



Enzymy rozkładające α -(1 \rightarrow 3)-glukany. Część I – Źródła mikrobiologiczne, produkcja, właściwości, genetyka

Adrian Wiater, Małgorzata Pleszczyńska, Janusz Szczodrak
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

α -(1 \rightarrow 3)-Glucan-degrading enzymes.

Part I – Microbial sources, production, properties, genetics

Summary

This paper is the first review article concerning the investigations on α -(1 \rightarrow 3)-glucans and their enzymatic hydrolysis by specific α -(1 \rightarrow 3)-glucanases. Special attention is paid to microbial sources of these enzymes as well as intensification of their production in cultures, their purification and catalytic properties, and molecular structure of the genes encoding different fungal and bacterial α -(1 \rightarrow 3)-glucanases.

Key words:

α -(1 \rightarrow 3)-glucans, enzymatic hydrolysis, fungal and bacterial α -(1 \rightarrow 3)-glucanases, catalytic properties, structure of encoding genes.

Adres do korespondencji

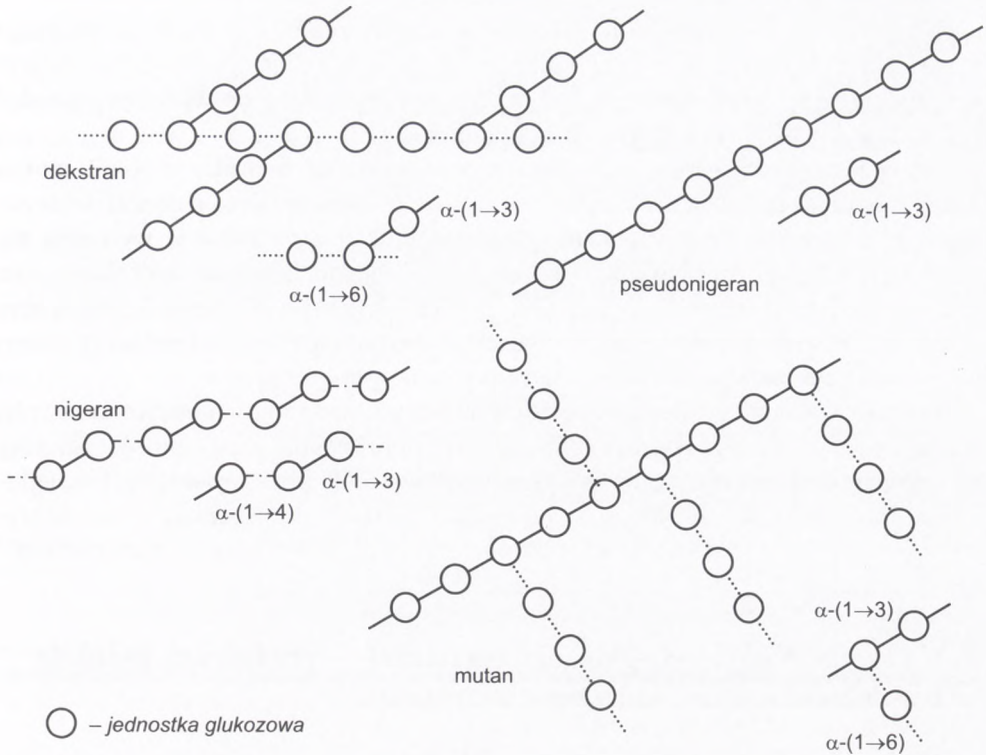
Adrian Wiater,
Zakład Mikrobiologii
Przemysłowej,
Instytut Mikrobiologii
i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin;
e-mail: adrianw2@wp.pl

biotechnologia

2 (73) 206–220 2006

1. Wprowadzenie

α -(1 \rightarrow 3)-Glukany są składnikami strukturalnymi ściany komórkowej większości grzybów. Mogą one spełniać funkcję podpowrą, stanowić materiał zapasowy lub być czynnikiem wirulencji u niektórych patogenów. Ich biosynteza zachodzi z udziałem glukozy i syntazy α -(1 \rightarrow 3)-glukanu. Grzybowe homoglukany występują najczęściej w formie nierozgałęzionego łańcucha, który posiada dość zróżnicowaną strukturę chemiczną. Można tutaj



Rys. Uproszczone wzory strukturalne wybranych glukanów.

wyróżnić polisacharydy składające się wyłącznie z glukozydów połączonych wiązaniami α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowymi, polimery zawierające dodatkowo różną liczbę reszt glukozydowych związanych wiązaniami α -(1 \rightarrow 4) oraz związki typu nigeranu, w których wiązania α -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 4)-glukozydowe występują naprzemiennie (rys.) (1,2).

Inną budowę posiadają α -(1 \rightarrow 3)-glukany tworzące zrąb płytki nazębnej. Ich synteza zachodzi przy udziale sacharozy i specyficznych glukozylotransferaz wytwarzanych w jamie ustnej przez próchnicotwórcze paciorkowce. Tego rodzaju biopolimery wykazują najczęściej strukturę silnie rozgałęzioną. Glukozy budujące ich łańcuch główny są połączone wiązaniami α -(1 \rightarrow 3), zaś w łańcuchach bocznych występują między cząsteczkami cukru wiązania typu α -(1 \rightarrow 6) (rys.). Proporcja obu rodzajów wiązań może być różna, przy czym niemal zawsze w glukanach pochodzenia paciorkowcowego przeważają wiązania α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowe. Sądzi się, że przewaga tych właśnie wiązań decyduje o nierozpuszczalności w wodzie próchnicotwórczych biopolimerów, co w połączeniu z dużą zmiennością budowy, wynikającą z różnego stosunku wiązań α -(1 \rightarrow 3) do α -(1 \rightarrow 6) w cząsteczkach, daje znaczną odporność tych polimerów na rozkład enzymatyczny. Na podstawie wyników licznych badań udowodniono, że α -(1 \rightarrow 3)-glukany paciorkowców zmiennych stanowią jeden z głów-

nych czynników wirulencji w etiopatologii próchnicy zębów u ludzi. Stąd też nazywane są one często mutanami dla podkreślenia głównej roli jaką w próchnicy odgrywa grupa *Streptococcus mutans*, której przedstawiciele należą do wydajnych producentów tych próchnicotwórczych biopolimerów (3-6).

