

Enzymatyczna synteza oligosacharydów*

Stanisław Bielecki
Alicja Buchowiecka
Małgorzata Gajewska
Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka
Łódź

1. Wprowadzenie

Oligosacharydy charakteryzują się olbrzymią różnorodnością strukturalną. Cecha ta pozwala im na pełnienie wielu istotnych funkcji w żywych organizmach. Są one cząsteczkami bogatymi w informacje i kierującymi wieloma procesami biologicznymi (1). Jako składniki glikokonjugatów odpowiadają za oddziaływania między komórkami, pełnią rolę receptorów oraz determinant antygenowych (2). Oligosacharydy odgrywają również istotną rolę w rozwoju komórek roślinnych biorąc udział w procesie ich różnicowania czy też indukcji oporności na skutek inwazji grzybów patogennych (1,3-5). Właściwości funkcjonalne i fizykochemiczne oligocukrów wskazują na ogromne perspektywy praktycznego ich wykorzystania w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, a także w żywieniu i leczeniu ludzi. Takie węglowodanowe połączenia jak fruktozylo-, glukozyl-, galaktozylolaktoza wprowadzane do diety stymulują rozwój bifidobakterii, wpływając jednocześnie na obniżenie populacji mikroflory szkodliwej w przewodzie pokarmowym człowieka. Inne węglowodany, jak cyklodekstryny, trehaloza, laktuloza, frukto-, izomalto- ksylo- oligosacharydy wymieniane są jako modyfikatory żywności podnoszące jakość i trwałość produktów spożywczych, obniżające ich wartość kaloryczną, przeciwdziałające rozwojowi próchnicy i regulujące pracę jelit (6-12).

Molekularne mechanizmy tłumaczące rolę oligosacharydów są ciągle jeszcze nie wyjaśnione. Częściowo jest to spowodowane brakiem dostatecznej ilości różnorodnych i w pełni scharakteryzowanych struktur węglowodanowych.

*W jednym z następnych numerów „Biotechnologii” przedstawimy Czytelnikom kontynuację tych badań w artykule: Bielecki S., Somiari R. I., Wysocki S., „Effect of organic solvent on transglycosylation by β -fructofuranosidase in biphasic medium”.

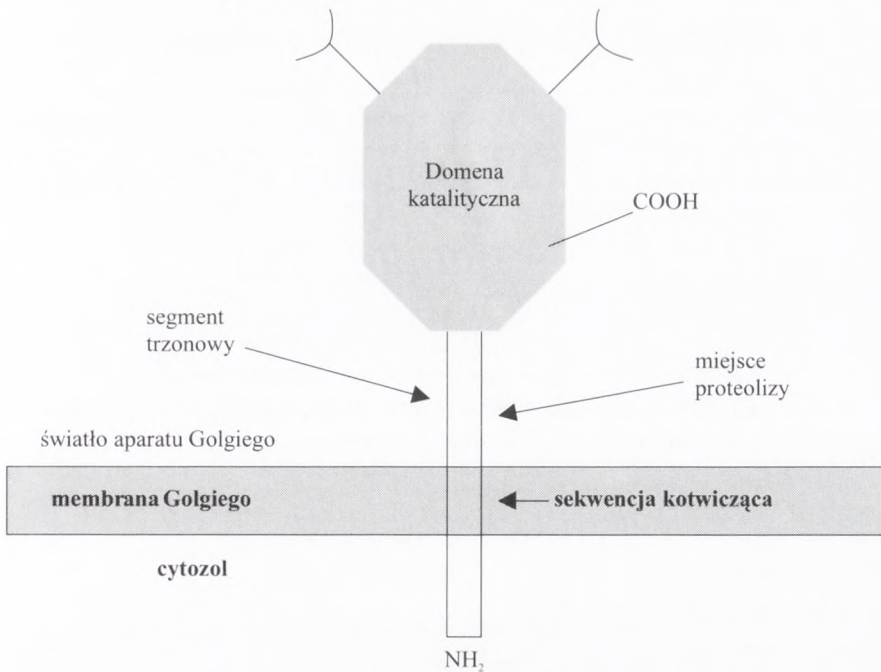
Otrzymywanie oligosacharydów z surowców roślinnych, często w procesach chemicznej hydrolizy polisacharydów, jest pracochłonne i kosztowne. Na tej drodze wytwarzane są ksyloligosacharydy, oligosacharydy z soi oraz fruktooligocukry z inuliny (13). Metody te są jednak mało specyficzne, a dodatkową ich wadą jest powstawanie uciążliwych dla środowiska zanieczyszczeń. Syntezy chemiczne oparte na polimeryzacji monocukrów w środowisku kwaśnym i przy wysokiej temperaturze są również mało specyficzne, a zarazem kosztowne (14,15). Natomiast regio- i stereospecyficzna synteza chemiczna oligocukrów jest metodą żmudną, wymagającą skomplikowanych procedur blokowania i odblokowywania reaktywnych grup hydroksylowych oraz stanowi w większej skali proces nieopłacalny.

Realną alternatywą uzyskiwania nowych oligosacharydów jest ich enzymatyczna synteza *in vitro*. Stosowanymi w niej biokatalizatorami są glikozylotransferazy ze szlaku syntezy sacharydów *in vivo*, jak i inne transferazy. Są one jednak mało dostępne i procesy syntezy przy ich udziale są kosztowniejsze w porównaniu z tanimi i łatwymi w stosowaniu glikozydazami.

