



## Postępy w enzymatycznej syntezie oligosacharydów katalizowanej przez endoglikozydazy

Alicja Buchowiecka, Stanisław Bielecki

Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka, Łódź

### Recent Advances in Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides Catalyzed by Endoglycosidases

#### Summary

The review is focused on recent advances in the enzymatic synthesis of oligosaccharides catalysed by endoglycosidases. Four types of applicable donors (oligo- and polysaccharides, oligosyl fluorides, distorted substrates, glycopeptides) have been presented. Additionally enzymatic glycosylation of glycals by endoacting glycosidases has been discussed. The work contains 42 references appeared mainly after 1996.

#### Key words:

endoglycosidases, enzymatic oligosaccharides synthesis, transglycosylation, enzymatic polymerisation.

### 1. Wstęp

Glikozylowane białka i lipidy odgrywają zasadniczą rolę w wielu procesach molekularnych związanych z biologią eukariotów, w tym także z procesami zmian chorobowych (1-3). Postęp wiedzy, zmierzającej do pełnego wyjaśnienia fizjologicznej roli sacharydów występujących w glikopojączeniach oraz przemian jakim one podlegają, w znacznej mierze zależy od szerszego dostępu do zdefiniowanych pod względem struktury oligosacharydów, ich pochodnych czy analogów strukturalnych. Stąd stała potrzeba poszukiwania nowych sposobów otrzymywania takich związków. Oprócz coraz efektywniejszych metod chemo-

#### Adres do korespondencji

Alicja Buchowiecka,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź.

**biotechnologia**

2 (49) 174-183 2000

enzymatycznych stosowane są metody syntezy enzymatycznej, głównie z użyciem specyficznych glikozylotransferaz (4-9). Zastosowanie tych enzymów na szerszą skalę jest jednak ograniczone wysokimi kosztami zarówno samych biokatalizatorów jak i ich substratów. Niektóre hydrolazy glikozydowe, tańsze i łatwiej dostępne, stosuje się z powodzeniem jako enzymy syntetyzujące. Dotychczas wykorzystywano głównie egzoglikozydazy, zwłaszcza dostępne komercyjnie.

Literatura dotycząca badań nad zastosowaniem endoglikozydaz w syntezie oligosacharydów jest mniej liczna, niż ta dotycząca egzoglikozydaz (10). Składa się na to kilka przyczyn. Główną z nich jest niska dostępność dostatecznie czystych preparatów tych enzymów, wolnych od zanieczyszczeń egzoglikozydazami, co jest koniecznym warunkiem do prawidłowej interpretacji wyników badań eksperymentalnych. Dodatkowo trudności wynikają z większej złożoności przemian katalizowanych przez endoglikozydazy, prowadzących do powstawania trudnych do rozdzielenia mieszanin produktów. W opublikowanych do tej pory pracach opisano niektóre endoglikozydazy jako katalizatory reakcji transglikozylacji. Nie opisano dotąd zastosowania tych enzymów w reakcji odwrotnej hydrolizy. Jednak taka możliwość jest dopuszczana przez Rastalla i wsp. (11).

## 2. Transglikozylacja katalizowana przez endoglikozydazy

Ostatnio opisano wiele nowych endoglikozydaz, które wykorzystane były w reakcjach transglikozylacji do syntezy cząsteczek o złożonej budowie i interesujących właściwościach biologicznych. W reakcjach tych stosuje się zróżnicowane strukturalnie specyficzne donory.

### 2.1. Transglikozylacja z udziałem polimerycznych donorów

W artykule przeglądowym (10) opublikowanym w roku 1994, Zwiagincewa i Eljakowa podsumowują wyniki wieloletnich badań nad endo- $\beta$ -1,3-glukanazami morskich bezkręgowców *Spisula sachalinensis*, *Chlamys albidus* i *Patinopecten yessoensis*. Niektóre z tych enzymów zostały wyizolowane, oczyszczone i dokładnie scharakteryzowane. Oprócz właściwego sobie działania hydrolitycznego w stosunku do  $\beta$ -1,3-glukanów, przejawiają one silne działanie transglikozylacyjne. Dobrym donorem dla opisanych enzymów jest, jak się okazało, pochodzący z różnych źródeł laminaran. Właściwości akceptorowe przejawiały różne metylowe glikozydy zestawione w tabeli 1.

