



Enzymatyczna hydroliza mannanów roślinnych

Monika Predecka¹, Jerzy Rogalski¹, Janusz Szczodrak²

¹Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

²Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Enzymatic hydrolysis of plant mannans

Summary

Mannans, as compounds of plant biomass, seem to be a very useful feedstock for the effective utilization in biotechnology. This is due to their abundance and renewability as well as the possibility of producing various chemical by-products, fuels, fodder and food products from this source. On the other hand, the enzymatic removal of mannans from cellulosic pulps and coffee extracts by mannanases is very important for the production of high quality paper and instant coffee. This review article presents new trends in the investigations on plant mannans and their enzymatic hydrolysis by mannanases of different origin. Particular emphasis has been laid on catalytic properties and molecular structure of different enzymes of mannanolytic complex, and on the mechanisms of their regulation and adsorption on wood fibers as well as on genes encoding particular enzymes. Most promising prospects for the practical applications of mannanases are also discussed.

Key words:

biomass, mannans, enzymatic hydrolysis, mannanases, catalytic properties, regulation, practical applications.

Adres do korespondencji

Monika Predecka,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej,
Plac M. Curie-Skłodowskiej 3,
20-031 Lublin.

1. Wstęp

Postępujące wyczerpywanie się nieodnawialnych zasobów surowców paliwowych na świecie oraz konieczność wzmożenia ochrony środowiska naturalnego, skłaniają do upatrywania alternatywnych źródeł energii m.in. w biomasie roślinnej. O rozmiarach tej rezerwy materii organicznej najlepiej świadczy fakt, że

rocznie powstaje ona na Ziemi w ilości około 200 miliardów ton, z czego ponad 90% stanowią ligninocelulozany. Człowiek zużytkowuje, jak dotąd, jedynie około 2% biomasy roślinnej (1). Perspektywy szerszego sięgnięcia do tych zasobów węgla organicznego poprzez ich hydrolizę enzymatyczną do łatwo przyswajalnych przez organizmy cukrów prostych, jak się wydaje, są bardzo obiecujące. Mogłyby się one stać dzięki temu przydatne zarówno w rolnictwie, powiększając zasoby paszowe, jak również do produkcji białka mikrobiologicznego lub niektórych produktów fermentacji (1).

Kompleks ligninocelulozowy jest zbudowany z polisacharydów typu celulozy (40-45%) i hemicelulozy (25-35%) oraz odpornej na procesy degradacji ligniny (15-30%), będącej polimerem jednostek fenylopropanowych. Jedną z szans wykorzystania zasobów cukrów tkwiących w związkach ligninocelulozowych biomasy roślinnej stanowi hydroliza zawartych w nich hemiceluloz typu mannanów przy udziale mannanaz.

Będąc istotnym składnikiem drewna, szczególnie miękkiego, a także roślin jednorocznych i nasion wielu roślin, mannany są brane pod uwagę jako ważny surowiec do wykorzystania na drodze biokonwersji. Powstające w wyniku mannanolizy produkty mogą stanowić punkt wyjścia do produkcji pasz, paliw, żywności i chemikaliów. Ważnym zagadnieniem jest także wykorzystanie mannanaz w przemyśle celulozowo-papierniczym, spożywczym, winiarskim i paszowym (2). Jednakże efektywna eksploatacja mannanu jako taniego surowca w biotechnologii wymaga pełnego zrozumienia mechanizmów enzymatycznych biorących udział w degradacji tego złożonego heteropolimeru, jak również interakcji pomiędzy poszczególnymi enzymami kompleksu mannanolitycznego.

W ostatnich latach wzrost zainteresowania rozkładem mannanów znajduje odbicie w obszernym piśmiennictwie dotyczącym tego tematu. Szeroko omawiane są zarówno możliwości zastosowania enzymów rozkładających mannan, jak i właściwości mannanaz pochodzących z różnych źródeł.

2. Charakterystyka mannanów roślinnych

Mannany występują w drewnie miękkim drzew iglastych, drewnie twardym drzew liściastych, trawach oraz nasionach wielu roślin. Należą do polisacharydów, których łańcuch główny może być złożony z jednostek D-mannopiranozy i D-glukopiranozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Taki typ heteropolimerów określa się mianem glukomannanów. Zwykle stosunek ilościowy reszt mannozy do glukozy wynosi 3 : 1, a rozmieszczenie podjednostek glukopiranozy jest przypadkowe (3). Istnieją również mannany o stosunkowo prostej budowie, np. mannan z *Phytelphus macrocarpa*, składający się wyłącznie z reszt mannopiranozy i przypominający budową krystaliczną strukturę celulozy (4). Tego rodzaju homopolimer występuje też w ziarnach kawy i nasionach niektórych gatunków *Umbelliferae*. Nasiona, których en-

dosperma zawiera liniowy mannan są twarde i odporne na uszkodzenia mechaniczne.

W strukturze mannanu często do reszt mannozy łańcucha głównego przyłączone są wiązaniami α -1,6-glikozydowymi cząsteczki D-galaktopiranozy. Zawartość galaktopiranozy różni się w zależności od gatunku organizmu, z którego pochodzi dana hemiceluloza. Jeżeli stosunek ilości reszt galaktozy do glukozy i mannozy wynosi 0,1: 1: 4, to taką hemicelulozę określa się jako glukomannan. Natomiast w przypadku, gdy udział galaktozy jest znacznie wyższy, hemiceluloza nazywana jest galaktoglukomannanem (5). Dodatkowo, niektóre grupy hydroksylowe przy drugim i trzecim atomie węgla reszt mannozy i w dużo mniejszym stopniu glukozy, są acetylowane (4).

2.1. Mannany drewna twardego

Drewno twarde zawiera niewielkie ilości glukomannanu (2-3%). Glukomannan tego rodzaju drewna cechuje niezwykle prosta budowa. Łańcuch główny tej hemicelulozy składa się z jednostek glukopiranozy i mannopiranozy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Stosunek ilości jednostek mannozy do glukozy wynosi około 1,5:2,1 dla większości zbadanych gatunków. Największe ilości glukozy stwierdzono w glukomannanie drewna brzoźowego, gdzie stosunek ilości glukozy do mannozy wynosi 1:1 (13,16). Z kolei najniższą zawartość glukozy ma glukomannan z *Acer saccharum* (mannoza : glukoza = 2,3:1). Stopień polimeryzacji glukomannanu drewna twardego wynosi około 60-70.

2.2. Mannany drewna miękkiego

Przedstawicielem tej grupy mannanów jest galaktoglukomannan, będący najpowszechniej i najobficiej występującym mannanem w przyrodzie. Drewno miękkie zawiera około 20-25% tego polisacharydu. Szkielet galaktoglukomannanu stanowi liniowy łańcuch zbudowany z reszt β -D-glukopiranozy i β -D-mannopiranozy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Istotną cechą tej hemicelulozy jest to, że w łańcuchu polisacharydowym jedna na trzy lub cztery reszty monocukru (mannozy i glukozy) jest acetylowana w pozycji C-2 lub C-3 (5). Dodatkowo do łańcucha glukozo-mannozowego przyłączone są wiązaniami α -1,6-glikozydowymi reszty α -D-galaktopiranozy (7).