2. Glikozylotransferazy

Glikozylotransferazy katalizują przenoszenie specyficznych monosacharydów z pochodnych nukleotydowych cukrów, jako donorów, na specyficzne akceptory. Donorami w tych reakcjach są fosforany nukleozydocukrowe, takie jak: UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, GDP-Man czy CMP-NeuAc, a akceptorami mogą być monosacharydy, oligosacharydy, lipidy czy reszty aminokwasowe.

Glikozylotransferazy biorące udział w procesach glikozylacji wykazują wysoką specyficzność zarówno w stosunku do donora, jak i akceptora. Są enzymami związanymi z membranami retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego. Ich stężenie w tkankach jest bardzo niskie, co powoduje znaczne trudności w otrzymywaniu tych enzymów w odpowiedniej ilości i aktywności w trakcie procesów izolacji. Enzymy te tworzą wiązania o określonej regio- i stereospecyficzności. Są one zbudowane z trzech segmentów (rys. 1) różniących się rozmiarami w zależności od enzymu (16). Segment hydrofobowy zbudowany jest z 16 do 19 reszt aminokwasowych i decyduje o związaniu enzymu z membraną aparatu Golgiego. Segment trzonowy związany jest z C-końcem domeny katalitycznej z jednej i z segmentem hydrofobowym z drugiej strony. Trzecim segmentem jest globularna, odporna na proteolizę, domena katalityczna składająca się z 300 aminokwasów. Zarówno domena katalityczna jak i segment trzonowy mogą ulegać modyfikacjom posttranslacyjnym.



Rys. 1. Transmembranowa struktura glikozylotransferaz (adaptowana z (16)).

Przeniesienie reszty cukrowej w reakcjach katalizowanych przez glikozylotransferazy jest następstwem ataku nukleofilowego akceptora na określone ugrupowanie donora. Wówczas gdy rolę nukleofilowego biorcy reszt glikozylowych pełni cukier, powstaje wiązanie glikozydowe. Reakcja taka zachodzi z zachowaniem (retencją) bądź odwróceniem (inwersją) konfiguracji atomu C1 donora. Przykładowe reakcje katalizowanych przez transferazy glikozydowe syntez oligosacharydów i ich pochodnych przedstawiono w tabeli 1.

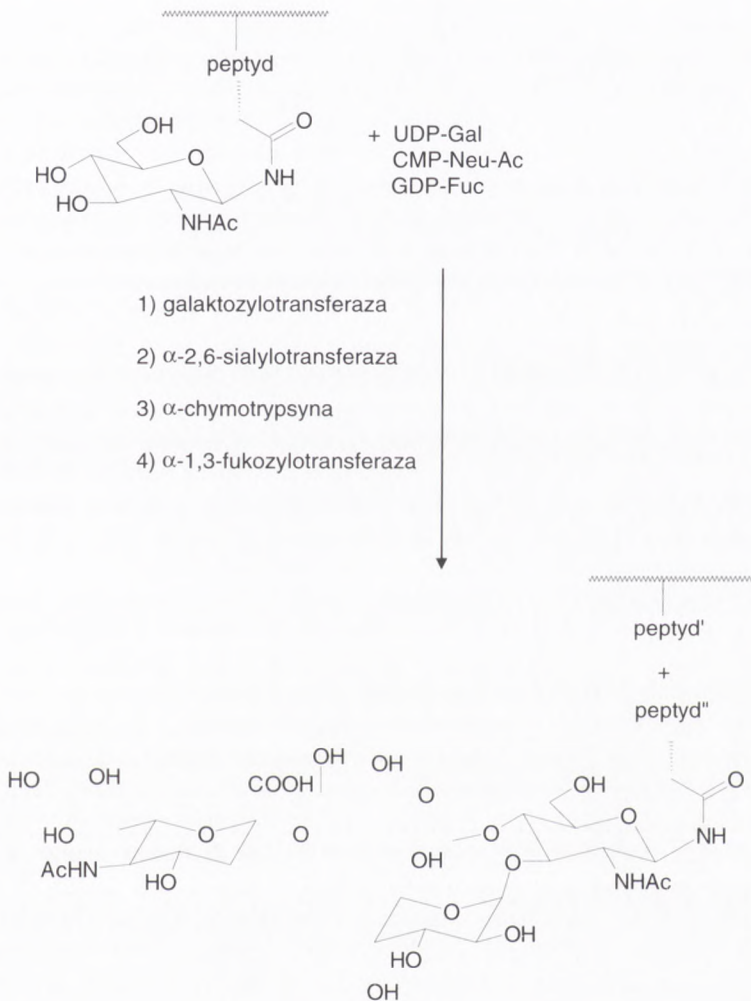
Zastosowanie glikozylotransferaz do otrzymywania oligosacharydów ma jednak ograniczenia (18-20). Należą do nich wysokie koszty aktywnych donorów reszt glikozylowych, niewielka dostępność i stosunkowo niska stabilność glikozylotransferaz. W handlu dostępnych jest tylko pięć transferaz tej grupy: β -1,4-galaktozylotransferaza, α -2,3-sialylotransferaza, α -2,6-sialylotransferaza, α -1,2-mannozylotransferaza oraz α -1,3-fukozylotransferaza V (21). Jednakże należy się spodziewać, że dzięki technologii DNA coraz więcej enzymów tej grupy będzie dostępnych do wykorzystania w syntezie oligosacharydów. Innym mankamentem stosowania tych biokatalizatorów jest inhibicja reakcji syntezy oligocukrów przez uwalniające się nukleozydofosforany. Regeneracja kofaktorów *in situ* przez zastosowanie układów wieloenzymowych pozwala na zwiększenie efektywności reakcji syntezy oligosacharydów przez glikozylotransferazy (22).