Właściwości akceptorowe zależą głównie od budowy glikonu. Najlepsze, jak się okazało, są struktury ze zmodyfikowaną glukozą: 2-O-Me- $\alpha$ -D-Glc i  $\alpha$ -D-Qui (6-deoksy- $\alpha$ -D-Glc), które ulegały transglikozylacji z wydajnością  $\sim$  50%. Pozostałe wydajności dla akceptorów 3-9 mieściły się w granicach 20-30% molowych, a akceptory



10-18 nie ulegały glikozylacji. Konfiguracja aglikonu nie miała dużego wpływu na wydajność. p-nitrofenylowe glikozydy były nieco lepszymi akceptorami od metylo- wych. Produkty były oligosacharydami o stopniu polimeryzacji 2-5. Jeden ze zbadanych enzymów przejawiał specyficzną w tworzeniu wiązania  $\beta$ -1,3-glikozydowego. Inny powodował powstawanie produktów  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,4-glikozylacji w zbliżonych ilościach. Transglikozylacji ulegały także niektóre ważne z farmakologicznego punktu widzenia naturalne glikozydy, np. pochodne hydroksynaftochinonów, jak również wiele alkoholi niecukrowych.

Tabela 1

Glikony metylo- wych glikozydów zastosowanych jako akceptory w reakcjach transglikozylacji katalizowanych przez endo- $\beta$ -1,3-glukanazy z morskich bezkręgowców (wg 10)

Dobre akceptory		Słabe akceptory	
1	2-O-Me- $\alpha$ -D-Glc	10	$\alpha$ -D-Gal
2	$\alpha$ -D-Qui	11	$\alpha$ -L-Fuc
3	$\beta$ -D-Glc	12	$\alpha$ -D-Man
4	$\alpha$ -D-Glc	13	$\alpha$ -D-Lyx
5	$\alpha$ -D-GlcNAc	14	4-O-Me- $\beta$ -D-Xyl
6	6-O-Me- $\alpha$ -D-GlcNAc	15	$\alpha$ -L-Rha
7	$\alpha$ -D-Xyl	16	$\beta$ -L-Rha
8	$\beta$ -D-Xyl	17	$\alpha$ -L-Araf
9	2-O-Me- $\beta$ -D-Xyl	18	$\alpha$ -L-Ara

Stosowane w artykule skróty nazw sacharydów są zgodne z obowiązującymi zaleceniami (42).

W swych najnowszych artykułach Eljakowa i Zwiagincewa i wsp. (12,13) podały struktury produktów glikozylacji p-nitrofenyloglukozydu pod wpływem wspomnianych endo- $\beta$ -1,3-glukanaz. Donorami w reakcjach transglikozylacji były  $\beta$ -1,3-laminarany o zróżnicowanej liczbie rozgałęzień poprzez wiązania  $\beta$ -1,6-glikozydowe oraz otrzymane z nich 1,3;1,6- $\beta$ -D-glukooligosacharydy o stopniach polimeryzacji 5 i 6. W rezultacie otrzymywano mieszaniny p-nitrofenylo- $\beta$ -1,3-laminaraoligosacharydów o stopniu polimeryzacji od 2 do 6 oraz, co jest bardziej interesujące, mieszaniny rozgałęzionych p-nitrofenylo-1,3;1,6- $\beta$ -D-glikozydów o tym samym stopniu polimeryzacji. Łączna wydajność syntezy glikozydów sięgała 30%.