Enzymy rozkładające α -(1 \rightarrow 3)-glukany to należące do hydrolaz α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy, przy czym te działające na paciorkowcowe mutany przyjęto nazywać mutanazami. W zależności od mechanizmu działania glukanaz na substrat wyróżnia się egzo- α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (E.C. 3.2.1.84, α -(1 \rightarrow 3)-D-glukan 3-glukanohydrolaza) oraz endo- α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (E.C. 3.2.1.59, 1 \rightarrow 3(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4)- α -D-glukan 3-glukanohydrolaza) (7,8). Należy podkreślić, że hydrolazy degradujące α -(1 \rightarrow 3)-glukany stanowią ważną, ale nadal stosunkowo mało poznaną grupę enzymów.

W pracy dokonano przeglądu badań wykonanych nad tą grupą enzymów, a w literaturze przedmiotowej stanowi ona pierwsze opracowanie tego typu. W części tej szczególnie uwagę zwrócono na mikrobiologiczne źródła pozyskiwania α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz, intensyfikację ich syntezy w hodowlach, metody oczyszczania i charakterystykę biochemiczną mutanaz oraz strukturę genów odpowiedzialnych za ich syntezę.

2. Wytwarzanie α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz (mutanaz) – producenci, indukcja i wydajność syntezy, oznaczanie aktywności

Mikroorganizmy zdolne do rozkładu α -(1 \rightarrow 3)-glukanów nie są zbyt szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Wynika to prawdopodobnie z ograniczeń w dostępie do substratu – mutany wytwarzane przez paciorkowce zmienne występują jedynie w płytce nazębnej. Z kolei polimery o podobnej budowie wchodzi w skład ściany komórkowej grzybów i dlatego organizmy wytwarzające α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (w tym również mutanazy) izolowano głównie z gleby.

Po raz pierwszy enzym hydrolizujący wiązania α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowe opisali w roku 1966 Hasegawa i wsp. (9). Został on wyizolowany z płynu po hodowli *Trichoderma viride* QM6a i *Penicillium funiculosum* na podłożu z dodatkiem pseudonigeranu otrzymanego ze ściany komórkowej *Aspergillus niger* (rys.). α -(1 \rightarrow 3)-Glukanaza z *T. viride* rozkładała zarówno nierozgałęzione glukany typu pseudonigeranu, zawierające głównie wiązania α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowe, jak również polisacharydy posiadające naprzemiennie ułożone wiązania α -(1 \rightarrow 3)- i α -(1 \rightarrow 4)-glukozydowe (mykodekstran, nigeran). Jednakże glukanaza otrzymana z tego samego grzyba, ale indukowanego mutanem, nie wykazywała zdolności do rozkładu tego biopolimeru (10) i pod tym względem różniła się zasadniczo od enzymu otrzymanego po hodowli szczepu *T. harzianum* OMZ 779 na mutanie jako źródle węgla, który hydrolizował ten glukan w całości (11).

W 1972 r. Reese i wsp. (12) przeprowadzili skrining ponad 250 mikroorganizmów w kierunku wytwarzania α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz. W jego wyniku wyselekcjonowano siedem szczepów o blisko 10-krotnie wyższej aktywności enzymatycznej w po-

równaniu z innymi znanymi wcześniej producentami mutanazy, tj. *T. viride* czy *T. harzianum*. Wśród izolantów najbardziej wydajnym i zarazem unikatowym źródłem enzymu był szczep *Cladosporium resinae* QM 7998. Wytwarzał on bowiem mutanazę w takich samych ilościach zarówno w hodowli na α -(1 \rightarrow 3)-glukanie jak i na skrobi czy glukozie.

Obecnie najważniejszym źródłem mutanaz są grzyby strzępkowe, w szczególności zaś gatunki należące do rodzaju *Trichoderma* (tab. 1). α -(1 \rightarrow 3)-Glukanazy stanowią u tych mikroorganizmów jeden ze składników przeciwgrzybowego kompleksu enzymatycznego, złożonego głównie z enzymów glukanolitycznych i chitynolitycznych. Wspólne działanie enzymów tego kompleksu prowadzi do rozkładu ścian komórkowych grzybów, m.in. patogenów roślin, dzięki czemu *Trichoderma* od dawna jest badana pod kątem zastosowania jako środek ochrony biologicznej w rolnictwie, a od kilku lat wchodzi w skład preparatów dostępnych na rynku.

Tabela 1

Organizmy wytwarzające α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy

Organizm	Gatunek	Literatura
1	2	3
grzyby nitkowane	<i>Trichoderma harzianum</i>	(11,13-17)
	<i>Trichoderma reesei</i>	(18)
	<i>Trichoderma viride</i>	(9,10,19,20)
	<i>Trichoderma asperellum</i>	(8)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	(21)
	<i>Cladosporium resinae</i>	(2,12,22)
	<i>Schizophyllum commune</i>	(23)
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	(15)
	<i>Penicillium funiculosum</i>	(9,12)
	<i>Penicillium vermiculatum</i>	(12)
	<i>Penicillium liliacinum</i>	(10)
	<i>Penicillium wortmanni</i>	(12)
	<i>Chloridium viride</i>	(12)
	<i>Dactylium dendroides</i>	(12)
	<i>Sepedonium ampullosporum</i>	(12)
<i>Sepedonium chlorinum</i>	(12)	
<i>Spicaria violacea</i>	(12)	
<i>Verticillium maltbousei</i>	(12)	
drożdże	<i>Cryptococcus albidus</i>	(24)
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	(24)
	<i>Endomyces tetrasperma</i>	(24)
bakterie	<i>Microbispora rosea</i>	(25,26)
	<i>Flavobacterium</i> sp.	(27)
	<i>Bacteroides oralis</i>	(28,29)
	<i>Paenibacillus curdolanolyticus</i>	(30)
	<i>Bacillus circulans</i>	(31,32)
	<i>Bacillus</i> sp.	(33-35)
<i>Pseudomonas</i> sp.	(36,37)	

promieniwce	<i>Streptomyces</i> sp.	(38,39)
	<i>Streptomyces warraensis</i>	(40)
	<i>Streptomyces chartreusis</i>	(41)

Obecność mutanazy stwierdzono też u *Aspergillus nidulans* (21). U tego organizmu α -(1→3)-glukan służy jako materiał zapasowy i jest gromadzony w ścianie komórkowej podczas wegetatywnej fazy wzrostu grzyba. W sytuacji niedoboru składników pokarmowych dochodzi do ekspresji genu odpowiedzialnego za syntezę mutanazy w specjalnych strukturach zwanych komórkami Hülle'a i wówczas enzym uruchamia własne zapasy energetyczne grzyba.