TABELA 1
 SYNTEZA OLIGOSACHARYDÓW PRZY UŻYCIU GLIKOZYLOTANSFERAZ (17)

Akceptor	Produkt	Skala procesu
<p style="text-align: center;">1</p> <p style="text-align: center;">galaktozylotransferaza (donor: UDP-Gal)</p> <p>Glc-OH</p> <p>GlcNAc-OH</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow4)-Gal-OH</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow6)-Gal-OH</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow3)-Gal-OH</p> <p>β-Glc-OCH₂C₆H₄(NO₂)-CONH-polimer</p> <p>β-Glc-(1\rightarrow4)-βGlc-OCH₂C₆H₄(NO₂)-CONH-polimer</p> <p>β-Glc-(1\rightarrow4)-βGlc-OCH₂NH₄-L-Phe-CO-polimer</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow3) \</p> <p style="padding-left: 100px;">β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcOCH₃</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow6) /</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow3) \</p> <p style="padding-left: 100px;">β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcOCH₃</p> <p>β-GlcNAc-(1\rightarrow6) /</p> <p>α-L-Fuc-(1\rightarrow6)-β-GlcNAc-O(CH₂)₈CO₂CH₃</p>	<p style="text-align: center;">2</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-Glc-H</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-GlcNAc-OH</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow4)-Gal-OH</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow6)-Gal-OH</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow3)-Gal-OH</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-Glc-OCH₂C₆H₄(NO₂)-CONH-polimer</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-Glc-(1\rightarrow4)-βGlc-OCH₂C₆H₄(NO₂)-CONH-polimer</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-Glc-(1\rightarrow4)-βGlc-OCH₂NH₄-L-Phe-CO-polimer</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow3) \</p> <p style="padding-left: 100px;">β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcOCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow6) /</p> <p style="padding-left: 100px;">β-GlcNAc-(1\rightarrow3) \</p> <p style="padding-left: 200px;">β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcOCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow6) /</p> <p>α-L-Fuc-(1\rightarrow6) \</p> <p style="padding-left: 100px;">β-GlcNAc-O(CH₂)₈CO₂CH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4) /</p>	<p style="text-align: center;">3</p> <p>C</p> <p>A</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>D</p> <p>D</p> <p>D</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>E</p>
<p style="text-align: center;">sialylotransferazy (donor: CMP-NeuAc)</p> <p>2,6-sialylotransferaza</p> <p>β-Gal-OCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-Glc-OCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-OH</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow3)-α-GlcNAc-OPh</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow4)-Glc</p> <p>2,3-sialylotransferaza</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-Glc-OCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-OCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow3)-β-GlcNAc-OCH₃</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow3)-α-GlcNAc-OPh</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow3)-β-GlcNAc-(1\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow4)-Glc</p> <p>β-Gal-(1\rightarrow3)-β-GlcNAc-O(CH₂)₅-COOCH₃</p>	<p>αNeuAc-(2\rightarrow6)-β-Gal-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow6)-β-Gal-(1\rightarrow4)-βGlc-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow6)-β-Gal-(1\rightarrow4)-βGlcNAc-OH</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow6)-β-Gal-(1\rightarrow4)-βGlcNAc-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3) \</p> <p style="padding-left: 100px;">β-Gal-(1\rightarrow3)-α-GlcNAc-OPh</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow6) /</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow6)-β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-(1\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow4)-Glc</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow4)-β-Glc-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow4)-β-GlcNAc-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow3)-β-GlcNAc-OCH₃</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow3)-α-GlcNAc-OPh</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow3)-β-GlcNAc-(1\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow4)-Glc</p> <p>αNeuAc-(2\rightarrow3)-β-Gal-(1\rightarrow3)-β-GlcNAc-O(CH₂)₅-COOCH₃</p>	<p>D</p> <p>D</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>C</p> <p>D</p> <p>D</p> <p>D</p> <p>D</p> <p>D</p> <p>D</p>
<p style="text-align: center;">glukozylotransferaza (donor: UDP-Glc)</p> <p>R-C₆H₄-COOH</p> <p>R: H; 4-OH; 4-OMe; 3,4-diOH; 4-OH-3OMe; 3,4-diOMe; 3,4,5-triOH-3,5-diOMe</p>	<p>β-Glc-OCO-C₆H₄-R</p>	<p>C/D</p>

1	2	3
fukozylotransferaza (donor: GDP-Fuc)		
β -Gal-OCH ₂ CH ₃	α -L-Fuc-(1→2)- β -Gal-OCH ₂ CH ₃	C
β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc	α -L-Fuc-(1→2)- β -Gal-(1→4)- β -GlcNAc	C
α NeuAc-(2→3)- β -Gal-(1→3)- β -GlcNAc-(1→3)- β -Gal-O-(CH ₂) ₅ -COOCH ₃	α -L-Fuc-(1→2)- β -Gal-(1→3) β -GlcNAc-(1→3)- β -Gal-O-(CH ₂) ₅ -COOCH ₃ α -L-Fuc-(1→4)	C

Ilość izolowanego produktu: A: > 1 g; B: od 100 mg do 1 g; C: od 10 mg do 100 mg; D: < 10 mg; E: wydajności nie określono.