W innej pracy (14) opisano wykorzystanie homogennej endo- $\beta$ -1,3-glukanazy  $G_A$  z *Cellulomonas cellulans* (dawniej *Oerskovia xanthineolytica*), w reakcjach transglikozylacji. Enzym ten wykazuje szeroką specyficzną w stosunku do akceptora (15). Spośród 34 przebadanych akceptorów w postaci syntetycznych i naturalnych  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozydów oraz glikali, 18 ulegało enzymatycznej glikozylacji. Transglikozylacja zachodziła w obecności acetonitrylu z laminaranem jako pierwotnym donorem. Naj-

lepszym akceptorem, jak się okazało, był p-nitrofenylo- $\beta$ -D-ksylopiranozyd, który już po 3 godzinach ulegał  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,4-glikozylacji ( $\sim$ 1:1) z wydajnością 68%. Wysoką wydajność procesu powiązano ze sformułowaną w pracy koncepcją resyntezy donorów.

Wiadomo, że laminaran pod działaniem endoglukanazy  $G_A$  ulega hydrolytycznemu rozszczepianiu do laminaraoligosacharydów o różnym stopniu polimeryzacji, z laminarabiozą jako produktem końcowym. W niezależnie przeprowadzonym eksperymencie stwierdzono, że laminarabioza w obecności acetonitrylu i glukanazy  $G_A$  daje mieszaninę glukozy, laminarabiozy, laminaratriozy i laminaratetraozy. Bez dodatku acetonitrylu laminarabioza nie ulega przemianie. Dowodzi to istnienia zjawiska resyntezy, tj. powstawania z krótkich laminaraoligosacharydów cząsteczek o dłuższych łańcuchach (14). Podobne zjawisko było obserwowane dla cellobiozy inkubowanej z pleśniową celulazą w obecności acetonitrylu (16)

$\beta$ -1,3-specyficzna resynteza dostarcza efektywniejsze donory dla reakcji transglikozylacji katalizowanej przez  $G_A$  i jest dodatkową siłą napędową procesu syntezy.

Zbieżna tematyka jest zawarta w japońskim patencie (17) z 1997 r., który dotyczy zastosowania nowych enzymów w syntezie oligosacharydów poprzez proces transglikozylacji. Za akceptory służyły fenylowe, p-nitrofenylowe i p-hydroksyfenylowe  $\alpha$ - i  $\beta$ -D-glukozydy, donorami były  $\beta$ -1,3-glukany, a enzymy zostały wyodrębnione ze *Streptomyces* sp. DIC-108 i obejmowały: sterolową  $\beta$ -D-glukozylotransferazę (SGTaza), kitalazę lub Doricellazę (celulazę). Reakcje według opisu patentowego prowadzą do produktów  $\beta$ -1,3-transglikozylacji o stopniu polimeryzacji od 2 do 10, które wykazują istotne cechy użytkowe.

W innym opisie patentowym (18) wspomniano ogólnie o możliwości zastosowania endoglukanaz i oligo- lub polisacharydów w reakcjach transglikozylacji prowadzonych w warunkach wysokiego nasycenia środowiska akceptorem.

Maltooligosacharydy i cyklomaltooligosacharydy są  $\alpha$ -1,4-glukanami, które zostały użyte jako donory w reakcjach transglikozylacji katalizowanych przez endo- $\beta$ -1,4-glukanazy pochodzące z różnych źródeł (19-22). Enzymy te przenoszą krótkie (1-4-cukrowe) fragmenty donora na typowe akceptory, np. p-nitrofenylowe glikozydy tworząc wiązania  $\alpha$ -1,4- (19,20,22) i  $\alpha$ -1,3-glikozydowe (20).

Fujimoto i wsp. (23) opisuje reakcję transglikozylacji katalizowaną przez endo- $\beta$ -1,4-galaktanazę. Donorem dla enzymu był arabinogalaktan, a akceptorami p-nitrofenylowe i metylowe  $\alpha$ - i  $\beta$ -galaktozydy. Produktami  $\beta$ -1,4- i  $\beta$ -1,3-galaktozylacji, jak się okazało, były mieszaniny krótkich di- i trisacharydowych glikozydów.