Niewielką aktywność mutanolityczną stwierdzono też u kilku gatunków drożdży (tab. 1), głównie z rodzajów *Cryptococcus*, *Rhodotorula* i *Endomyces*. U niektórych drożdży α -(1→3)-glukanazy biorą również udział w morfogenezie, a ściślej w procesie rozdzielania komórek, który jest końcowym etapem ich cyklu komórkowego. U *Schizosaccharomyces pombe* stwierdzono obecność dwóch mutanaz, Agn1p i Agn2p. Pierwsza z nich jest endoglukanazą i rozpuszcza, zbudowany głównie z α -(1→3)-glukanu, materiał otaczający przegrodę pomiędzy komórką macierzystą a potomną drożdży, umożliwiając wspólnie z endo- β -(1→3)-glukanazą (Eng1p) całkowite rozdzielanie się komórek (42).

Nasza wiedza na temat funkcji mutanaz bakteryjnych jest mniej obszerna. Prawdopodobnie są one zaangażowane w procesach odżywiania bakterii, a u niektórych przedstawicieli mogą być odpowiedzialne za ich pasożytnictwo. Większość bakteryjnych źródeł tych enzymów to organizmy glebowe, należące do rodzaju *Streptomyces*, *Bacillus*, *Flavobacterium* oraz *Pseudomonas* (tab. 1). Wyjątkiem są bakterie izolowane z jamy ustnej. W pojedynczych pracach donosi się o wytwarzaniu wewnątrzkomórkowej mutanazy przez beztlenowe bakterie *Bacteroides oralis*, u których enzym ten towarzyszy dwóm innym glukanazom hydrolizującym α -(1→6)-glukan.

U zdecydowanej większości mikroorganizmów mutanaza jest enzymem indukowanym obecnością glukanów zawierających w swojej strukturze wiązanie glukozydowe typu α -(1→3). W charakterze stymulatorów syntezy enzymu wykorzystuje się najczęściej bakteryjne α -(1→3)-glukany wytwarzane przez paciorkowce jamy ustnej (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* – mutant Mfe28). Można je zastosować zarówno w postaci natywnej jak i po obróbce enzymatycznej lub chemicznej (10,11,25,32,36,37,41). Hodowle drobnoustrojów prowadzi się także na podłożach z dodatkiem glukanów grzybowych, m.in. pseudonigeranu – nierozgałęzionego polimeru, w którym około 98% wiązań stanowią połączenia α -(1→3)-glukozydowe. Pozostałe 2% glukozy, połączonych wiązaniami α -(1→4), to prawdopodobnie ślady nigeranu (mykodekstranu), który towarzyszy pseudonigeranowi w ścianie komórkowej grzybów (43). Ponadto do indukcji syntezy α -(1→3)-glukanaz można wykorzystywać rozpuszczalne w alkaliach α -(1→3)-glukany izolowane ze ściany komórkowej *Polyporus tumulosus*, *Phytophthora infestans*, oraz z hymenoforu *Piptoporus*

betulinus (2,12). Do stymulacji syntezy α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz stosowano też całe autoklawowane komórki *S. pombe*, których duża skuteczność jako induktora sugeruje, że α -(1 \rightarrow 3)-glukan zlokalizowany jest w nich blisko powierzchni ściany komórkowej (31,44). Również Reese i wsp. (12), badając ponad 250 grzybów rozkładających α -(1 \rightarrow 3)-glukany stwierdzili, że większość z nich była zdolna do produkcji α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz jeśli jako induktor tych enzymów zastosowano grzybnię pochodzącą z takich rodzajów jak *Trichoderma*, *Dactylium*, *Sepedonium* i *Verticillium*.

Należy również wspomnieć o drobnoustrojach, które nie wymagają do wytwarzania α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz obecności w podłożu specyficznych stymulatorów, ponieważ synteza tych enzymów odbywa się u nich na drodze konstytutywnej. Należą tu *Flavobacterium* EK-14 (27) oraz *C. resinae* (2,12,22). Ten ostatni wytwarza dość znaczne ilości enzymu w podłożach zawierających glukozę, sacharozę, maltozę, mannitol i kwas glukuronowy jako główne źródła węgla i energii (12). Także synteza mutanazy przez *A. nidulans* nie wymagała dodatku induktora, co jednak wiąże się z tym, że α -(1 \rightarrow 3)-glukan wchodzi w skład ściany komórkowej tego grzyba (21). Opisano również wydzielanie grzybowej mutanazy przez *T. harzianum* OMZ 779 na podłożu z dodatkiem rafinozy, która jest, w przeciwieństwie do mutanu, rozpuszczalnym i łatwo dostępnym źródłem węgla (16). Warto zaznaczyć, że organizmy produkujące α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy w sposób konstytutywny wykazują znacznie wyższą aktywność specyficzną tych enzymów – np. 7,1 U/mg białka u *C. resinae* – w porównaniu do organizmów, które produkują je na drodze induktywnej, np. 0,73 U/mg białka u *T. viride*, 0,6 U/mg białka u *Streptomyces* sp. i 2,6 U/mg białka u *B. circulans* WL-12.

Mutanazy pochodzenia drobnoustrojowego to w przeważającej większości enzymy zewnątrzkomórkowe. Wyjątek stanowi szczep bakteryjny *B. oralis* Ig4a, u którego większość aktywności α -(1 \rightarrow 3)-glukanolitycznej (72-82%) zlokalizowana jest w cytoplazmie (29). Z kolei Meyer i Phaff (24) wykazali obecność α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz w ekstraktach ściany komórkowej drożdży *C. albidus*, *R. glutinis* i *R. minuta* var. *texensis*. Lokalizację enzymu w ścianie komórkowej drożdży z rodzaju *Cryptococcus* autorzy tłumaczą zawartością w niej α -(1 \rightarrow 3)-glukanów indukujących syntezę tego biokatalizatora. Wyjaśnienia tego nie można jednakże przyjąć dla pozostałych badanych drożdży, bowiem ich ściany nie zawierają tego typu polisacharydów.