W zależności od zawartości galaktozy wyróżnia się przynajmniej dwa rodzaje galaktoglukomannanów. Pierwszy charakteryzuje się niską zawartością galaktozy, jest słabo rozpuszczalny w wodzie i często jest określany mianem glukomannanu. Zawiera on reszty mannozy, glukozy i galaktozy w proporcji 4:1:0,1. Jego procentowa zawartość w drewnie wynosi od 10 do 15%. Drugi to rozpuszczalny w wodzie po-

lisacharyd o wysokiej zawartości galaktozy, którego łańcuch składa się z reszt mannozy, glukozy i galaktozy występujących w stosunkach ilościowych jak 3:1:1. Ilość tego rodzaju galaktomannanu w drewnie wynosi od 5 do 8% (5).

We wtórnych ścianach komórkowych roślin nagonasiennych wykryto dwa rodzaje galaktoglukomannanu: pierwszy rozpuszczalny w wodzie, drugi rozpuszczalny w alkaliach. Obydwa zbudowane są z reszt mannozy i glukozy z przyłączoną w pozycji O-6 cząsteczką α -D-galaktopiranozy. Galaktoglukomannany wtórnych ścian komórkowych różnią się między sobą proporcjami molowymi reszt D-mannozy i D-glukozy, zawartością D-galaktozy w łańcuchu bocznym oraz zawartością i rozmieszczeniem grup acetylowych.

Proporcja reszt D-glukozy i D-mannozy u nagozałążkowych wynosi 1:3 lub 1:4 (8). Galaktoglukomannany bogate w reszty D-galaktozy są rozpuszczalne w wodzie, podczas gdy polimery o zawartości jednostek D-galaktozy poniżej 4-5% są mniej lub nawet nierozpuszczalne w wodzie (9). Według niektórych badaczy większa rozpuszczalność w wodzie jest wynikiem większego stopnia rozwidlenia cząsteczki. Z kolei Capek i wsp. (9) wykazali, że rozpuszczalność tych hemiceluloz zależy od zawartości grup acetylowych w cząsteczce. Około 20-30% jednostek w łańcuchu bocznym galaktoglukomannanu drewna miękkiego jest podstawionych przez grupy acetylowe. W galaktoglukomannanie drewna sosny reszty O-acetylowe przyłączone są do cząsteczek mannozy w równym stopniu w pozycji C-2 i C-3.

2.3. Mannany innych roślin

Poza wymienionymi mannany występują również u roślin innych gatunków, np. *Lactuca sativa* (10) czy *Cucurbita maxima* (11). Obecność mannanów stwierdzono również w ścianach bielma nasion wielu roślin. Na przykład galaktomannan jest materiałem zapasowym ścian bielma nasion roślin strączkowych takich jak chleb świętojański czy lucerna.

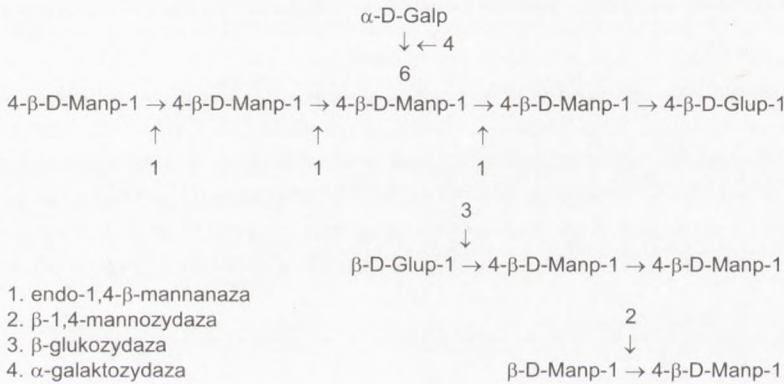
Galaktoglukomannan o strukturze podobnej do mannanu drewna miękkiego występuje w łodygach i liściach koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*). Zawiera on reszty galaktozy, glukozy i mannozy występujące w stosunkach molowych 0,25:1,0:1,1.

Jednym z bardziej interesujących przykładów mannanów jest glukomannan pochodzący z egzotycznej rośliny *Amorphophallus konjac* („konjak” mannan). Jest to mannan, w którym sekwencję trzech reszt mannozy przerywa jednostka glukozy. „Konjak” mannan podobnie jak inne mannany po rozpuszczeniu w wodzie tworzy lepki żel. Z tego powodu włączenie go do diety powoduje redukcję apetytu, wchłaniania glukozy oraz odkładania się cholesterolu, co z kolei powoduje spadek wagi. Reszty mannozy i glukozy występują tu w stosunku molowym 1,6:1 przy stopniu acetylacji 0,07 na resztę cukru (12).

3. Enzymatyczny rozkład mannanów

Ze względu na zróżnicowaną budowę strukturalną mannanów rozkład tych biopolimerów do cukrów prostych wymaga współdziałania różnych enzymów. Kompleks depolimeryzacyjny obejmuje endo-1,4- β -mannanazę, β -mannozydazę, α -galaktozydazę i β -glukozydazę, przy czym dwa pierwsze enzymy stanowią najważniejsze składniki tego kompleksu (5).

β -Mannanazy katalizują hydrolizę wiązania β -1,4-glikozydowego pomiędzy resztami β -D-mannozy z nieredukującego końca takich substratów jak mannany, glukomannany, galaktomannany i galaktoglukomannany. Efektem działania endomannanazy na łańcuch główny jest powstanie krótkich, podstawionych lub niepodstawionych oligomerów, mannobiozy i mannozy. Dalszą hydrolizę rozpuszczalnych w wodzie oligomerów i dimerów do mannozy przeprowadza β -mannozydaza. Wspólnie z endomannanazami i mannozydazami działają β -glukozydaza i α -galaktozydaza, które uwalniają z głównego łańcucha mannanu podstawniki glukozowe i galaktozowe. Rozkład galaktoglukomannanu z udziałem poszczególnych enzymów kompleksu mannanolitycznego przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Enzymatyczny rozkład galaktoglukomannanu (6).

4. Enzymy kompleksu mannanolitycznego

Enzymy mannanolityczne są szeroko rozpowszechnione wśród organizmów żywych. Ich obecność stwierdzono w wielu gatunkach bakterii i grzybów, ale są one również w drożdżach, niektórych gatunkach glonów morskich, nasionach roślin strączkowych, a nawet niektórych bezkręgowcach (4).

Wszystkie mannanazy są hydrolazami O-glikozyłowymi (EC 3.2.1.-). Kilkanaście lat temu zaproponowano klasyfikację tego typu hydrolaz w rodziny oparte na podo-

bieństwie sekwencji aminokwasowych. Z uwagi na bezpośredni związek podobieństw sekwencji i fałdowania białek, tego rodzaju klasyfikacja znacznie lepiej odzwierciedla cechy strukturalne wymienionych enzymów, niż jedynie ich specyficzność substratową. Może być pomocna w wyjaśnieniu powiązań ewolucyjnych pomiędzy poszczególnymi enzymami i w badaniu mechanizmów reakcji (13).