Inne ważne biopolimery: chondroityna, 4-siarczan chondroityny i 6-siarczan chondroityny, zostały opisane ostatnio jako donory w reakcjach transglikozylacji katalizowanych przez endo- $\beta$ -N-acetyloheksozaminidazę. Produktami reakcji były hybrydowe okta-, deka- i dodekaglikozoaminoglikany (GAG) posiadające w strukturze 6-sulfonowane (GalNAc6S), 4-sulfonowane (GalNAc4S) i niesulfonowane reszty N-acetylogalaktozoaminy (24).



## 2.2. Transglikozylacja z udziałem fluorków glikozylowych

Interesującą grupą substratów dla endoglikanaz w reakcjach transglikozylacji, jak się okazało, są fluorki biozylowe (25). Pod wpływem specyficznych enzymów związki te glikozylują różne akceptory, a także ulegają oligo- i polimeryzacji. Tak zatem  $\beta$ -cellobiozylowy fluorek  $\text{Glc}\beta\text{1-4Glc}\beta\text{-F}$  poddany działaniu celulaz z *T. viride*, *A. niger*, *P. tulipiferae* w mieszaninie  $\text{CH}_3\text{CN}$ /bufor octanowy ulega regiospecyficjnej  $\beta$ -1,4-polimeryzacji z wydajnością aż 64% (10). Powstaje tzw. syntetyczna celuloza o stopniu polimeryzacji nie mniejszym od 22. W tych samych warunkach  $\alpha$ -cellobiozylowy fluorek nie ulega żadnej przemianie, natomiast  $\beta$ -laktozylowy fluorek  $\text{Gal}\beta\text{1-4Glc}\beta\text{-F}$  ulega ilościowej hydrolizie do D-laktozy. W obecności glukopiranozydów i celulaz fluorek  $\beta$ -laktozylu daje produkty  $\beta$ -1,4-laktozylacji (26,27).

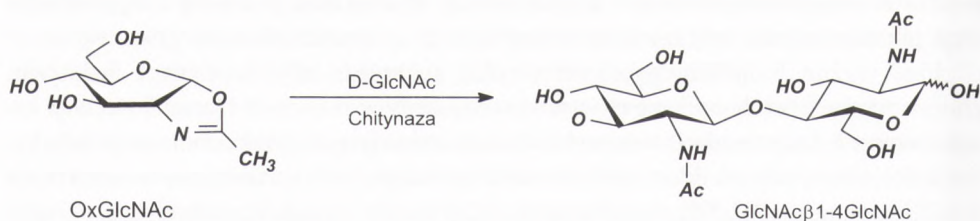
Inny donor  $\text{Xyl}\beta\text{1-4Glc}\beta\text{-F}$  pod wpływem endoksylationazy z *Trichoderma viride* ulega  $\beta$ -1,4-specyficjnej polimeryzacji (28) do oligomerów o stopniu polimeryzacji nie przekraczającym 24. Podobnie zachowuje się  $\text{Glc}\beta\text{1-4Xyl}\beta\text{-F}$  (28). Kilka publikacji (29-31) dotyczy  $\beta$ -laminarabiozylowego fluorku  $\text{Glc}\beta\text{1-3Glc}\beta\text{-F}$ , który jest donorem w reakcjach  $\beta$ -1,4-transglikozylacji i oligomeryzacji wywołanej stabilną endo-1,3-(1,4)- $\beta$ -glukanazą *Bacillus licheniformis*. Produkty reakcji mające różne sekwencje wiązań  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4 są użyteczne w badaniach specyficzności endoglikozydaz.

## 2.3. Glikozylacja z udziałem konformacyjnie odkształconych donorów

Omówione w częściach 2.1 i 2.2 donory dla endoglikozydaz nie różnią się istotnie od używanych w reakcjach z egzoglikozydazami – są tylko „przedłużone” o jedną, lub więcej reszt glikozylowych.

Od niedawna w kilku laboratoriach na świecie jest badana nowa klasa donorów dla endoglikozydaz konformacyjnie zbliżonych do glikali, nadzwyczaj interesująca z teoretycznego i praktycznego punktu widzenia (32,33).