Rys. 2. Synteza glikopeptydów w fazie stałej z wykorzystaniem glikozylotransferaz (21).

Istotnym postępowaniem w enzymatycznej syntezie oligosacharydów jest wykorzystanie glikozylotransferaz w reakcjach syntezy w fazie stałej. Wprowadzając w 1994 r. tę metodę, Schuster i wsp. (23) unieruchomili syntetyczny glikopeptyd na nośniku krzemowym, do którego, z wykorzystaniem galktozylotransferazy, α -2,3-sialylotransferazy i α -1,3-fukozylotransferazy dobudowali odpowiednie reszty glikozylowe. Powstały nowy glikopeptyd odłączano od nośnika poprzez proteolizę wiązania peptydowego za pomocą chymotrypsyny (rys. 2). Opracowanie sposobów kontroli regio- i stereospecyficzności glikozylotransferaz znacznie ułatwiłoby prowadzenie enzymatycznej syntezy oligosacharydów w fazie stałej.

2.1. Biosynteza oligosacharydów z udziałem innych transferaz

Glikozylotransferazy klasyfikowane w tej grupie są enzymami katalizującymi syntezę oligosacharydów bez udziału substratów aktywowanych poprzez związanie z nukleozydodifosforanami bądź przez ufosforylowanie. Zaletą tych transferaz jest stosunkowo niewielka zależność ich działania od warunków prowadzenia reakcji. Wydajne syntezы można uzyskiwać zarówno z rozcieńczonych, jak i stężonych roztworów substratów. W obu bowiem przypadkach zachodzenie konkurencyjnej i niepożądanego hydrolizy jest ograniczone (24,25). Do enzymów tych należą transferazy katalizujące reakcje wewnątrz- i międzycząsteczkowego przeniesienia reszt glikozylowych.

W przypadku transferu wewnątrzcząsteczkowego, cząsteczka donora pełni jednocześnie rolę akceptora. Przykładem biosyntezy tego typu jest otrzymywanie oligocukrów przy użyciu transferazy cyklofruktanu z *Bacillus circulans* (26). W procesie tym z inuliny otrzymywane są cykloinulooligosacharydy zawierające od 6 do 8 reszt fruktozy połączonych wiązaniami β -(2 \rightarrow 1)-glikozydowymi. Proces wewnątrzcząsteczkowego przenoszenia katalizuje także glukano-transferaza cyklodekstryn (CGT-aza) działająca na amylozę skrobi. Jednocześnie zachodzi cyklizacja i produktami transferu są α -, β - i γ -cyklodekstryny zawierające odpowiednio 6, 7 i 8 reszt glukozy (24).

W transferze międzycząsteczkowym następuje przeniesienie reszty glikozylowej między cząsteczkami donora i akceptora, którymi mogą być te same, bądź różne cukry. Funkcję akceptora mogą również spełniać inne związki, np. alkohole (24).

W reakcji katalizowanej przez α -transglukozydazę z *Aspergillus niger*, z bogatych w maltozę hydrolizatów skrobiowych syntetyzowane są panoza i izomaltooligosacharydy o wyższym stopniu polimeryzacji (DP). Dekstranosacharaza wytwarzana przez *Leuconostoc mesenteroides* jest wykorzystywana do otrzymywania wysokomolekularnych (10^6 - 10^7 d) dekstranów (27). Wprowadzenie odpowiedniego akceptora (maltoza, izomaltoza) do środowiska reakcji, pozwala jednak na syntezę niskocząsteczkowych izomaltooligosacharydów (28,29). Lewanosacharaza obok syntezy lewanu (30), katalizuje także przenoszenie reszt fruktozy z sacharozy na glukozę, ksylozę, galaktozę, czy też oligosacharydy (31). Glikozylotransferaza cyklodekstryn biorąca udział w wewnątrzcząsteczkowym przenoszeniu, uczestniczy również w transferze

międzycząsteczkowym. W zależności od zastosowanego akceptora prowadzi to do powstania innych niż cyklodekstryny oligosacharydów, np. maltooligosacharydów lub glukozyloolaktozydów (32,33).

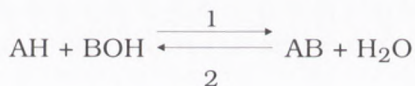
3. Hydrolazy glikozydowe

Glikozydazy katalizują hydrolityczne rozszczepienia wiązań glikozydowych. Cechuje je stosunkowo wysoka specyficzność zarówno w stosunku do reszty cukrowej jak i rodzaju wiązania glikozydowego. Ze względu na mechanizm katalizy hydrolazy glikozydowe dzielone są na enzymy zachowujące (retencyjne) i zmieniające (inwertujące) konfigurację węgla anomerycznego (34,35). Poznanie stereochemii działania hydrolaz może dostarczyć informacji pozwalających przewidywać reakcje uboczne, towarzyszące hydrolizie, takie jak np. transglikozylacja, katalizowana przez glikozydazy retencyjne.

Hydrolazy glikozydowe w określonych warunkach katalizują tworzenie wiązań glikozydowych. Otrzymywanie oligosacharydów z udziałem tych enzymów jest możliwe dzięki termodynamicznie kontrolowanym reakcjom syntezy (odwrotna hydroliza), bądź też dzięki kinetycznie kontrolowanym reakcjom transferu (hydrolazy działają jak transferazy).