Aktywność mutanolityczna uzyskiwana w kulturach grzybowych jest znacznie wyższa w porównaniu z tą jaką osiągają bakterie. Ponadto wydajność mutanazy otrzymywana w warunkach kultur wytrząsanych jest zazwyczaj większa niż w doświadczeniach, w których hodowlę grzybów prowadzono w fermentorze. Niemniej jednak Wiater i wsp. (14,18), po zoptymalizowaniu warunków hodowli wytrząsanych i fermentorowych różnych szczepów *T. harzianum*, osiągnęli po 2-5 dniach inkubacji aktywność mutanazy na poziomie 0,3-0,7 U/cm³ (2-2,5 U/mg białka). Z kolei otrzymanie odpowiednich mutantów ilościowych tego grzyba pozwoliło na prawie dwukrotne zwiększenie wydajności produkowanej przez niego aktywności mutanolitycznej (45). Dla porównania, Guggenheim i Haller (11), realizując produkcję enzymu w fermentorze na bazie kultury *T. harzianum* OMZ 779, otrzymali po około

7 dniach inkubacji aktywność mutanolityczną rzędu $0,08 \text{ U/cm}^3$, podczas gdy w kulturach wytrząsanych po 5 dniach hodowli wynosiła ona $0,16 \text{ U/cm}^3$. Również Quivey i Kriger (16) używając tego samego szczepu grzyba osiągnęli po 4-dniowej hodowli wytrząsanej aktywność specyficzną mutanazy na poziomie $0,37 \text{ U/mg}$ białka.

W kulturach bakteryjnych wysoką aktywność mutanazy – $0,2 \text{ U/cm}^3$ – odnotowano podczas 36-godzinnej hodowli wytrząsanej szczepu *P. curdlanolyticus* MP-1 (30). W podobnych warunkach hodowli aktywność mutanolityczna dla szczepu *B. circulans* HU-M1 wynosiła $0,17 \text{ U/cm}^3$ (32), zaś po dwóch dniach inkubacji *Streptomyces* sp. KI-8 uzyskano wydajność enzymu wynoszącą $0,16 \text{ U/cm}^3$ (38,39). Poziom aktywności mutanazy otrzymany w hodowlach innych bakterii był od 5 do 50 razy niższy w stosunku do podanych wartości (27,40,41).

Należy jednak podkreślić, że porównywanie aktywności mutanazy pochodzącej nawet z tego samego źródła jest niekiedy trudne i może być obarczone dużym ryzykiem błędu. Głównym tego powodem jest wykorzystywanie do oznaczania aktywności enzymu, podobnie jak do indukcji, różnych substratów. Najczęściej jest to nierozgałęziony α -(1→3)-glukan z *A. niger* (98% wiązań α -(1→3), pseudonigeran), α -(1→3)-glukan z *Pleurotus ostreatus* (1) oraz z *A. nidulans* (21), natywny mutan syntetyzowany przez *S. sobrinus* OMZ 176 (wiązania α -(1→3) – 59,1%; α -(1→6) – 24,4%) (18) oraz mutan otrzymany z mutantu *S. sobrinus* Mfe28 (wiązania α -(1→3) – 94,4%; α -(1→6) – 2,4%) (32). Używano także substratów modyfikowanych chemicznie i enzymatycznie, np. mutanu traktowanego dekstranazą (wiązania α -(1→3) – 79,8%; α -(1→6) – 20,2%) (14,30), a także przygotowanego w ten sam sposób, lecz dodatkowo barwionego barwnikiem Cibacron blue (92-94% wiązań α -(1→3)) (36,37,46). Czasami, z uwagi na nierozpuszczalność natywnego mutanu, stosowano karboksymetylo- α -(1→3)-glukan (rozpuszczalna w wodzie forma α -(1→3)-glukanu z *A. niger*) lub α -(1→3)-glukan w postaci koloidu (24). Różnorodność substratów używanych do pomiaru aktywności mutanolitycznej wynika z dążenia do zapewnienia wysokiej specyficzności analiz oraz z braku na rynku standaryzowanych preparatów α -(1→3)-glukanów. Skutkiem ubocznym ich stosowania jest jednak utrudniona interpretacja wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach, dlatego też, na przykład aktywność mutanazy z *T. viride* QM6a, oznaczona przez Reese'a i wsp. (12), była 3 do 4 razy wyższa od tej jaką uzyskano w warunkach określonych przez Hasegawę (19). Z kolei Meyer i Phaff (24) wykazali, że czas inkubacji niezbędny do osiągnięcia porównywalnych poziomów aktywności mutanazy zależy głównie od rodzaju substratu użytego w reakcji enzymatycznej. W przypadku półsyntetycznego karboksymetylo- α -(1→3)-glukanu czas ten jest od 1,5 do 2 razy dłuższy w stosunku do tego jaki jest potrzebny do uzyskania porównywalnej aktywności enzymu oznaczonej na nierozpuszczalnym w wodzie natywnym α -(1→3)-glukanie.

3. Oczyszczanie, właściwości biochemiczne i mechanizm działania mutanaz

Procedury oczyszczania α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz opisane w literaturze składają się z wielu etapów prowadzonych najczęściej przy wykorzystaniu różnych technik chromatografii kolumnowej. Jeden z najefektywniejszych i najszybszych sposobów pozyskiwania wysokooczyszczonego preparatu mutanazy z *T. harzianum* zaproponowali Wiater i wsp. (47). W wyniku 3-stopniowego rozdziału chromatograficznego enzym ten został oczyszczony 94-krotnie z odzyskiem aktywności na poziomie 74%, a w przeprowadzonej analizie chromatograficznej potwierdzono jego homogenność (tab. 2). Dla przykładu Guggenheim (10), stosując trzy kolejne procedury chromatograficzne, otrzymał zaledwie 2,2-krotnie oczyszczoną mutanazę z *P. liliacinum* z wydajnością rzędu 8,5%. Z kolei enzym izolowany z *T. harzianum* przez Guggenheima i Hallera (11) został oczyszczony 38 razy podczas czterostopniowego procesu oczyszczania, a jego odzysk wynosił 47%. Natomiast bakteryjną mutanazę z *Flavobacterium* oczyszczono 162 razy stosując cztery rozdziały chromatograficzne, a odzysk jej aktywności wyniósł 38% (27). Pięcioetapowa procedura oczyszczania mutanazy z *B. circulans* pozwoliła na uzyskanie wysokooczyszczonego enzymu (260 razy), ale jego wydajność wyniosła zaledwie 10% (32). Należy podkreślić, że oczyszczona do stanu homogenności w laboratorium Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS mutanaza ze szczepu *T. harzianum* F-470 (47) wykazywała również bardzo wysoki poziom aktywności specyficznej (108 U/mg białka). Był on około 30 razy wyższy w porównaniu z tym jaki osiągnął wysokooczyszczony enzym z *T. harzianum* OMZ 779 (11), ponad dwa razy większy w stosunku do tego jaki doniesiono dla mutanazy *T. viride* (19), 133 razy wyższy od aktywności specyficznej enzymu z *Flavobacterium* i 11 razy większy od mutanazy z *B. circulans* (32).