W przypadku, gdy sekwencja białka związana jest z więcej niż jedną rodziną, gdy czułość metod porównywania sekwencji białkowych wzrasta lub gdy determinacja struktury wskazuje na podobieństwo pomiędzy członkami różnych rodzin niektóre rodziny mogą być zgrupowane w klany. Według tej klasyfikacji endo- β -mannanaza została zaliczona do rodziny 5 i 26. W obydwu przypadkach stereochemiczny przebieg reakcji zachodzi z retencją konfiguracji anomerycznej. Katalitycznym donorem protonów, podobnie jak i nukleofilem katalitycznym w reakcji, jest reszta kwasu glutaminowego. Z kolei β -mannozydaza została umieszczona w rodzinie 1, 2 i 5. Reakcja katalizowana przez ten enzym przebiega z retencją konfiguracji anomerycznej i podobnie jak w przypadku endomannanazy donorem protonów i nukleofilem są reszty kwasu glutaminowego. Bakteryjne α -galaktozydazy należą do rodziny 4, natomiast pozostałe do 27, 36 i 57. Brakuje jednoznacznych informacji co do przebiegu reakcji i reszt aktywnych w centrum katalitycznym α -galaktozidaz pochodzących z rodzin 4, 27, 36, natomiast α -galaktozydaza zakwalifikowana do rodziny 57 charakteryzuje się retencyjnym mechanizmem reakcji, gdzie nukleofilem katalitycznym jest reszta kwasu glutaminowego.

β -Glukozydazy sklasyfikowano w rodzinach 1, 3 i 9. Reakcja katalizowana przez ten enzym przebiega z retencją konfiguracji anomerycznej, przy czym w przypadku rodziny 1 kwas glutaminowy jest zarówno nukleofilem jak i donorem protonów, zaś w rodzinach 3 i 9 jako nukleofil służy reszta asparaginianu. Hydroliza enzymatyczna wiązania glikozydowego odbywa się według mechanizmu katalizy kwasowej, a jej przebieg uzależniony jest od obecności dwóch podstawowych reszt w postaci donora protonów i nukleofila – zasady (13).

4.1. Endomannanaza

Endomannanaza (β -1,4-mannan 4-mannanohydrolaza; EC 3.2.1.78) jest stosunkowo dobrze zbadanym enzymem. Wśród organizmów aktywnie produkujących endomannanazę są grzyby, bakterie, glony, drożdże, rośliny wyższe, np. kawa, migdały, morele, chlebowiec i zwierzęta takie jak ssaki, ślimaki czy ostrygi (14).

W procesie degradacji złożonych struktur mannanów endomannanaza katalizuje hydrolizę wiązania β -1,4-glikozydowego w łańcuchu głównym do mannooligomerów, mannobiozy i mannozy. Stopień hydrolizy galaktomannanów jest tym większy, im mniejsza jest zawartość reszt galaktozy, co sugeruje, że obecność tych reszt wpływa hamująco na enzymatyczny rozkład mannanów. Zdolność mannanazy do rozkładu poszczególnych substratów zależy głównie od stopnia ich polimeryzacji

i podstawienia. Reakcja katalizowana przez mannanazę jest reakcją typu substytucji nukleofilowej przy węglu nasyconym w centrum anomerycznym i może przebiegać z inwersją bądź retencją konfiguracji (15).

Obecnie przyjęto retencyjny mechanizm reakcji katalizowanej przez endomannanazę z *Thermomonospora fusca*, w którym tlen glikozylowy jest protonowany przez Glu 128 (donor protonów), a anomeryczny atom węgla jest atakowany przez Glu 225 (nukleofil). Powstały kompleks pośredni, mannozylo-mannanazowy, jest następnie hydrozylowany przez cząsteczkę wody, a uzyskany produkt ma tę samą konfigurację anomeryczną co substrat (13).

Enzymy charakteryzujące się retencyjnym mechanizmem katalizy posiadają oprócz aktywności hydrolitycznej również aktywność transferazową. W takim przypadku mamy do czynienia z reakcją transglikozylacji, w której reszty glikozyłowe przenoszone są na wydłużany łańcuch cukrowy. Stwierdzono również, że niektóre β -mannanazy katalizują transglikozylację mannooligosacharydów (16).

β -Mannanaza jest enzymem stosunkowo najlepiej poznanym z grupy enzymów mannanolitycznych. Właściwości fizykochemiczne endomannanazy oczyszczonej z różnych organizmów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka wybranych endo- β -1,4-mannanaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K_m (mg/ml)	V_{max} (U/mg)	Literatura
<i>Sclerotium rolfsii</i>	46,5	2,75	3,0-3,5	75	1,81	–	(2)
<i>Aspergillus niger</i>	40	3,7	3,5	–	–	–	(17)
<i>Trichoderma reesei</i>	46	5,2	5,0	75	0,0015	24	(18)
<i>Bacillus subtilis</i>	39	4,5	7,0	50-55	9,1	2935	(19)
<i>Vibrio</i> sp.	49	3,8	6,5	40	4,7	200	(20)
<i>B. licheniformis</i>	–	–	7,0	60	–	–	(21)

Struktura genów kodujących mannanazy jest także bardzo intensywnie badana. Ståhlbrånd i wsp. (22) wykazali, że gen kodujący β -mannanazę (*man1*) u *Trichoderma reesei* zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF) złożoną z 1440 par zasad i rozpoczynającą się od pierwszego kodonu startowego na cDNA. Sekwencję kodującą przerywają dwa introny. Przepuszczalne miejsce odłączenia peptydu sygnałnego jest usytuowane w odległości 19 aminokwasów od kodonu inicjacyjnego. Produktem genu *man1* jest białko o długości 410 aminokwasów i ciężarze cząsteczkowym 44 kDa. Stwierdzono również, że gen *man1* koduje dwie endomannanazy o punktach izoelektrycznych 4,6 oraz 5,4.

W przypadku endomannanazy z *Clostridium thermocellum* gen *manA* zawiera ORF złożoną z 1767 nukleotydów kodujących polipeptyd zbudowany z 598 aminokwasów o przewidywalnym ciężarze cząsteczkowym około 67 kDa. Większość otwartych ramek odczytu z *Clostridium* kończy się kodonem TAA, niemniej jednak w przypadku ORF dla genu *manA* kończy się ona kodonem stop TAG. Region flankujący od końca 3' nie zawiera żadnych sekwencji palindromowych (23).

Z kolei Sunna i wsp. (24) zbadali strukturę genu *manA* kodującego wielodomenową β -mannanazę z *Caldibacillus cellulovarens*. Gen ten jest częścią sekwencji o wielkości 5567 par zasad. W jej obrębie stwierdzono obecność trzech otwartych ramek odczytu. Pierwsza koduje domenę wiążącą celulozę, trzecia białko o nieznannej funkcji, natomiast endomannanaza jest kodowana przez gen *manA*, czyli ORF2. Gen *manA* ma wielkość 2792 nukleotydów. Kodon startowy ATG jest poprzedzony sekwencją wiążącą rybosom GAGGA. Za kodonem terminalnym TAA znajduje się region złożony z 481 par zasad, zawierający sekwencję palindromową (19 par zasad), która może pełnić rolę sygnału do terminacji transkrypcji.