3.1. Synteza oligosacharydów w termodynamicznie kontrolowanych reakcjach

Przesunięcie położenia równowagi reakcji z kierunku hydrolitycznego na syntetyczny uzyskiwane jest poprzez kontrolę termodynamicznych warunków reakcji, co przedstawiono schematycznie.



gdzie: A, B — reszty glikozyłowe, 1 — odwrotna hydroliza; 2 — hydroliza.

Zgodnie z prawem zachowania mas możliwe jest to dzięki: podwyższeniu stężenia substratu, obniżeniu aktywności wodnej układu przez dodatek organicznych kosolwentów i/lub dzięki usuwaniu produktu końcowego.

Wykorzystanie wysokich stężeń substratów w reakcjach odwrotnej hydrolizy prowadzi do zwiększenia wydajności syntezy, gdyż rozcieńczone roztwory charakteryzuje wyższa aktywność wodna (a_w), co faworyzuje proces hydrolizy. Johansson i wsp. (36) stosując 83% roztwór mannozy i α -mannozydazę z fasoli uzyskali 37% wydajność syntezy disacharydów zawierających monocukier. α -mannozydaza katalizuje kondensację zarówno mannozy, jak i liksozy, dając mieszaninę oligocukrów z wydajnościami odpowiednio 25,8 i 48,7% (37). Ajisaka i wsp. donosili zaś o 40% wydajności różnych disacharydów w reakcji katalizowanej przez β -glukozydazę przy 90% stężeniu glukozy (38).

Dodatkową korzyścią, wynikającą ze stosowania wysokich stężeń substratów, jest wzrost termostabilności enzymów. α -mannozydaza inkubowana w 85% roztworze mannozy w temperaturze 75°C w ciągu doby, zachowuje 100% swej wyjściowej aktywności, podczas gdy w nieobecności substratu traci w tej temperaturze całkowicie swe katalityczne uzdolnienia już po trzech godzinach (36). Jednakże wysokie stężenia cukrów mogą powodować inhibicję enzymu. W reakcjach z udziałem glukoamylazy *Aspergillus niger*, podwyższeniu wyjściowego stężenia glukozy z 20 do 40% odpowiada tylko 1,4-krotny wzrost efektywności syntezy (39).

Procesy termodynamicznie kontrolowanej syntezy mogą prowadzić do tworzenia heterooligosacharydów, które są produktami tzw. kokondensacji. Tak też biokataliza z udziałem glukoamylazy przy 70% stężeniu substratów, przy różnych stosunkach glukoza/akceptor, w której biorcami reszty cukrowej są różne mono- i disacharydy (m.in. ksyloza, arabinosa, tagatoza, trehaloza), prowadzi do powstania heterozwiązków. Zauważono jednocześnie, że zmiana stosunku reaktantów procesu kondensacji na korzyść akceptora prowadziła nawet do 5-krotnego obniżenia efektywności biokatalizy (40). W syntezie katalizowanej przez α -mannozydazę fasoli wydajność tworzonych produktów kokondensacji mannoza/arabinoza wynosiła nawet 38% w mieszaninie reakcyjnej.

Na przebieg reakcji ma wpływ nie tylko rodzaj zastosowanych substratów, ale również ich stężenie. Parametr ten może decydować o rodzaju powstających produktów. β -glukozydaza z migdałów w 5-molowym roztworze glukozy katalizuje tworzenie disacharydów, podczas gdy zastosowanie 7,5-molowego stężenia substratu, przy zachowanych pozostałych warunkach reakcji, prowadziło do powstania mieszaniny di-, tri- i tetrasacharydów (41).

Podstawą przesunięcia położenia równowagi procesu hydrolizy w kierunku syntetycznym jest ograniczenie obecności wody, bądź jej usuwanie ze środowiska reakcji. Obniżenie termodynamicznej aktywności wodnej (a_w) można uzyskać przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej rozpuszczalników organicznych. W zależności od ich charakteru otrzymywane są jedno- lub dwufazowe środowiska wodno-organiczne. Wykorzystanie kosolwentów w reakcjach syntez jest zależne od stabilności biokatalizatora w układach organicznych. Wówczas gdy jako rozpuszczalnik stosuje się alkohole, to z jednej strony modyfikuje się warunki reakcji (a_w), z drugiej zaś stanowi on jeden z substratów przyczyniając się do powstania glikozydów. Istnieje wiele przykładów korzystnego wpływu dodatku kosolwenta do układu reakcyjnego, jednak w niektórych środowiskach wodno-organicznych, pomijając ich denaturacyjny wpływ, stosowanie wysokich stężeń cukrów jest limitowane rozpuszczalnością substratów (41-45).

Ochronny wpływ wysokich stężeń cukrów pozwala na prowadzenie reakcji syntezy oligosacharydów w stosunkowo wysokich temperaturach, bez istotnej denaturacji biokatalizatora. Nie zawsze jednak oznacza to poprawę wydajności biosyntezy oligosacharydów. Zastosowanie 83% stężenia substratu oraz 2-krotny wzrost temperatury biokatalizy z udziałem α -mannozydazy, nieznacznie obniża efektywność reakcji, mimo że enzym w tych warunkach zach-

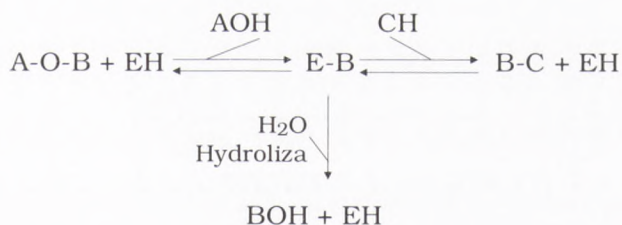
wuje wysoką stabilność (46). Zastosowanie hydrolaz glikozydowych z organizmów termofilnych może w znacznym stopniu rozszerzyć możliwości enzymatycznej syntezy oligocukrów.