W ostatnich latach, obok klasycznych metod oczyszczania α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz, zaczęto wprowadzać również techniki wykorzystujące chromatografię powinowactwa. Odkrycie w strukturze mutanazy obecności C-końcowej domeny wiążącej α -(1 \rightarrow 3)-glukan wykorzystano do zastąpienia klasycznych nośników złożami wiążącymi selektywnie α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy. W charakterze nośników zastosowano różne α -(1 \rightarrow 3)-glukany, np. bakteryjne mutany ze *S. mutans* DSM 20381 i *S. mutans* CBS 350.71 lub grzybowy pseudonigeran (8,15,17).

W celu wyznaczenia masy cząsteczkowej mutanazy, oczyszczone i homogenne białko enzymatyczne jest poddawane elektroforezie w warunkach denaturujących (SDS/PAGE). Określona tym sposobem masa enzymu jest dla większości grzybów podobna i mieści się w przedziale 67-90 kDa (tab. 2). Natomiast określone podobną metodą masy cząsteczkowe mutanaz bakteryjnych są skrajnie różne i wahają się od 48 kDa dla enzymu oczyszczonego z *M. rosea* (25) poprzez 134 kDa w przypadku biokatalizatora z *B. circulans* WL-12 aż do 160 kDa dla mutanazy izolowanej ze szczepu *B. circulans* HU-M1.

Tabela 2

Charakterystyka właściwości biochemicznych wybranych α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz

Właściwości katalityczne	Źródło enzymu										
	<i>T. barzianum</i> CCM F-470 (18,47)	<i>T. barzianum</i> CECT 2413 (17)	<i>T. asperellum</i> CECT 20539 (8)	<i>T. vitride</i> QM6A (19)	<i>P. purpurogenum</i> CBS 238,95 (15)	<i>A. nidulans</i> (21)	<i>C. resinae</i> QM 7998 (22)	<i>B. circulans</i> HU-M1 (32)	<i>B. circulans</i> WL-12 (31)	<i>Pseudomonas</i> NRRL B-12324 (36,37)	<i>S. chartreusis</i> F2 (41)
optimum temperatury (°C)	40	55	45-55	50	50-55	50	47	50	—	56	55
optimum pH	5,5	5,0	5,0	4,5	3,0-4,5	5,5	4,5	6,9	7,5-8,5	5,0	5,5-6,0
M _m SDS/PAGE (kDa)	67	72	75	—	90	—	87	160	134	—	68
M _m filtracja żelowa (kDa)	274	67	132	47	—	36	88	180	—	67,4 i 279 ^a	300
stoperń oczyszczenia/ odzysk aktywności	94/73,3%	7/10%	—	63/30%	129/20%	—	15/40%	260/10%	5,8/48%	8,77%	6,4/27,3%
pI	7,1	7,5	6,1	—	3,9	—	3,2	—	—	4,6	—
K _m	1,2	1,5	0,8	4,6	0,1	1,6	—	—	0,43; 2,09 ^b	—	1,54
mechanizm działania	egzo	egzo	egzo	endo	—	egzo	egzo	endo	endo	endo	endo

a — monomer o masie 67,4 kDa, prawdopodobnie podjednostka tetrameru (279 kDa)

b — odpowiednio dla karboksymetylo- α -(1 \rightarrow 3)-glukanu i koloidalnego α -(1 \rightarrow 3)-glukanu

Zastosowanie przez wielu autorów metody sączenia molekularnego (filtracji żelowej) pozwoliło zdefiniować masę cząsteczkową natywnych mutanaz oraz określić strukturę czwartorzędową tych białek. Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że mutanazy z *T. harzianum* F-470 i *S. chartreusis* F2, posiadające masy cząsteczkowe rzędu 274 i 300 kDa, wykazują budowę tetrameryczną, natomiast enzym o masie 132 kDa z *T. asperellum* CECT 20539 jest strukturalnym dimerem.

Temperatury najbardziej sprzyjające katalitycznemu działaniu grzybowych i bakteryjnych mutanaz mieszczą się w przedziale od 40 do 55°C (tab. 2). Zdecydowana większość enzymów pochodzenia grzybowego wykazuje maksymalną aktywność w temperaturze około 50°C (11,19,21). Do wyjątków należy mutanaza z *T. harzianum* F-470, która najefektywniej działa w nieco niższej temperaturze, wynoszącej 40°C. Wśród mutanaz bakteryjnych znane są enzymy, których optimum aktywności wypada w temperaturze 40°C (25) oraz katalizatory zdolne do działania w temperaturach pomiędzy 50 a 60°C (32,41).

Prawie wszystkie dotychczas poznane grzybowe mutanazy zachowują najwyższą aktywność w kwaśnym odczynie środowiska, w zakresie pH od 4,5 do 5,5 (10,18). W niższym przedziale pH, wynoszącym od 3,5 do 4,5, działają jedynie niektóre rekombinowane enzymy pochodzenia grzybowego (15). Należy przy tym zaznaczyć, że większość opisanych mutanaz jest zupełnie nieefektywna w pH poniżej 2,0 oraz w pH 8,0 i powyżej tej wartości (18,19,22). Natomiast cechą charakterystyczną większości mutanaz bakteryjnych jest prowadzenie efektywnej hydrolizy mutanu w zbliżonym do obojętnego odczynie środowiska, obejmującym zakres wartości pH od 6,0 do 6,9 (27,32,40), a mutanaza z *Flavobacterium* zachowuje w pH 8,0 jeszcze znaczną część swojej maksymalnej aktywności (27). Odkryto również i takie glukonanazy bakteryjne, które najefektywniej hydrolizowały mutan w zakresie pH charakterystycznym dla mutanaz grzybowych. Przykładem są bakteryjne α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy pochodzące z *Bacillus* sp. (33-35) i *M. rosea* (25), których optimum aktywności hydrolytycznej przypadало w pH od 4,0 do 5,0.