Enzym będący produktem genu *manA* ma strukturę wielodomenową: N-terminalna domena o nieznannej funkcji, wewnętrzna domena wiążąca celulozę, domena katalityczna β -mannanazy oraz domena C-terminalna. Wykazuje optimum działania w temperaturze 85°C i pH 6,0 oraz wysoką specyficzność do galaktomannanu i znacznie słabszą do bardziej podstawionych galakto- i glukomannanów.

4.2. β -Mannozydaza

β -1,4-Mannozydaza (mannohydrolaza β -D-mannozydów; EC 3.2.1.25) jest enzymem niezbędnym do dalszej hydrolizy oligomerów powstałych w wyniku działania endomannanazy. β -Mannozydaza usuwa mannozę z nieredukującego końca manno-oligosacharydów. Stwierdzono, że obecność reszt mannozy podstawionych galaktozą w sąsiedztwie końcowej reszty mannozy obniża aktywność β -mannozydazy od 18 do 43% w porównaniu do nie podstawionych substratów, a stopień obniżenia aktywności zależy od wielkości oligosacharydów (25). Mannozydaza, podobnie jak mannanaza, posiada aktywność transglukozylacyjną i charakteryzuje się retencyjnym mechanizmem katalizy (26).

β -Mannozydaza występuje m.in. u grzybów strzępkowych (*Aspergillus awamori*, *A. niger*) oraz bakterii, np. *Bacillus* sp. (27). Wiadomo też, że wewnątrzkomórkowa mannozydaza ssaków katalizuje hydrolizę mannozowych składników glikoprotein (28). Niektóre właściwości fizykochemiczne oczyszczonych mannozydaz zebrano w tabeli 2.

Geny kodujące β -mannozydazę wyizolowano z komórek ssaków (29) oraz różnych mikroorganizmów, np. *Pyrococcus furiosus* (30), *Cellulomonas fimi* (4) i *Aspergillus awamori* (33).

Tabela 2

Charakterystyka wybranych mannozydaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K _m (mM)	Literatura
<i>Trichoderma reesei</i>	105	4,8	3,5	–	0,12	(31)
<i>Penaeus japonicus</i>	31	5,6	5,0	–	0,123	(32)
<i>Aspergillus awamori</i>	–	–	5,0	60-70	–	(33)

Zbadano gen *man2A* kodujący mannozydazę z *Cellulomonas fimi* (4). Zawiera on ORF kodującą białko o masie 95 kDa. Z kolei gen *mndA* kodujący mannozydazę u *Aspergillus niger* zawiera: ORF złożoną z 2966 par zasad, kodującą białko zbudowane z 931 aminokwasów oraz dwa introny w pozycjach 189-304 i 386-439. W wyniku analizy białka będącego produktem tego genu wykazano obecność eukariotycznej sekwencji sygnałnej, złożonej z 21 aminokwasów oraz 13 miejsc przypuszczalnej N-glikozytacji. Stwierdzono również obecność pięciu prawdopodobnych miejsc wiązania białka regulatorowego CreA, biorącego udział w procesie represji katabolicznej. Masa mannozydazy produkowanej przez gen *mndA* wynosi 102 kDa, a jej punkt izoelektryczny 5,2 (34).

Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wykazano duże podobieństwo genu *mndA* do innych mannozydaz z rodziny 2 hydrolaz glikozylowych. Najwyższy stopień podobieństwa (62% identyczności) stwierdzono z mannozydazą z *A. aculeatus*. β -Mannozydazy z *Homo sapiens*, *Bos taurus* i *Capra hircus* wykazują około 28% identyczności z genem *mndA* *A. niger*. Najwyższe podobieństwo stwierdzono w regionie złożonym ze 125 aminokwasów rozpoczynającym się w pozycji 359 w *mndA* (34).

4.3. α -Galaktozydaza

α -Galaktozydaza (galaktohydrolaza α -D-galaktozydów; EC 3.2.1.22) katalizuje reakcję hydrolizy końcowych reszt α -D-galaktopiranozy w α -D-galaktozydach. Oddziałuje ona na oligosacharydy zawierające galaktozę (np. melibiozę, rafinozę czy stachylozę), galaktolipidy i galaktoglukomannany.

W procesie rozkładu O-acetylogalaktozylglukomannanu, jednego z głównych składników drewna miękkiego, α -galaktozydaza katalizuje uwalnianie reszt galaktozy przyłączonych wiązaniami α -1,6-glikozydowymi do jednostek mannozy. Umożliwia to pełną degradację łańcucha głównego tej hemicelulozy przez mannanazy i mannozydazy (4).

Dey sugeruje dwa możliwe mechanizmy reakcji katalizowanej przez α -galaktozydazę wyizolowaną ze słodkich migdałów. W mechanizmie dwuetapowym główną

rolę w centrum aktywnym enzymu pełni grupa karboksylowa (COO⁻) i uprotonowana grupa imidazolowa. Reakcja przebiega za pośrednictwem cząsteczki akceptora (R'OH), którym może być woda. Elektrofilowy atak grupy imidazolowej jest, jak się wydaje, wystarczający, aby rozerwać wiązanie O-glikozydowe z utworzeniem jonu karboniowego przy C-1 reszty galaktozy. W pełnym dwuetapowym mechanizmie reakcji prawdopodobnie zachodzą dwie inwersje Waldena, czego rezultatem jest retencja konfiguracji anomerycznej produktu. Niemniej jednak tworzenie się produktu pośredniego w postaci jonu karboniowego niekoniecznie prowadzi do racemizacji.

Sugeruje się też możliwość jednoetapowego mechanizmu reakcji. W takim przypadku następowaloby tworzenie się kompleksu potrójnego, złożonego z enzymu, substratu i akceptora. Podobnie jak w przypadku mechanizmu dwuetapowego grupy imidazolowa i karboksylowa pełnią tu zasadniczą rolę. Atak na anomeryczny atom węgla cząsteczki galaktozy prowadzi do powstania produktu z retencją konfiguracji (35).

α -Galaktozydaza jest syntetyzowana przez różne organizmy. Jej obecność wykazano w nasionach wielu roślin np. *Coffea* sp., *Pisum sativum*, *Plantago ovata*, *Vicia faba* czy *Canavalia ensiformis*, gdzie odgrywa istotną rolę w procesie kiełkowania (35). Wyizolowano ją także z bakterii np. *Cellulomonas fimi* i *Thermatoga neapolitana* (36,4), drożdży np. *Mortierella vinacea*, grzybów np. *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Aspergillus* sp. (7) oraz zwierząt np. szczurów, świń, a także człowieka (37). Właściwości wybranych α -galaktozydaz przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Charakterystyka właściwości wybranych α -galaktozydaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K _m (mM)	V _{max}	Literatura
<i>Aspergillus ficuum</i>	70,8	–	6,0	60	1,462	–	(38)
<i>A. niger</i>	94	4,15	4,5	60	1,4	18000 (nkat/mg)	(39)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	57	5,2	4,5-5,0	65-70	–	–	(40)
<i>Penicillium ochrochloron</i>	60,2	–	4,5	55	–	–	(41)

Liabl i wsp. (41) badali gen *galA* odpowiedzialny za syntezę α -galaktozydazy u *Thermotoga meritima*. Koduje on białko złożone z 552 reszt aminokwasowych o ciężarze cząsteczkowym 64 kDa. Stwierdzono, że gen ten jest oflankowany innymi genami, które są prawdopodobnie zaangażowane w utylizację galaktozy. Tuż przed genem *galA* zlokalizowany jest gen *lacZ*, kodujący β -galaktozydazę. Z kolei za genem *galA* znajdują się dwie otwarte ramki odczytu, które przypuszczalnie kodują

enzymy katabolizmu galaktozy takie jak urydylotransferaza galaktozo-1-fosforanu i galaktokinaza. Zidentyfikowane geny są bardzo blisko z sobą związane i mają tę samą orientację tak, że mogą stanowić część operonu galaktozowego *T. meritima*.