Jednym z głównych parametrów reakcji z udziałem biokatalizatorów jest odczyn środowiska. Dla reakcji odwróconej hydrolizy brak jednak jednoznacznych danych, pozwalających określić związek między działaniem biokatalizatorów a pH. Johansson i wsp. (46), stwierdzili ok. 2-krotny spadek wydajności syntezy disacharydu w reakcji kondensacji mannozy katalizowanej przez α -mannozydazę z fasoli przy zmianie pH z 5 na 6,5, zaś Vic i wsp. (45) dla β -glukozydazy z migdałów nie zaobserwowali żadnego wpływu wartości pH na przebieg syntezy oligosacharydów, mimo wyraźnego optimum w reakcji hydrolizy.

Syntezy z termodynamiczną kontrolą prowadzone są z wykorzystaniem wysokich stężeń hydrolaz glikozydowych. Glikozydazy stosowane są zarówno w postaci wolnych jak i immobilizowanych enzymów. Wpływ unieruchamiania biokatalizatora na przebieg syntezy nie jest jeszcze w pełni poznany. Wiadomo, że immobilizacja wielu enzymów prowadzi do zmiany takich ważnych parametrów ich działania jak profil pH, profil termiczny czy specyficzność substratowa. Prowadzenie syntez w wysokich stężeniach substratu z zastosowaniem unieruchomionych enzymów jest ograniczone ze względów praktycznych, duża lepkość środowiska utrudnia bowiem procesy transportu i wymiany masy i energii w obrębie matrycy z unieruchomionym enzymem. Ravet i wsp. (41) uzyskali jednak zaskakująco wysoki wzrost syntetycznej aktywności β -glukozydazy z *Aspergillus niger* i izolowanej z migdałów. Po jej immobilizacji wydajność syntezy oligosacharydów wzrosła o ponad 500% w obu przypadkach.

3.2. Kinetycznie kontrolowana synteza oligosacharydów

Hydrolazy glikozydowe katalizują przenoszenie reszt glikozyłowych z donora na wodę, w czym przejawia się ich hydrolityczna aktywność. Biokatalizatory te mogą również uczestniczyć w transferze reszt cukrowych na inne niż woda akceptory. Wprowadzenie konkurencyjnego nukleofilowego biorcy reszt glikozyłowych prowadzi do wytworzenia nowego wiązania glikozydowego, co przedstawiono schematycznie.



gdzie: AOB — donor; EH — enzym; EB — kompleks przejściowy; CH — akceptor; BC — glikozyd.

Reakcje transglikozylacji są faworyzowane w kinetycznie kontrolowanych procesach. Uzyskanie maksymalnej wydajności glikozydów wymaga ciągłego monitorowania przebiegu biosyntezy. Reakcje te należy przerywać, gdy zużyty zostaje donor. Wytworzony oligosacharyd jest bowiem potencjalnym substratem dla hydrolazy użytej w syntezie.

Rolę donorów, w kinetycznie kontrolowanej syntezie oligosacharydów pełnią oligo- i polisacharydy oraz glikozydy aryłowe bądź fluoroglikozydy. Szeroki wybór dawcy reszt glikozylowych wynika z niskiej specyficzności hydrolaz glikozydowych w stosunku do aglikonu. Akceptorami w reakcjach tworzenia wiązań glikozydowych są natomiast związki zawierające reaktywne grupy hydroksylowe, tj. cukry i alkohole. Podwyższenie efektywności procesów syntezy na drodze transglikozylacji, katalizowanej przez glikozydazy, osiągnięte jest poprzez: zastosowanie odpowiednich akceptorów, podwyższenie stężeń reagentów, obniżenie aktywności wody i usuwaniu produktów końcowych ze środowiska reakcji. Podstawową zaletą procesów transglikozylacji w porównaniu z reakcjami odwróconej hydrolizy są ich wysokie wydajności (20-50%). β -galaktozydazy drobnoustrojowe dają mieszaninę oligomerów galaktozy o DP 2 do 4 z wydajnościami rzędu 45% (47,48). α -L-fukozydaza katalizuje transfer reszt glikozylowych z p-nitrofenylo- α -fukozydu na laktaminę tworząc trisacharyd z wydajnością 48,8% (4). Syntezy oligosacharydów w kinetycznie kontrolowanych procesach cechuje także wyższa specyficzność oraz krótszy czas reakcji w porównaniu z reakcjami odwróconej hydrolizy. Procesy te nie są jednak pozbawione wad. Najczęściej produktem transglikozylacji jest mieszanina izomerów. Taka różnorodność otrzymywanych glikozydów ma związek z ilością i reaktywnością grup hydroksylowych o charakterze nukleofilowym w cząsteczce cukrowego akceptora. Zazwyczaj preferowane jest powstawanie wiązania 1,6-glikozydowego, gdyż 1-rzędowa grupa hydroksylowa przy C6 akceptora jest najbardziej reaktywna. Wśród produktów występują też wiązania 1,2-; 1,3- i 1,4-glikozydowe. W tabeli 2 przedstawiono przykłady oligosacharydów otrzymanych na drodze transglikozylacji.