Przykładem donorów nowej klasy tzw. odkształconych substratów (*distorted substrates*) jest związek  $\text{OxGlcNAc}$  (32), który może być rozpatrywany jako produkt cyklodehydratacji D-GlcNAc (rys. 1). W strukturze tej, naprężenie wywołane wiąza-



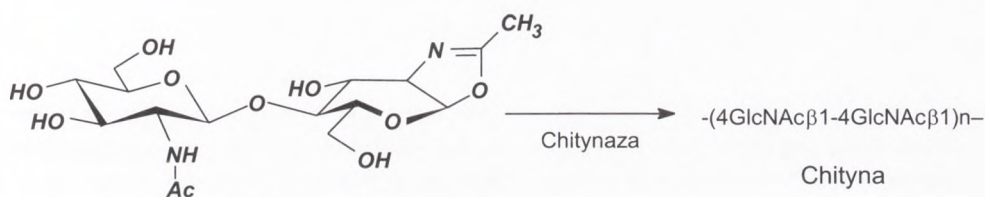
OxGlcNAc: 2 metylo-4,5-dihydro-(1,2-dideoksy- $\alpha$ -D-glukopiranozo)[2,1-d]-1,3-oksazol

Rys. 1. Enzymatyczna synteza N,N'-diacetylchitobiozy (wg 31).

niem podwójnym w pierścieniu 1,3-oksazolu jest przenoszone poprzez 1,2-cis złącze na większy pierścień, powodując jego konformacyjne odkształcenie w porównaniu z formą  ${}^4C_1$  w D-GlcNAc. Pojawia się w ten sposób geometryczne podobieństwo OxGlcNAc do molekularnej struktury stanu przejściowego obserwowanej podczas enzymatycznej hydrolizy chityny. Energia swobodna aktywacji OxGlcNAc obniża się, a reakcja glikozylacji D-GlcNAc przebiega łatwo.

W cytowanej pracy donor w obecności 3-krotnego molowego nadmiaru akceptora w buforze cytrynowym o pH 7,8, traktowano chitynazą z *Bacillus* sp. przez 6 godzin w temperaturze 25°C. Po acetytacji surowego produktu, wyodrębniono czysty heksaoctan N'-diacetylochitobiozy z wydajnością 43%. Nie powstają inne regio- i stereoizomery.

Równie interesującym przykładem jest proces enzymatycznej syntezy chityny (33).



Rys. 2. Enzymatyczna  $\beta$ -1,4-poliaddycja GlcNAc $\beta$ 1-4OxGlcNAc (wg 32).

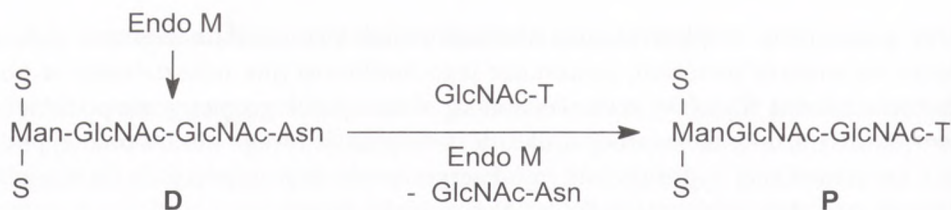
W reakcji tej (rys. 2) użyto jako donora oksazolinowej pochodnej chitobiozy GlcNAc $\beta$ 1-4OxGlcNAc z odkształconym pierścieniem jak w przypadku pochodnej OxGlcNAc (rys. 1). Pod wpływem chitynazy w buforze fosforanowym o pH 10,6 następuje  $\beta$ -1,4-poliaddycja. Powstaje syntetyczna chityna o masie cząsteczkowej powyżej 40 kDa. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że polimeryzacja jest możliwa w takim pH, w którym hydroliza produktu jest kompletnie zahamowana (optimum pH działania dla stosowanej chitynazy wynosi 7,8).

Prawdopodobnie w bliskiej przyszłości dostarczone zostaną dalsze przykłady rozwoju tej nowatorskiej koncepcji syntezy oligosacharydów.