Wykazano też znaczne różnice odnośnie do zakresu pH, w którym grzybowe i bakteryjne mutanazy wykazują najwyższą stabilność. Pierwsze z nich są najbardziej stabilne w pH od 5,0 do 7,0 (19,22). Z kolei bakteryjne α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy zachowują w czasie 24-godzinnej inkubacji swoją aktywność nawet w dość silnie alkalicznym środowisku. Jako przykład można podać enzym pochodzący z *B. circulans*, który wykazuje wysoką stabilność w zakresie pH od 6,0 do 11,0 (32) oraz stabilne w pH od 4 do 10 mutanazy syntetyzowane przez szczepy *Bacillus* sp. RM1, RM4 i M7 (33-35).

Mutanazy bakteryjne i grzybowe mogą hydrolizować łańcuch α -glukanu w różnych miejscach (tab. 2). Można wyróżnić dwa główne mechanizmy ataku tych enzymów na polisacharydy: uwalnianie mono- lub disacharydów z nieredukującego końca cząsteczki (enzymy egzolityczne) lub przypadkowy atak na wiązania glikozydowe występujące wewnątrz łańcucha polimeru (enzymy endolityczne). W pierwszym przypadku (typ działania egzo) tylko wiązania terminalne są podatne na rozkład hy-

drolityczny, natomiast w drugim (sposób działania endo) na atak enzymu są narażone w mniejszym lub większym stopniu wszystkie wiązania (19).

Większość grzybowych enzymów mutanolitycznych działa na substrat w sposób egzolityczny (tab. 2), jak np. α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy z *T. harzianum* CCM F-470, *T. harzianum* CECT 2413, *T. asperellum* CECT 20539 i *A. nidulans*. Nieliczne, jak mutanazy z *T. harzianum* OMZ 779 (11), *T. harzianum* (1) oraz *T. viride* (19), wykorzystują do degradacji substratu mechanizm endolityczny. Z kolei opisany przez Guggenheima (10) szczep *Penicillium* produkuje zarówno egzo- jak i endo- α -(1 \rightarrow 3)-glukanazę. Endolityczny mechanizm działania na substrat wykazują natomiast mutanazy bakteryjne pochodzące z *Flavobacterium* (27) i ze *Streptomyces* Kl-8 (38,39) oraz prawdopodobnie, co można wywnioskować pośrednio z danych opublikowanych przez autorów, z *B. circulans* (32).

Specyficzność substratowa mutanaz ogranicza się do hydrolizowania przez te enzymy wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych, przy czym jako substrat można wykorzystać różne polisacharydy. Mogą to być strukturalnie nierozgałęzione α -(1 \rightarrow 3)-glukany z *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus tumulosus*, *Phytophthora infestans* oraz glukan z hymenoforu *Piptoporus betulinus* (1,2,12). Należy również wspomnieć o α -glukanach posiadających wiązania mieszane, w których wiązanie α -(1 \rightarrow 3) jest jednym z wiązań (np. w izolichenianie) lub jest ułożone naprzemiennie z innymi wiązaniami, np. z α -(1 \rightarrow 4), jak w nigeranie. Innymi α -glukanami podatnymi na rozkład enzymatyczny są biopolimery zbudowane z ułożonych naprzemiennie 9-jednostkowych odcinków glukozy zawierających wiązania α -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 4). Przykładem tego typu polisacharydów jest glukan wyizolowany z owoców mango (48). Mutanazy hydrolizują również skutecznie silnie rozgałęzione α -glukany typu mutanów, w których łańcuchy główne posiadają wiązania (1 \rightarrow 3), a boczne (1 \rightarrow 6)-glukozydowe (49,50).

Istnieją również doniesienia z których wynika, że podczas wstępnych etapów oczyszczania mutanazy, aktywności α -(1 \rightarrow 3)-glukanazowej towarzyszy często aktywność w stosunku do wiązań typu β -(1 \rightarrow 3) (21,27,41). Jednak po zakończeniu procedury oczyszczania zdecydowana większość mutanaz odznaczała się aktywnością jedynie w stosunku do α -(1 \rightarrow 3)-glukanów i nie rozkładała sacharydów, w których reszty glukozy połączone były wiązaniami typu α -(1 \rightarrow 4), α -(1 \rightarrow 6) lub β -(1 \rightarrow 3) (17,22). Wyjątek stanowiły mutanazy I i II z *T. harzianum* OMZ 779 oraz enzym z *T. harzianum* CCM F-470, które nawet w końcowym stadium oczyszczenia zdolne były do hydrolizy wiązań typu β -(1 \rightarrow 3) (11,47).

Na podstawie badań nad specyficznością substratową mutanazy stwierdzono, że sama obecność wiązań α -(1 \rightarrow 3) w glukanie nie jest warunkiem wystarczającym do jej działania. Brak aktywności w stosunku do disacharydu nigerozy dowodzi, że do utworzenia aktywnego kompleksu enzym-substrat potrzebne jest występowanie po sobie, więcej jak czterech jednostek glukozy połączonych wiązaniem α -(1 \rightarrow 3) (19, 11,27). Warunku tego nie spełnia mutanaza z *C. resiniae*, która wydajnie degraduje również oligosacharydy z serii nigerooligosacharydów (22). Enzym nie wykazywał natomiast aktywności w stosunku do pojedynczych wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych

w nigerianie, izolichenianie, oraz wiązań występujących na końcu redukującym w 3³- α -D-glukozyloizomaltozynie i w łańcuchu bocznym 3³- α -D-glukozyloizomaltoheksozy z *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) (2).

4. Badania genetyczne nad mutanazami

Od czasu pojawienia się pierwszej wzmianki o mutanazie (9) opisano kilkanaście białek o takiej aktywności. Jednak do niedawna niewiele było wiadomo o budowie genów kodujących te enzymy. Dopiero w 2000 r. Fuglsang i wsp. (15) opublikowali podstawową pracę, w której opisali klonowanie grzybowych mutanaz, ich nadekspresję u *Aspergillus oryzae* oraz scharakteryzowali produkty tych genów pochodzących z dwóch grzybów, *T. harzianum* CBS 243.71 i *P. purpurogenum* CBS 238.95.

cDNA mutanazy z *T. harzianum* zawiera otwartą ramkę odczytu (orf) złożoną z 1905 par zasad, rozpoczynającą się kodonem startowym ATC przy nukleotydzie 29 i kończącą się kodonem terminalnym TAG przy nukleotydzie 1931. Kodon inicjacyjny poprzedzony jest niekodującą sekwencją o długości 28 par zasad, region taki (119 par zasad) oraz łańcuch poli(A) znajduje się też za kodonem TAG. Orf koduje polipeptyd o długości 634 aminokwasów, zawierający peptyd sygnałowy i propeptyd.