TABELA 2
PRZYKŁADY OLIGOSACHARYDÓW WYTWARZANYCH NA DRODZE TRANSGLIKOZYLACJI
Z WYKORZYSTANIEM HYDROLAZ GLIKOZYDOWYCH

Substraty	Produkt	Literatura
1	2	3
<i>α</i> -galaktozydaza		
α -Gal-O-pPhNO ₂ + α -Gal-O-CH ₂ CH=CH ₂	α -Gal-(1,3)- α -Gal-O-CH ₂ CH=CH ₂	(49)
α -Gal-O-pPhNO ₂ + α -Gal-O-Me	α -Gal-(1,3)- α -Gal-O-Me	(50)
	α -Gal-(1,6)- α -Gal-O-Me	
α -Gal-O-pPhNO ₂ + β -Gal-O-Me	α -Gal-(1,3)- β -Gal-O-Me	(50)
	α -Gal-(1,6)- β -Gal-O-Me	
α -Gal-O-pPhNO ₂ + α -Gal-O-pPhNO ₂	α -Gal-(1,2)- β -Gal-O-pPhNO ₂	(50)
	α -Gal-(1,3)- β -Gal-O-pPhNO ₂	
	α -Gal-(1,2)- β -Gal-O-pPhNO ₂	
α -Gal-OpPhNO ₂ + β -Gal-O-pPhNO ₂	α -Gal-(1,3)- β -Gal-O-pPhNO ₂	(50)
<i>β</i> -galaktozydaza		
β -Gal-(1,4)-Glc	β -Gal-(1,6)-Glc	(51)
	β -Gal-(1,3)-Glc	
	β -Gal-(1,6)- β -Gal-(1,4)-Glc	
β -Gal-(1,4)-Glc+cyklodekstryny	mieszanina galaktozylowanych cyklodekstryn	(52)
β -Gal-(1,4)-Glc+GlcNAc	β -Gal-(1,4)-GlcNAc (źródło E: <i>B. circulans</i>)	(5)
	β -Gal-(1,3)-GlcNAc (wotowa)	(4)
	β -Gal-(1,6)-GlcNAc (<i>K. lactis</i>)	
β -Gal-(1,4)-Glc+GalNAc	β -Gal-(1,4)-GalNAc (źródło E: <i>B. circulans</i>)	
	β -Gal-(1,3)-GalNAc (wotowa)	
	β -Gal-(1,6)-GalNAc (<i>E. coli</i>)	
β -Gal-O-oPhNO ₂ + α -Gal-O-Me	β -Gal-(1,6)- α -Gal-O-Me	
β -Gal-O-oPhNO ₂ + β -Gal-O-Me	β -Gal-(1,6)- β -Gal-O-Me	(50)
<i>α</i> -mannozydaza		
α -Man-O-pPhNO ₂ + α -Man-OMe	α -Man-(1,2)- α -Man-OMe	(50)
	α -Man-(1,6)- α -Man-OMe	
α -Man-O-pPhNO ₂ + α -Man-OMe	α -Man-(1,2)- α -Man-OMe	(53)
α -Man-O-pPhNO ₂ + α -Man-O-pPhNO ₂	α -Man-(1,2)- α -Man-O-pPhNO ₂	(50)
	α -Man-(1,6)- α -Man-O-pPhNO ₂	
α -Man-O-pPhNO ₂ + α -Man-O-pPhNO ₂	α -Man-(1,2)- α -Man-O-pPhNO ₂	(53)
<i>α</i> -glukozydaza		
α -Glc-(1,4)-Glc	izomaltooligosacharydy (DP 2-3)	(54,55)
<i>β</i> -glukozydaza		
α -Glc-(1,4)-Glc	β -Glc-(1,4)- β -Glc-(1,4)-Glc	(17)
<i>α</i> -L-fukozydaza		
α -Fuc-O-pPhNO ₂ + β -Gal-(1,4)-GlcNAc	α -Fuc-(1,3)- β -Gal-(1,4)-GlcNAc	(4)
α -Fuc-O-pPhNO ₂ + β -Gal-(1,4)-Glc	α -Fuc-(1,3)- β -Gal-(1,4)-Glc	
α -Fuc-O-pPhNO ₂ + β -Gal-(1,4)-Glc- β OMe	α -Fuc-(1,3)- β -Gal-(1,4)-Glc- β OMe	