#### 2.4. Transglikozylacja z udziałem glikopeptydów jako donorów

Jeszcze jeden spektakularny przykład zastosowania drobnoustrojowej endoglikozydazy został opublikowany przez K. Yamamoto i wsp. w roku 1998 (34). Autorzy wyodrębnili z hodowli *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazę (EC 3.2.1.96). Enzym hydrolizuje N'-diacetylochitobiozydowe wiązania w oligosacharydach połączonych z resztą kwasu asparaginowego (Asp) różnych glikoprotein i glikopeptydów, pozostawiając jedną resztę N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) na prote-





Rys. 3. Transglikozylacja glikopeptydu T z użyciem glikopeptydowego donora D (wg 33).

Oznaczenia :

D – glikopeptydowy donor oligosacharydowego łańcucha,

GlcNAc-T – akceptor,

P – produkt transglikozylacji,

Endo-M – endo- $\beta$ -N-acetyloglukozaminidaza *Mucor hiemalis*,

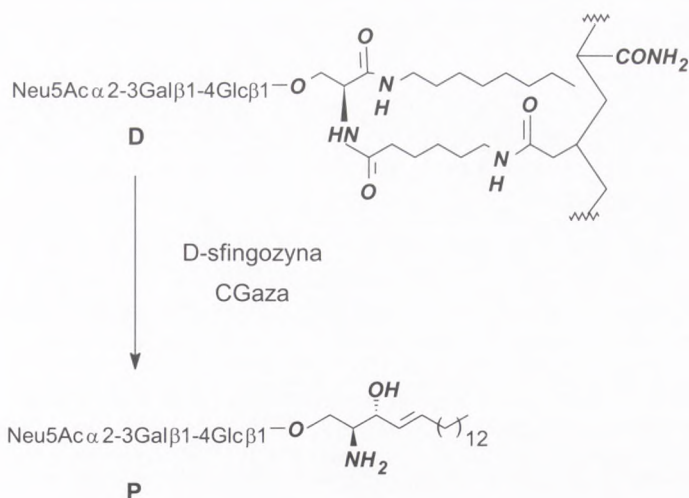
T – H-Ala-Ser-Thr-Thr-Tre-Asn-Tyr-Thr-OH – peptyd T,

S – NeuAc-Gal-GlcNAc-Man-.

inowym czy peptydowym fragmencie. Enzym wykazuje również właściwości transglikozylacyjne i może przenosić oligosacharydy z glikopeptydów na odpowiednie akceptory mające w swojej strukturze fragment GlcNAc.

Na rysunku 3 przedstawiono schemat zastosowania endoglikozydazy M w transglikozylacji peptydu T. Peptyd ten jest biologicznie aktywny i potrafi blokować infekcję ludzkich komórek T przez wirus HIV. Jako donora D został użyty glikopeptyd otrzymany z ludzkiej transferyny. Produkt transglikozylacji uzyskano z wydajnością 16%. Produkt ten wykazywał wysoką odporność na działanie enzymów proteolitycznych. W zbliżonej tematycznie pracy (35), inna grupa autorów przeprowadziła transglikozylację  $\alpha$ -D-GlcNAc-pNP stosując endo- $\beta$ -N-acetyloglukozaminidazę (oznaczoną jako Endo-A) *Arthrobacter protophormiae* oraz Man<sub>6</sub>-GlcNAc-GlcNAc-Asn jako donora. Produkt reakcji otrzymany z wydajnością 75% jest nowym odczynnikiem do oznaczania aktywności endo- $\beta$ -N-acetyloglukozaminidazy.