Drugi badany enzym ma homologiczną do mutanazy z *T. harzianum* strukturę pierwszorzędową. Identyczność sekwencji dojrzałych polipeptydów wynosi 53%. Obie glukazy zbudowane są z dwóch domen, N-końcowej domeny katalitycznej i C-końcowej domeny wiążącej glukan, oddzielonych peptydem łączącym, bogatym w prolinę, serynę i treoninę. Podobną budowę ma wiele hydrolaz glikozydowych, jednak poszukiwanie homologii wydedukowanej sekwencji aminokwasowej obu mutanaz z innymi α -glukanazami nie dało pozytywnych rezultatów. Wykazano jedynie pewne podobieństwo sekwencji pomiędzy domeną katalityczną a dwoma polipeptydami o nie znanej wówczas funkcji, pochodzącymi z *S. pombe*. Nie znaleziono natomiast żadnej sekwencji homologicznej w stosunku do domeny wiążącej glukan.

Określenie sekwencji aminokwasowych dwóch różnych mutanaz oraz jednocześnie wykazanie braku homologii tych sekwencji ze znanymi glikozydazami pozwoliło badaczom na zdefiniowanie nowej, siedemdziesiątej pierwszej, rodziny hydrolaz glikozydowych. Do tej rodziny mogą być zaliczone kolejne sklonowane i zsekwencjonowane mutanazy, nazwane Agn13.1 i Agn13.2, pochodzące z *T. harzianum* CECT 2431 (17) i *T. asperellum* CETC 20539 (8). Sekwencja nukleotydowa pełnego cDNA genu *agn13.1* okazała się prawie identyczna z sekwencją genu z *T. harzianum* badanego przez Fuglsanga. W przypadku Agn13.2 podobieństwo sekwencji wynosiło również aż 77%.

W badaniach ekspresji genów mutanazy na poziomie transkrypcji wykazano, że mutanazy pochodzące z *Trichoderma* biorą udział w antagonistycznym działaniu tych drobnoustrojów w stosunku do innych grzybów.

Wspomniane wcześniej dwa polipeptydy, Agn1p i Agn2p, wyizolowane z *S. pombe* wykazywały, odpowiednio, 41 i 34% identyczności sekwencji aminokwasowej w stosunku do domeny katalitycznej mutanazy *T. harzianum*, co mogło sugerować, że pełnią podobną funkcję. Orf genu *agn1p* koduje polipeptyd o długości 424 aminokwasów i masie kalkulowanej na 46,9 kDa. Zawiera on 22 aminokwasowy peptyd sygnałowy, którego brak w drugim polipeptydzie Agn2p o długości 433 aminokwasów i masie 48 kDa. Oba białka wykazują 39% identyczności sekwencji. Geny *agn1p* i *agn2p* są zatem genami paralogicznymi. W analizie specyficzności substratowej Agn1p i Agn2p wykazano, że oba enzymy są endo- α -(1 \rightarrow 3)-glukanazami. Jednak pełnią one w komórce odmienne funkcje. Agn1p bierze udział w podziale wegetatywnym komórek. Natomiast Agn2p odgrywa rolę w endolizie ścian worka, podczas której uwalniane są askospory drożdży (42).

Charakterystykę molekularną jeszcze innej mutanazy przedstawili Wei i wsp. (51). Sporządzili oni bibliotekę cDNA *Aspergillus nidulans* w celu identyfikacji genów ulegających ekspresji podczas rozwoju płciowego tego grzyba. Jeden z badanych klonów wykazywał homologię do grzybowych mutanaz. Gen *mutA* koduje białko zbudowane z 431 aminokwasów o masie 48 kDa. Ma ono charakter hydrofilowy, a jego pI wynosi 4,6. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej do mutanaz z *P. purpurogenum*, *T. harzianum*, *N. crassa* i *S. pombe* sięga od 24 do 42%. MutA nie zawiera domeny wiążącej glukan. Jego rola w komórce jest również odmienna – polega na uruchamianiu na potrzeby rozwoju płciowego grzyba rezerwy energetycznej zgromadzonej w postaci α -(1 \rightarrow 3)-glukanu podczas wegetatywnej fazy wzrostu.

W porównaniu z mutanazami grzybowymi, nasza wiedza o genetyce molekularnej glukanaz bakteryjnych jest znikoma. Znana jest obecnie tylko jedna pełna sekwencja nukleotydowa genu kodującego mutanazę u *Bacillus* sp. (52). Ostatnio określono N-końcową sekwencję aminokwasową enzymu izolowanego z innego przedstawiciela tego rodzaju – *B. circulans* KA-304 (53). Stwierdzono przy tym, że homologia obu sekwencji wynosi 88%.

5. Podsumowanie

W pierwszej części artykułu przedstawiono aktualny stan badań nad enzymami hydrolizującymi α -(1 \rightarrow 3)-glukany.

Źródłem tych enzymów są głównie grzyby strzępkowe i bakterie. Mutanazy grzybowe, pochodzące przede wszystkim z *Trichoderma* zostały oczyszczone i dobrze scharakteryzowane. Poznano także budowę kodujących je genów. Enzymy bakteryjne są słabiej poznane, choć mogłyby mieć duże znaczenie aplikacyjne ze względu na zdolność do szybkiego upłynniania nierozpuszczalnego mutanu w warunkach panujących w jamie ustnej (temperatura 37°C i odczyn zbliżony do obojętnego).

Badania nad mutanazami prowadzone są również w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w Lublinie. Dotychczas w ich wyniku otrzymano i przebadano

preparat grzybowej mutanazy, charakteryzujący się jedną z najwyższych opisanych w literaturze aktywności mutanolitycznych. Wyizolowano też z gleby bakterie *P. curdlanolyticus*, które stanowią nowe źródło α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (54). Obecnie trwają intensywne prace nad otrzymaniem preparatu mutanolitycznego, który można byłoby zastosować w dentystyce w celu zapobiegania próchnicy zębów. Wyniki tych badań przedstawiono w drugiej części opracowania.