Gen *aglC* α -galaktozydazy z *Aspergillus niger* zawiera ORF o 2374 parach zasad i koduje białko złożone z 747 aminokwasów. Część sekwencji tego genu wykazuje wysoki stopień identyczności z genem kodującym α -galaktozydazę z *T. reesei* i innymi galaktozydazami, należącymi do 36 rodziny hydrolaz O-glikozylowych (39).

4.4. β -Glukozydaza

β -Glukozydaza (glukohydrolaza β -D-glukozydów EC 3.2.1.21) katalizuje hydrolizę końcowych, nieredukujących reszt β -D-glukozy z różnych glikozydów.

β -Glukozydazy, ze względu na ich specyficzność substratową, podzielono na trzy grupy: β -glukozydazy wykazujące wysoką specyficzność wobec arylo- β -D-glukozydów, enzymy preferencyjnie hydrolizujące celbiozę i celbiooligosacharydy (zwane też celobiazami) oraz β -glukozydazy o szerokiej specyficzności, rozkładające do pewnego stopnia obydwie typy substratów. Na przykład β -glukozydaza z *Saccharomyces cerevisiae* jest wysoce aktywna w stosunku do alkilowych i arylowych β -glukozydów, podczas gdy enzym z *Aspergillus oryzae* jest najbardziej aktywny w stosunku do celbiozy (42). Właściwości niektórych β -glukozydaz zebrano w tabeli 4.

Tabela 4

Charakterystyka wybranych β -glukozydaz

Pochodzenie enzymu	Masa cząsteczkowa (kDa)	Punkt izoelektryczny	Optymalne pH	Optymalna temperatura (°C)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	Literatura
<i>Aspergillus aculeatus</i>	93	4,7	5,0	65	0,23	–	(43)
<i>A. japonicus</i>	121	4,7	5,0	60	0,20	–	(43)
<i>A. foetidus</i>	120-142	4,3	4,8	65	0,41	–	(43)
<i>A. tubingensis</i>	111	4,2	4,6	65	0,59	–	(43)
<i>Volvariella volvacea</i>	158	5,6	7,0	55-60	0,09		(44)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	105	–	6,0	65	0,075	12,12	(45)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	150	3,8	4,0	65	0,87	–	(42)

Mechanizm reakcji katalizowanej przez β -glukozydazę oparto na katalizie kwasowo-zasadowej, angażującej dwie grupy katalityczne. Jedną z nich jest całkowicie zjonizowana grupa karboksylowa będąca centrum nukleofilnym, które stabilizuje dodatnio naładowany, oksokarboniowy jon pośredni lub formuje kowalencyjny glu-

kozyło-enzym jako produkt pośredni. Grupa druga to uprotonowany, aminokwasowy łańcuch boczny o takich funkcjach katalitycznych jak protonowanie grupy odłączanej oraz deprotonowanie cząsteczki wody.

Marri i wsp., (46) zbadali sekwencję nukleotydową genu *bglA* odpowiedzialnego za syntezę β -glukozydazy u *Erwinia herbicola*. Stwierdzono, że ORF wielkości 1442 par zasad koduje białko złożone z 480 reszt aminokwasowych o ciężarze cząsteczkowym 54 kDa, a badana β -glukozydaza należy do pierwszej rodziny hydrolaz glikozylowych.

cDNA β -glukozydazy z nasturcji (*Tropaeolum majus*) posiada ORF w obszarze od 94 do 2055 nukleotydu i koduje 654 aminokwasowy polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 72 kDa. Cztery prawdopodobne miejsca N-glikozylacji zawierają sekwencję Asn-X-Ser/Thr-X, gdzie X jest każdym aminokwasem poza proliną. Region kodujący jest poprzedzony kodonem „stop” TAA, a sekwencje nukleotydowa i aminokwasowa wykazują największe podobieństwo do rodziny 3 hydrolaz glikozylowych (47).

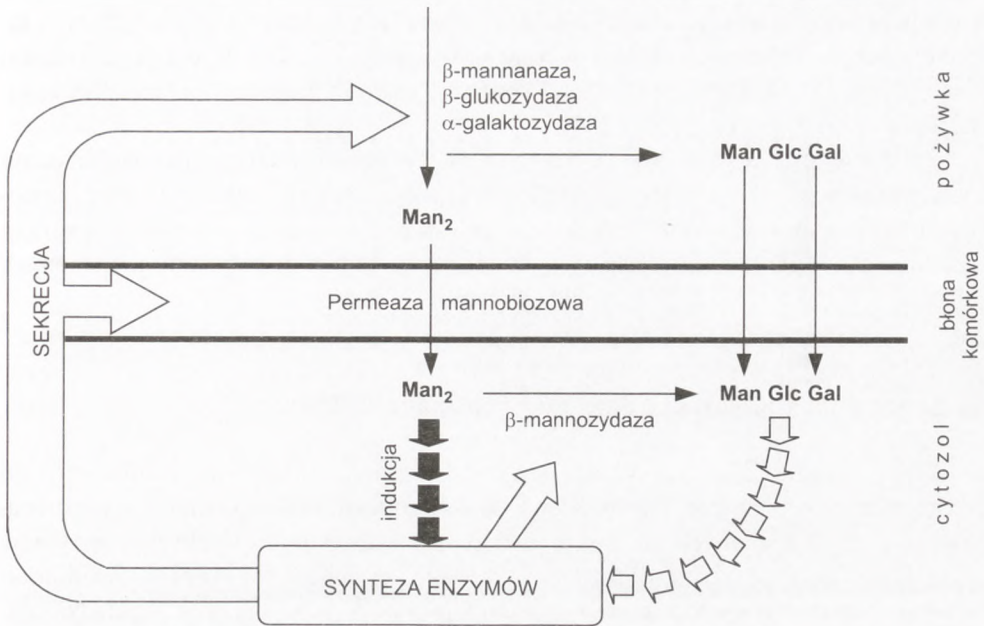
Z badań Fowler (48) wynika, że produktem genu *bgl1* u *Trichoderma reesei* jest β -glukozydaza o masie 74 kDa. Pierwotna sekwencja aminokwasowa tego enzymu posiada siedem miejsc potencjalnej N-glikozylacji. Region kodujący *bgl1* przerywany jest dwoma intronami o 64 i 70 parach zasad, podobnie jak w innych genach grzybowych odpowiedzialnych za syntezę β -glukozydazy.

5. Regulacja biosyntezy enzymów mannanolitycznych

Poza omówioną strukturą genów kodujących poszczególne enzymy, rozwija się drugi kierunek badania nad indukcyjnym i supresyjnym wpływem różnych substancji na syntezę mannanaz.