Przykłady nowej strategii w kombinatoryjnej syntezie glikolipidowych pochodnych opublikowali Yamada i wsp. (36). Uzyskali oni syntetyczny glikopolimer posiadający linkery o strukturze ceramidu. Związek ten jest rozpoznawany przez  $\alpha$ (2-3)-N-sjalilową transferazę jako glikoproteina i w obecności CMP-Neu5Ac ulega transglikozylacji. Uzyskany nowy pseudoglikopeptyd jest wykorzystywany jako donora D przez ceramidową glikanazę (CGazę), która przenosi fragment cukrowy na D-sfingozynę (rys. 4). Powstały sfingoglikolipid P zawiera wolną grupę aminową, umożliwiającą dalsze modyfikacje struktury i otrzymywanie nowych glikolipidowych pochodnych.



Rys. 4. Transglikozylacja D-sfingozyny z użyciem pseudoglikopeptydowego donora D (wg 35).

Oznaczenia :

D – syntetyczny pseudoglikopeptydowy donor oligosacharydowego łańcucha,

D-sfingozyna – akceptor,

P – produkt transglikozylacji : sfingoglikolipid,

CGaza – ceramidowa glikanaza (Boehringer Mannheim).

### 3. Reakcje glikali

W publikacji z 1993 r. Hiraizumi (32) opisał disacharydowy związek  $\text{Glc}\alpha 1-3$  glukal jako bardzo silny inhibitor ( $\text{IC}_{50} = 2,3 \mu\text{M}$ ) endo- $\alpha$ -D-mannozydazy pochodzącej z aparatu Golgiego nabłonka wątroby szczurzej. Jest to przykład oddziaływania glikali na katalityczne właściwości endoglikozydaz.

Pierwsza enzymatyczna glukozylacja glikali katalizowana przez endoglukanazę została opisana w 1999 r. (14). W reakcji transglikozylacji z laminaranem jako donorem i D-glukalem jako akceptorem zastosowano homogenną endo- $\beta$ -1,3-glukanazę  $G_A$  *Cellulomonas cellulans*. Otrzymano z dobrą wydajnością produkt monoglukozylacji D-glukalu. Wynik ten zasługuje na szczególną uwagę ze względu na praktyczne znaczenie glikali w syntezie organicznej (37).

Wcześniej opisane próby glukozylacji D-glukalu, w których wykorzystywano egzoglikozydazy nie powiodły się (38,39). Na uwagę zasługuje jednak opatentowana przez Withersa i wsp. (40) metoda glukozylacji D-cellobialu prowadząca do D-cellobiotrialu (31%) i D-cellobiotetralu (28%) z zastosowaniem specyficznie zmutowanej  $\beta$ -glukozydazy/galaktozydazy (AbgGlu358Ala) z *Agrobacterium* sp. (41). Należy jednakże zauważyć, że w tym przypadku glukozylacja zachodzi na fragmencie D-glukozy disacharydowego akceptora.