Literatura

1. Grün C. H., (2003), *Structure and biosynthesis of fungal α -glucans*, Ed. Grün C. H., Utrecht University, the Netherlands, 9-33.
2. Walker G. J., Hare M. D., (1977), *Carbohydr. Res.*, 58, 415-432.
3. Wiater A., Choma A., Szczodrak J., (1999), *J. Basic Microbiol.*, 39, 265-273.
4. Wiater A., Szczodrak J., (2003), *Biotechnologia*, 3 (62), 193-206.
5. Wiater A., Próchniak K., Szczodrak J., Pleszczyńska M., (2005), *Euroconference on the Interactions Between Innate and Adaptive Immunity in Mammalian Defense Against Bacterial Infections*, Joachimsthal, Brandenburg, Germany, Abstract Book, 35-36.
6. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., (2005), *Acta Biol. Hung.*, 56, 137-150.
7. Wiater A., Pleszczyńska M., Szczodrak J., Bachanek T., (2005), *Dent. Med. Probl.*, 42, 241-247.
8. Sanz L., Montero M., Redondo J., Llobell A., Monte E., (2005), *FEBS*, 272, 1-7.
9. Hasegawa S., Kirkwood S., Nordin J. H., (1966), *Chem. Ind. (London)*, 1033.
10. Guggenheim B., (1970), *Helv. Odont. Acta*, 14, 89-108.
11. Guggenheim B., Haller R., (1972), *J. Dent. Res.*, 51, 394-402.
12. Reese E. T., Maguire A., Parrish F. W., (1972), *Ferment. Technol. Today*, 735-742.
13. Wiater A., Szczodrak J., (2001), *Biotechnol. Lett.*, 23, 427-431.
14. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., Próchniak K., (2005), *Braz. J. Microbiol.*, 36, 137-146.
15. Fuglsang C. C., Berka R. M., Wahleithner J. A., Kauppinen S., Shauster J. R., Rasmussen G., Halkier T., Dalbøge H., Hanrissat B., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 2009-2018.
16. Quivey R. G., Kriger P. S., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 112, 307-312.
17. Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., de la Cruz J., Monte E., Llobell A., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5833-5839.
18. Wiater A., Szczodrak J., (2002), *Acta Biol. Hung.*, 53, 389-401.
19. Hasegawa S., Nordin J. H., Kirkwood S., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 5460-5470.
20. Tsunoda A., Nagaki T., Sakano Y., Kobayashi T., (1977), *Agric. Biol. Chem.*, 41, 939-943.
21. Zonneveld B. J. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 273, 174-187.
22. Tsunoda A., Sakano Y., Kobayashi T., (1978), *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1045-1053.
23. Reyes F., Lahoz R., Vazquez C., (1980), *Can. J. Microbiol.*, 26, 1120-1125.
24. Meyer M. T., Phaff H. J., (1977), *J. Bacteriol.* 131, 702-706.
25. Chung J., (1998), *J. Dent. Res.*, 77, 1322.
26. Chung J., Kim H. H., Shin J. H., Lee H. C., Lee Z. H., Oh J. S., (2001), *Microbiol. Biotechnol.*, 11, 677-684.
27. Ebisu S., Kato K., Kotani S., Misaki A., (1975), *J. Bacteriol.*, 124, 1489-1501.
28. Takahashi N., Horikawa T., Mizuno F., Takamori K., (1980), *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 27, 79-88.
29. Takahashi N., Satoh Y., Takamori K., (1985), *J. Gen. Microbiol.*, 131, 1077-1082.
30. Pleszczyńska M., Wiater A., Szczodrak J., Marek-Kozaczuk M., (2005), *1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, Badajoz, Spain, Book of Abstracts, 379.
31. Meyer M. T., Phaff H. J., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, 118, 197-208.
32. Matsuda S., Kawanami Y., Takeda H., Ooi T., Kinoshita S., (1997), *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 593-595.
33. Odera M., Kikawa H., Shimotsuura I., Yokobori Y., Asai Y., (1997), *JP Patent N° 09037773*.

34. Asai Y., Odera M., Kikawa H., Shimotsuura I., (1996), JP Patent N° 0830558.
35. Asai Y., Odera M., Kikawa H., Shimotsuura I., (1996), JP Patent N° 0830559.
36. Simonson L. G., Lambert B. L., Reiher D. A., (1980), *Microbios Lett.*, 14, 107-112.
37. Simonson L. G., Gaugler R. W., Lambert B. L., Reiher D. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, 715, 189-195.
38. Imai K., Kikuta T., Kobayashi M., Matsuda K., (1977), *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1339-1346.
39. Imai K., Kobayashi M., Matsuda K., (1977), *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1889-1895.
40. Inoue M., Egami T., Yokogawa K., Kotani H., Morioka T., (1975), *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1391-1400.
41. Takehara T., Inoue M., Morioka T., Yokogawa K., (1981), *J. Bacteriol.*, 145, 729-735.
42. Dekker N., Speijer D., Grün C. H., van den Berg M., de Haan A., Hochstenbach F., (2004), *Mol. Biol. Cell*, 15, 3903-3914.
43. Horisberger M., Lewis B. A., Smith F., (1972), *Carbohydr. Res.*, 23, 183-188.
44. Carbonell L. M., Kanetsuna F., Gil F., (1970), *J. Bacteriol.*, 101, 636-642.
45. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., (2006), *Acta Biol. Hung.*, 57, 123-132.
46. Lamberts B. L., Simonson L. G., Pederson E. D., Gaugler R. W., (1981), *Anal. Biochem.*, 117, 320-326.
47. Wiater A., Szczodrak J., Rogalski J., (2001), *Mycol. Res.*, 105, 1357-1363.
48. Das A., Rao C. V. N., (1965), *Aust. J. Chem.*, 18, 845-850.
49. Wiater A., Szczodrak J., Rogalski J., (2004), *Proc. Biochem.*, 39, 1481-1489.
50. Hayacibara M. F., Koo H., Vacca Smith A. M., Kopec L. K., Scott-Anne K., Cury J. A., Bowen W. H., (2004), *Carbohydr. Res.*, 339, 2127-2137.
51. Wei H., Schere M., Singh A., Liese R., Fischer R., (2001), *Fungal Gen. Biol.*, 34, 217-227.
52. Kikawa H., Shimotsuura I., Yokobori Y., Asai Y., Odera M., (1998), JP Patent N° 10201483.
53. Yano S., Yamamoto S., Toge T., Wakayama M., Tachiki T., (2003), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1976-1982.
54. Szczodrak J., Wiater A., Pleszczyńska M., (2005), Zgłoszenie patentowe nr P 375969.