Model regulacji syntezy mannanaz został zaproponowany przez Kreminsky i Bieły (49) dla szczepu *Aureobasidium pullulans*, produkującego z dużą wydajnością enzymy kompleksu mannanolitycznego. Autorzy wykazali, że do całkowitej degradacji β -mannanów konieczna jest obecność zewnątrzkomórkowej β -1,4-mannanazy, wewnątrzkomórkowej β -mannozydazy, zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej β -glukozydazy i α -galaktozydazy. Synteza dwu spośród tych enzymów, czyli β -1,4-mannanazy i β -mannozydazy, jest indukowana w obecności β -mannanów i β -mannooligosacharydów, a mannobioza jest najkrótszym fragmentem mannanu indukującym wytwarzanie tych enzymów. W przedstawionym na rysunku 2 kompleksie mannanolitycznym, β -1,4-mannobioza jest induktorem, a D-mannoza supresorem syntezy mannanaz.

Ogólnie przyjęty jest model, w którym niskocząsteczkowe, rozpuszczalne katalolity, uwolnione z wielkocząsteczkowych substratów (np. galaktoglukomannanu) przez niewielkie ilości hydrolaz, z łatwością wnikają do wnętrza komórki i poprzez zasygnalizowanie obecności zewnątrzkomórkowego substratu mogą stymulować syntezę odpowiedniego enzymu.



Rys. 2. Regulacja syntezy enzymów mannanolitycznych (49).

W przypadku endomannanazy ze *Sclerotium rolfsii* dobrym induktorem syntezy tego enzymu jest mannobioza, laktoza, galaktozylo- β -1,4-mannoza oraz celobioza i jej izomery (soforoza, laminarinobioza i gentobioza). Stwierdzono, że po wyczerpaniu glukozy z pożywki, obserwuje się znacznie podniesiony poziom syntezy endomannanazy, co może być dowodem supresyjnego wpływu tego monosacharydu na produkcję enzymu (14). Mimo że synteza endomannanazy może być indukowana przy niskich stężeniach glukozy, to nawet niewielkie ilości tego cukru powodują represję syntezy innych enzymów mannanolitycznych, takich jak mannozydazy, β -glukozydazy i α -galaktozydazy.

Wytwarzanie α -galaktozydazy również podlega indukcji. W przypadku tego enzymu induktorami są melibioza, α -D-galaktozydazy oraz fenylo- i o-nitrofenylo- α -D-galaktozydazy (35). Wykazano, że ekspresja α -galaktozydazy z *Aspergillus niger* w dużym stopniu zależy od genu odpowiedzialnego za jej syntezę. Spośród trzech genów kodujących ten enzym (*aglA*, *aglB*, *aglC*), tylko *aglA* ulegał ekspresji pod wpływem galaktozy lub zawierających galaktozę oligo- i polisacharydów. Gen *aglB* ulegał ekspresji konstytutywnej na wszystkich źródłach węgla. W przypadku *aglC* ekspresję wykazano tylko na glukozy, co jest raczej zaskakujące dla genu kodującego α -galaktozydazę (26).

Dotychczas sądzono, że β -glukozydaza jest enzymem częściowo konstytutywnym, którego synteza jest indukowana obecnością metylo- β -D-glukozydu, a ulega

represji w obecności soforozy. Jednakże w najnowszych doniesieniach wskazuje się, że produkcja β -glukozydazy jest indukowana podczas wzrostu na celulozie, laktozie i w obecności soforozy, a enzym nie jest wytwarzany w sposób konstytutywny. Indukcja przez soforozę jest efektem transkrypcji genu *bg11*. Stwierdzono, że region tego genu, nie ulegający translacji od końca 5', zawiera motywy wiążące DNA indukowane w obecności soforozy (50).

Zbadanie struktury genów kodujących poszczególne enzymy mannanolityczne oraz poznanie mechanizmów regulacji ich ekspresji otwiera wiele możliwości zastosowania tych enzymów w biotechnologii. Jest to pierwszy krok w kierunku ekspresji sklonowanych genów w innych organizmach i uzyskania genetycznie ulepszonych enzymów lub ich produkcji w większej skali.

6. Synergizm i adsorpcja enzymów mannanolitycznych

Efekty współdziałania pomiędzy enzymami mannanolitycznymi, prowadzące do zwiększenia skuteczności ich działania, są stosunkowo słabo poznane w porównaniu do dobrze zbadanych interakcji tego typu występujących w obrębie enzymów kompleksu celulolitycznego i ksylanolitycznego. Do chwili obecnej udowodniono jedynie synergistyczne działanie α -galaktozydazy i β -mannanazy w rozkładzie galaktomannanów. Wiadomo, że rozgałęzienia α -1,6-galaktozowe hamują aktywność β -mannanazy przez utrudnienie wiązania się enzymu do substratu. W związku z tym ich usunięcie przez α -galaktozydazę zwiększa w znacznym stopniu skuteczność hydrolizy galaktomannanu przez β -mannanazę.

Do tej pory niewiele uwagi poświęcono zagadnieniu adsorpcji enzymów hemicelulolitycznych do włókien drewna. Większość prac dotyczyła głównie adsorpcji celulaz do takich substratów jak mikrokrystaliczna celuloza czy też oczyszczona celuloza drewna, podczas gdy mannanazy z *Trichoderma reesei* zawierają w swojej strukturze również domenę wiążącą celulozę CBD (51).

W ostatnich latach wykazano, że wiele hydrolaz glikozydowych degradujących polimery węglowodanowe, zawiera oprócz domeny katalitycznej drugą domenę pozbawioną właściwości katalitycznych, przy czym obie są zwykle połączone sekwencją łącznikową. Oddzielenie tych dwóch domen doprowadziło do stwierdzenia, że mogą one funkcjonować niezależnie od siebie. Domeny tego rodzaju występują m.in. w mannanazie z *T. reesei* (22). Stwierdzono, że funkcją domen nie posiadających właściwości katalitycznych jest wiązanie do polisacharydu. Adsorpcja enzymu do substratu wzmacnia jego aktywność przez lokalne zwiększenie stężenia enzymu na powierzchni substratu lub przez rozrywanie wiązań niekowalencyjnych, co ułatwia dostęp cząsteczkom enzymu do polimeru (52).

Przypuszcza się, że adsorpcja enzymów hemicelulolitycznych do hemiceluloz i w efekcie hydroliza hemiceluloz pulpy drzewnej jest wypadkową kilku parametrów – siły jonowej, pH i temperatury (51). Z kolei siła jonowa papki włóknistej ma duży

wpływ na ładunek pulpy drzewnej. Duże ilości elektrolitu obecne w pulpie powodują kondensację podwójnej warstwy elektrostatycznej, która otacza włókno. Efektem jest redukcja ładunku ujemnego na powierzchni włókna, co ułatwia adsorpcję enzymów na powierzchni substratów. Na podstawie otrzymanych rezultatów z przeprowadzonych badań przez Gerbera i wsp. (51) można stwierdzić, że adsorpcja mannanaz zawierających obok domeny katalitycznej również domenę wiążącą celulozę jest głównie wynikiem powinowactwa tej domeny do włókna, a duża siła jonowa potęguje efekt wiązania enzymu.