**Literatura**

1. Dwek R. A., (1996), *Chem. Rev.*, 96, 683-720.
2. Mammen M., Choi S-K., Whitesides G. M., (1998), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 37, 2754-2794.
3. Laine R. A., (1997), *Pure & Appl. Chem.*, 69(9), 1867-1873.
4. Wong C-H., Halcomb R.L., Ichikawa Y., Kajimoto T., (1995), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 412-432.
5. Wong C-H., Halcomb R.L., Ichikawa Y., Kajimoto T., (1995), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 521-546.
6. Gijzen H. J. M., Qiao L., Fitz W., Wong C-H., (1996), *Chem. Rev.*, 96, 443-473.
7. Watt G. M., Lowden P. A. S., Flitsch S. L., (1997), *Current Opinion In Structural Biology*, 7, 652-660.
8. Cront D. H. G., Vic G., (1998), *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 98-111.
9. Kobayashi S., (1999), *J. Polym. Sci., (A)* 37(16), 3041-3056.
10. Zwiagincewa T. N., Eljakowa Ł. A., (1994), *Bioorg. Chimija (Ros.)*, 20(5), 453-473.
11. Rastall R. A., Pikett S. F., Adlard M. W., Bucke C., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14(5), 373-378.
12. Eljakowa L. A., Bakunina I. J., Mamontowa W. A., Isakow W. W., (1998), *Bioorg. Chimia*, 24(3), 211-218.
13. Zwiagincewa T. N., Makariewa T. N., Ermakowa S. P., Eljakowa L. A., (1998), *Bioorg. Chim.*, 24(3), 219-223.
14. Buchowiecka A., (1999), *Synteza oligosacharydów przez endo-β-1,3 glukanazę Oreskovia xanthineolytica*, praca doktorska, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka.
15. Bielecki S., Buchowiecka A., (1996), *Biotechnologia*, 2(33), 184-191.
16. Kobayashi S., Kashiwa K., Kawasaki T., Shoda S., (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3079-3084.
17. Ebara T., Nishihashi H., JP 09, 295, 995[97,295,955], 18 Nov.1997, Appl. 96/110,789, 1 May 1996, (1998), *Chem. Abstr.*, 128, 34976z.
18. Nilsson K., PCT. Int. Appl. WO 91/13164, 5 Sept. 1991.
19. Bender H., (1994), *Carbohydr. Res.*, 263, 123-135.
20. Usui T., Murata T., Yabuuchi Y., Ogawa K., (1993), *Carbohydr. Res.*, 250, 57-66.
21. Ogawa K., Murata T., Usui T., (1991), *Carbohydr. Res.*, 212, 289-294.
22. Chavez R. G., David H., Metzner E. K., Sigler G. F., Winn-Deen E. S., EP 0 263 435 A2, 13 April 1988.
23. Fujimoto H., Nakano H., Isomura M., Kitahata S., Ajisaka K., (1997), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1258-1263.
24. Takagaki K., Munakata H., Majima M., Endo M., (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258, 741-744.
25. Shimizu M., Togo H., Yokoyama M., (1998), *Synthesis*, 799-822.
26. Shoda S., Kawasaki T., Obata K., Kobayashi S., (1993), *Carbohydr. Res.*, 249, 127-137.
27. Fairweather J. K., Stick R. V., Mattew D., Tilbrook G., Driguez H., (1999), *Tetrahedron*, 55, 3695-3706.
28. Fujita M., Shoda S., Kobayashi S., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6411-6412.
29. Hramova M., Fincher G. B., Viladot J-L., Planas A., Driguez H., (1998), *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3571-3576.
30. Validot J-L., Stone B., Driguez H., Planas A., (1998), *Carbohydr. Res.*, 311, 95-99.
31. Validot J-L., Mareau V., Planas A., Driguez H., (1997), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 2383-2387.
32. Hiraizumi S., Spohr U., Spiro R.G., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 9927-9935.
33. Kobayashi S., Kiyosada T., Shoda S., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 13113-13114.
34. Yamamoto K., Fujimori K., Haneda K., Mizumno M., Inazu T., Kumagai H., (1998), *Carbohydr. Res.*, 305, 415-422.
35. Takegawa K., Fujita K., Fan J-Q., Tabuchi M., Tanaka N., Kondo A., Iwamoto H., Kato I., Lee Y. C., Iwahara S., (1998), *Anal. Biochem.*, 257, 218-223.
36. Yamada K., Matsumoto S., Nishimura S.-I., (1999), *Chem. Commun.*, 507-508.
37. Danishefsky S. J., Bilodeau M. T., (1996), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 1381-1419.
38. Look G. C., Wong C-H., *Tetrah. Lett.*, 33, 4253-4256.
39. Look G. C., Ichikawa Y., Shen G. J., Cheng P. W., Wong C-H., (1993), *J. Org. Chem.*, 58, 4326-4330.
40. Withers S. G., Mackenzie L., Wang Q., PCT. Int. Appl. WO 97/21822, 19 Jun. 1997, US Appl. 08/571, 175, 12 Dec. 1995.

41. Mackenzie L. F., Wang Q., Warren R. A. J., Withers S. G., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 5583-5584.
42. Nomenclature of carbohydrates (Recommendations 1996). International Union of Pure and Applied Chemistry & International Union of Biochemistry and Molecular Biology – Joint Commission on Biochemical Nomenclature, (1996), *Pure & Appl. Chem.*, 68(10), 1919-2008.