depended on the specified sample. Xerophilic fungi, i.e. *Eurotium amstelodami*, *E. herbariorum*, *E. rubrum* and *Wallemia sebi* were isolated from dried medicinal plants. *E. amstelodami* was the predominating species. The prevailing thermophilic and thermotolerant species were *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* and *Aspergillus fumigatus*. Pink and white yeasts were also numerous in some samples. Except for *Aspergillus niger*, mesophilic and toxigenous species were found to occur infrequently in the samples. However, *Aspergillus versicolor* was found to occur abundantly in lemon balm.

PIŚMIENNICTWO

1. *Abeywickrama K., Bean G.A.*: Toxigenic *Aspergillus flavus* and aflatoxins in Sri Lankan medicinal material. *Mycopathologia* 1991, 113, 187-190.
2. *Abou-Arab A.A.K., Soliman Kawther M., El Tantawy M.E., Badeaa R.I., Khayria N.*: Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chemistry* 1999, 67, 357-363.
3. *Aziz N.H., Youssef Y.A., El-Fouly M.Z., Moussa L.A.*: Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1998, 39, 279-285.
4. *Chan K.*: Some aspects of toxic contaminations in herbal medicines. *Chemosphere* 2003, 52, 1361-1372.
5. *Domsch K.H., Gams W., Traute-Heidi A.*: Compendium of soil fungi. Academic Press, London-San Francisco, 1980.
6. *Duetz W.A., Bouwmeester H., van Beilen J.B., Withold B.*: Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 61, 269-277.
7. *Efuntoye M.S.*: Mycotoxins of fungal strains from stored herbal plants and mycotoxin contents of Nigerian crude herbal drugs. *Mycopathologia* 1999, 147, 43-48.
8. *European Herbal Infusion Association*: Guidelines for good agriculture and hygiene practices for raw materials used for herbal infusions. EHIA, Hamburg, 2002.
9. *Hoog de G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.*: Atlas of Clinical Fungi. 2nd Edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, Reus, 2000.
10. *Janda K., Ulfig K.*: A comparison of different media and temperatures for isolation of microscopic fungi from dried medicinal plants. *Akademia Rolnicza, Szczecin* (dane nieopublikowane), 2005.
11. *Klich M.A.*: Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2002.
12. *Lutomski J., Kędzia B.*: Mycoflora of crude drugs. Estimation of mould contamination and their toxicity. *Planta Medica. Journal of Medicinal Plant Research* 1980, 40, 212-217.
13. *Maheshwari R., Bharadwaj G., Bhat M.K.*: Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000, 64, 461-488.

14. *Markowska J., Libudzisz Z.*: Stan mikrobiologiczny surowców zielonych w Polsce. III Konferencja Naukowa, „Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych”. Materiały Konferencyjne, Łódź, 306-309, 2003.
15. *Martins H.M., Martins M.L., Dias M.I., Bernardo F.*: Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 68, 149-153.
16. *Pepeljnik S., Cvetnic Z.*: Aflatoxicogenicity of *Rhizopus nigricans* strains isolated from drug plants. *Acta Pharm.* 1998, 48, 139-144.
17. *Peraica M., Ralic B., Lucic A., Pavlovic M.*: Toxic effects of mycotoxins. *Bulletin of the World Health Organization*, September 1, 1999.
18. *Pitt J.I.*: The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 1979.
19. *Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V.*: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998, 62, 597-635.
20. *Raper K.B., Fennel K.D.*: The genus *Aspergillus*. Krieger Publishing Company, Huntington, New York, 1977.
21. *Ribes J.A., Vanover-Sams C.L., Baker D.J.*: Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13, 236-301.
22. *Roy A.K., Sinha K.K., Chourasia H.K.*: Aflatoxin contamination of some common drug plants. *Applied and Environmental Microbiology* 1988, 54, 842-843.
23. *Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O.*: Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004.
24. *Schipper M.A.A.*: A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. *Studies in Mycology*, no. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1984.
25. *Sharma R., Christy Y., Banerjee U.C.*: Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001, 19, 627-662.

Otrzymano. 2005.03.08