Ogólną cechą enzymów katalizujących hydrolizę polisacharydów roślinnych jest, jak się wydaje, obecność motywów wiążących substrat. Odnosi się to zarówno do enzymów pochodzenia bakteryjnego jak i grzybowego (22). Obecność w hemicelulazach zarówno domen katalitycznych, jak i wiążących celulozę, jest prawdopodobnie efektem bliskiego sąsiedztwa celulozy i hemiceluloz w tkankach roślinnych. Domeny wiążące substrat prawdopodobnie nie służą jedynie adsorpcji enzymu do substratu, ale mogą też powodować rozrywanie krystalicznej struktury substratów.

Obecność domeny wiążącej celulozę jest głównym czynnikiem wpływającym na zdolność hemicelulaz do adsorpcji na powierzchni włókna drzewnego. Stwierdzono, że adsorpcja β -mannanazy z *T. reesei* zawierającej domenę wiążącą substrat wynosiła 90%, podczas gdy adsorpcja ksylanazy nie posiadającej takiej domeny była niższa o 20%. Suszenie włókien drewna drastycznie obniża wydajność adsorpcji mannanaz oraz innych hemicelulaz. Wilgotne włókna adsorbują od dwóch do trzech razy więcej enzymu niż włókna raz suszone (51).

7. Możliwości zastosowania enzymów mannanolitycznych

Poznanie właściwości enzymów mannanolitycznych, ich izolacja i oczyszczenie, mają duże znaczenie, ze względu na możliwość praktycznego ich wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu. Jednym z ważniejszych jest przemysł celulozowo-papierniczy, gdzie hemicelulazy mają zastosowanie podczas produkcji wysokiej jakości papieru (53).

Jakość papieru zależy przede wszystkim od czystości mas celulozowych i ilości zawartych w nich zanieczyszczeń ligninowo-hemicelulozowych, które są odpowiedzialne za żółknięcie papieru. Mimo że istnieje kilka chemicznych metod oczyszczania mas celulozowych z zanieczyszczeń ligninowo-hemicelulozowych, to, jak się wydaje, metody enzymatycznej degradacji hemiceluloz i ligniny mogą znacznie polepszyć jakość produkowanego papieru. Wytwarzanie pulpy drzewnej metodami biologicznymi stwarza alternatywę dla obecnie stosowanych technik, pociągających za sobą degradację środowiska i wysokie koszty. Ponieważ dotychczas nie są znane metody chemiczne pozwalające na selektywne usuwanie hemiceluloz z mas celulozowych, tak by nie następowało równoczesne naruszenie struktury celulozy, bada-

nia nad wykorzystaniem do tego celu enzymów hemicelulitycznych (m.in. mannanaz) nabierają szczególnego znaczenia.

Enzymy mannanolityczne można także zastosować w przemyśle spożywczym, np. w produkcji kawy rozpuszczalnej i klarowaniu soków owocowych. Głównymi składnikami frakcji polisacharydowej zielonych nasion kawy są arabinogalaktan, mannan i celuloza (54). Najważniejszym polisacharydem tej frakcji jest nierozpuszczalny w wodzie, krystaliczny mannan, stanowiący 20-30% suchej masy nasion kawy Arabika i Robusta (55). Obecność mannana powoduje wysoką lepkość ekstraktu kawy w procesie jego zagęszczania przed suszeniem i liofilizacją. Obniżenie lepkości ekstraktu przez rozkład zawartego w nim mannana przy użyciu mannanaz znacznie upraszcza produkcję kawy rozpuszczalnej dając w wyniku poprawę wydajności zagęszczania ekstraktu, a tym samym znaczną redukcję kosztów suszenia (54). Z kolei lepkie roztwory wysokocząsteczkowych mannarów i galaktomannarów są często wykorzystywane w przemyśle spożywczym w charakterze zagęstników (56).

Ważne praktyczne wykorzystanie mannanazy polega na jej użyciu w środkach piorących do enzymatycznego usuwania zanieczyszczeń spożywczych zawierających mannany, które w żywności występują często jako stabilizatory lub zagęstniki (57).

α -Galaktozydaza jest kolejnym enzymem znajdującym liczne zastosowania w przemyśle. Podobnie jak inne enzymy mannanolityczne może być wykorzystywana w przemyśle papierniczym, gdzie zwiększa efektywność procesu degradacji hemiceluloz (7). Enzym ten może być również stosowany do produkcji pasz sojowych (58). Nasiona roślin strączkowych zawierają znaczne ilości takich oligosacharydów jak melibioza, rafinoza, stachioza i werbaskoza, które ze względu na obecność wiązań α -1,6-glikozydowych, nie są rozkładane w przewodzie pokarmowym zwierząt i człowieka. Wstępna hydroliza α -galaktozydów nasion soi z udziałem α -galaktozydazy pozwoliłaby na pełniejsze wykorzystanie tego składnika paszy oraz uniknięcie dolegliwości układu pokarmowego. Ponadto, enzym ten jest stosowany w produkcji cukru buraczanego, gdzie służy do usuwania rafinozy – oligosacharydu hamującego prawidłową krystalizację sacharozy.

Za interesujące należy uznać zastosowanie β -glukozydazy w przemyśle winiarskim. Enzym ten poprzez hydrolizę glikozydów monoterpenujących w winie, powoduje wzmocnienie smaku i aromatu (59). Znaczenie ma także użycie β -glukozydazy w procesie konwersji glikozydów fenolowych zawartych w wycieczynach żurawinowych (60). Powstające w wyniku tego procesu wolne fenole i kwasy fenolowe mogą być efektywnie wykorzystane jako naturalne antyoksydanty (61), których pozytywny wpływ na zdrowie człowieka został dobrze udokumentowany.

8. Zakończenie

Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa wynika, że enzymatyczna hydroliza mannanów pochodzenia roślinnego oraz wykorzystanie zasobów cukrowych tkwiących w tych biopolimerach stanowi nadal aktualny i ważny problem biotechnologiczny. Jego rozwiązanie może przynieść duże korzyści ekonomiczne w przemyśle celulozowo-papierniczym, fermentacyjnym, paszowym i spożywczym. W ostatnich latach dokonał się duży postęp w oczyszczaniu mannanaz, poznaniu ich struktury molekularnej oraz zbadaniu genów odpowiedzialnych za ich syntezę. Wiele uwagi poświęcono również określeniu zarówno liczby, jak i właściwości enzymów mannanolitycznych oraz ich adsorpcji do włókien drewna. Jednak dotychczas niewiele jest doniesień na temat oddziaływań synergistycznych pomiędzy poszczególnymi enzymami kompleksu mannanolitycznego. Badania te zmierzają do lepszego zrozumienia mechanizmów regulacji syntezy mannanaz, poprawy ich stabilności oraz otrzymania genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów, które będą szybciej i wydajniej produkowały te enzymy w skali technicznej.

Literatura

1. Szczodrak J., Fiedurek J., (1996), *Biomass and Bioenergy*, 10, 367-375.
2. Sachslehner A., Haltrich, D., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 177, 47-55.
3. Tenkanen M., Makkonen M., Perttula M., Viikari L., Telman A., (1997), *J. Biotechnol.*, 57, 191-204.
4. Stoll D., Stålbränd H., Warren R. A. J., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2598-2605.
5. Eriksson K. E., Blanchette R. A., Ander P., (1990), *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood Components*, Ed. T. E. Timell, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, 1-399.
6. Sjöström E., (1981), *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, Ed. E. Sjöström, Acad. Press, New York, 1-223.
7. Brumer H., Sims P. E. G., Sinnot M. L., (1999), *Biochem. J.*, 39, 125-129.
8. Sims I. M., Craik D. I., Basic A., (1997), *Carbohydr. Res.*, 303, 79-92.
9. Capek P., Kubačková M., Alföldi J., Bilisics L., Lišková D., Kákoniová D., (2000), *Carbohydr. Res.*, 329, 635-645.
10. Dutta S., Bradford K. I., Nevins D. J., (1994), *Plant Physiol.*, 104, 623.
11. Sakurai N., Tanaka S., Kuraishi S., (1987), *Plant Cell Physiol.*, 28, 1051.
12. Cescutti P., Campa C., Delben F., Rizzo R., (2002), *Carbohydr. Res.*, 337, 2505-2511.
13. Coutinho P. M., Henrissat B., (1999), *Carbohydrate Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>*
14. Sachslehner A., Nidetzki B., Kulbe K. D., Haltrich D., (1998), *Appl. and Environ. Microbiol.*, 64, 594-600.
15. Harjunpää V., Telemann A., Siika-aho M., Drakenberg T., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 234, 278-283.
16. Arcand N., Kluepfel P., Paradis F. W., Morosoli R., Shareck F., (1993), *Biochem. J.*, 290, 857-863.
17. Ademark P., Varga A., Medve J., Harjunpää V., Drakenberg T., Tjerneld F., Stålbrand H., (1998), *J. Biotechnol.*, 63, 199-210.
18. Arisan-Atac I., Hodits R., Kristufek D., Kubicek C. P., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 58-62.
19. Zakaria M. M., Yamamoto S., Yagi T., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 158, 25-31.
20. Tamaru Y., Araki T., Amagoi H., Mori H., Morishita T., (1995), *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61, 12, 4454-4458.

21. Zhang J., He Z., Hu K., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1375-1378.
22. Stålbränd H., Saloheimo A., Vehmaanperä J., Henrissat B., Penttilä M., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 1090-1097.
23. Halstead J. R., Vercoe P. E., Gilbert H. J., Davidson K., Hazlewood G. P., (1999), *Microbiology*, 145, 3101-3108.
24. Sunna A., Gibbs M. D., Chin C. W. J., Nelson P. J., Berquist P. L., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 664-670.
25. Ademark P., Lundquist J., Hagglund P., (1999), *J. Biotechnol.*, 75, 281-289.
26. deVries R., Visser J., (2001), *Mol. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 497-522.
27. Neustroev K. N., Krylow A. S., Firsov L. M., Abraskina O. N., Khorlin A. Y., (1991), *Biokhimiya*, 56, 1406-1413.
28. van Pelt J., Hokke C. H., Dorland L., Duran M., (1992), *Int. J. Biochem.*, 24, 669-673.
29. Alkhayat A. H., Kraemer S. A., Leipprand J. R., Macek M., Kleijer W. J., Friderici K. H., (1998), *Hum. Mol. Genet.*, 7, 75-83.
30. Bauer M. W., Bylina E. J., Swanson R. V., Kelly R. M., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 23749-23755.
31. Kulminskaya A. A., Eneiskaya E. V., Isaeva-Ivanova L. S., Save'ev A. N., Sidorenko I. A., Shabalin K. A., Golubev A. M., Neustroev K. N., (1999), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 25, 372-377.
32. Chuang N.-N., Yang B.-C., (1991), *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B, 4, 627-630.
33. Kurakake M., Komaki T., (2001), *Current Microbiol.*, 42, 377-380.
34. Ademark P., deVries R. P., Stålbränd H., Visser J., (2001), *Eur. J. Biochem.*, 268, 2982-2990.
35. Dey P. M., Pridham J. B., (1972), *Adv. Enzymol.*, 36, 91-130.
36. King M. R., Yermool D. A., Eveleigh D. E., Chassy B. M., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 163, 37-42.
37. Topaloglu A. K., Ashley G. A., Tong B. Z., Shabber J., Astrin K. H., Eng C. M., Desnick R. J., (1999), *Mol. Med.*, 5, 806-811.
38. Zapater I. G., Ullah A. H., Wodzinski R. J., (1990), *Prep. Biochem.*, 20(3-4), 263-296.
39. Ademark P., Larsson M., Tjerneld F., Stålbrand H., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 441-448.
40. Puchart V., Vrsanská M., Bhat M. K., Biely P., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1524, 27-37.
41. Liebl W., Wagner B., Schellhase J., (1998), *Syst. Appl. Microbiol.*, 21, 1-11.
42. Cao W., Crawford D. L., (1993), *Can. J. Microbiol.*, 39, 125-129.
43. Decker C. H., Visser J., Schreier P., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4929-4963.
44. Cai Y. J., Buswell J. A., Chang S. T., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 122-129.
45. Lin J., Pillay B., Singh S., (1999), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 81-87.
46. Marri L., Valentini S., Venditti D., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 128, 135-138.
47. Crombie H. J., Chengappa S., Hellyer A., Reid J. S. G., (1998), *The Plant Journal*, 15(1), 27-38.
48. Fowler T., (1993), *Biocatalyst Design For Stability And Specificity*, 19, 233-242.
49. Kreminsky L., Biely P., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1427, 560-566.
50. Mach R. L., Seiboth B., Myasnikov A., Gonzalez R., Strauss J., Harkki A. M., Kubicek C. P., (1995), *Mol. Biol.*, 16(4), 687-697.
51. Gerber P. J., Heitmann J. A., Joyce T. W., Buchert J., Siika-aho M., (1999), *J. Biotechnol.*, 67, 67-75.
52. Tomme P., Warren R. A. J., Miller R. C. Jr., Kilburn D. G., Gilkes N. R., (1995), *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, 142-165, American Chemical Society Washington D.C.
53. Siika-aho, Buchert J., Vuorinen T., Teleman A., Viikari L., (1996), Patent nr 95607, VTT.
54. Sachslehner A., Foidl G., Foidl N., Gübitz G., Haltrich D., (2000), *J. Biotechnol.*, 80, 127-134.
55. Bradbury A. G., Halliday D. J., (1990), *J. Agric. Food Chem.*, 38, 389-392.
56. Tombs M., Harding S. E., (1998), *An Introduction to Polysaccharide Biotechnology*, Taylor and Francis, London.
57. McCoy M., (2001), *Chem. Eng. News.*, 20, 19-32.
58. Kotwal S. M., Gote M. M., Sainher S. R., Khan M. I., Khire J. M., (1998), *Process Biochem.*, 33, 337-343.
59. Shashayov O., Bravdo B. A., Ikon R., (1988), *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1387-1390.
60. Zheng Z., Shetty K., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 895-900.
61. Bocco A., Cuvelier M. E., Richard H., Berset C., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2123-2129.