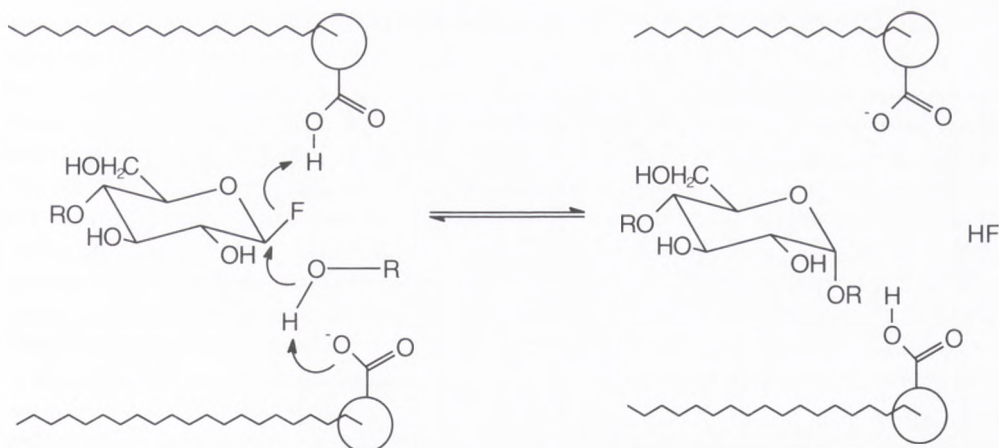
1	2	3
endo- β -1,3-glukanaza laminaran + β -Xyl-O-pPhNO ₂ laminaran + α -Xyl-O-pPhNO ₂ laminaran + β -Xyl-O-oPhNO ₂ laminaran + α -Glc-O-pPhNO ₂ laminaran + β -Glc-O-pPhNO ₂ laminaran + α -Gal-O-pPhNO ₂ laminaran + α -Fuc-O-pPhNO ₂	7 produktów o DP 2-4 6 produktów 6 produktów 5 produktów 6 produktów 4 produkty 2 produkty	(56)
egzo- β -1,4-galaktanaza galaktooligosacharydy DP 2-5	dla każdego substratu 2 dodatkowe oligosacharydy o DP zwiększonym odpowiednio o 1 i 2 w stosunku do wyjściowego substratu	(57)
endo- β -1,4-galaktanaza arabinogalaktan + α -Gal-O-Me arabinogalaktan + β -Gal-O-Me arabinogalaktan + β -Gal-O-pPhNO ₂	β -Gal-(1,4)- β -Gal-O-Me β -Gal-(1,4)- β -Gal-(1,4)- β -Gal-O-Me β -Gal-(1,4)- β -Gal-O-Me β -Gal-(1,3)- β -Gal-O-Me β -Gal-(1,4)- β -Gal-(1,4)- β -Gal-O-Me β -Gal-(1,4)- β -Gal-O-pPhNO ₂ β -Gal-(1,4)- β -Gal-(1,4)- β -Gal-O-pPhNO ₂	(58)
β -fruktofuranazydaza α -Glu-(1,1)-Fru	mieszanina fruktooligosacharydów o DP 2-4	(59)

Gal — galaktoza; Glc — glukoza; Man — mannoza; Fuc — fukoza; Xyl — ksyloza; GlcNac — glukozamina; GalNac — galaktozamina; Ph — pierścień fenylowy; Me — reszta metylowa.

3.3. Warunki reakcji transglikozylacji

Otrzymywanie oligocukrów z wyższą wydajnością i selektywnością jest bardziej prawdopodobne w przypadku kinetycznie kontrolowanych procesów niż w reakcjach odwróconej hydrolizy. Regioselektywność tworzenia wiązania glikozydowego może być do pewnego stopnia kontrolowana warunkami prowadzenia transglikozylacji (49,50,58,60).

Jedną z metod poprawy efektywności biosyntezy oligosacharydów w katalizowanych przez glikozydazy reakcjach transglikozylacji, jest dobór akceptora oraz podwyższanie stężenia reaktantów. Fujimoto i wsp. badali proces z udziałem endo- β -1,4-galaktanazy, w którym donorem był arabinogalaktan (58). Nie uzyskano wysokiej selektywności transferu, gdy akceptorem były β -galaktozydy (tab. 2), natomiast zastosowanie disacharydów prowadziło wyłącznie do wytworzenia nowego wiązania β -1,4-glikozydowego. Różnica w regioselektywności wynika stąd, że disacharydy w odróżnieniu od glikozydów mogą być rozpoznawane przez enzym jako substraty. W przypadku nitrofenyloglikozydów aglikon akceptora ze względu na swą wielkość prawdopodobnie „naśladuje” analogiczną resztę monocukru w disacharydzie. Dlatego też używana jest podobna selektywność reakcji transglikozylacji. Również Nilsson



Rys. 3. Transglikozylacyjna aktywność glikozydaz z inwersyjnym mechanizmem działania (61,62).

(53) donosi o wpływie doboru akceptora, tj. struktury jego aglikonu, jak i anomerycznej konfiguracji połączenia aglikon-reszta glikozylowa, na regio-specyficzność glikozydaz. Usui i wsp. (60) wykazali regioselektywność transferu reszt galaktozy na akceptory zawierające grupę N-acetylową (gluko- i galaktosamina). β -galaktozydaza *B. circulans* katalizowała w tych warunkach wytwarzanie wiązania β -1,4-glikozydowego. Zastosowanie β -metyloglikozydów glukozy i galaktozy indukowało tworzenie połączeń typu β -1,3.

Również rodzaj donora ma istotne znaczenie. Kinetycznie kontrolowane syntezы stosowane są przeważnie do otrzymywania oligosacharydów przy zastosowaniu glikozydaz retencyjnych. W prowadzonych badaniach wskazuje się jednak, że aktywne w tych procesach są również hydrolazy, katalizujące inwersję anomerycznej konfiguracji węgla C1 substratu. Prawdopodobny mechanizm działania tych enzymów przedstawiono na rysunku 3. Przykładem tego typu procesów jest transglikozylacja, katalizowana przez glukoamylazę *Rhizopus niveus* (61). Przy zastosowaniu anomeru β -fluorku glukozy obok β -glukozy powstają również produkty transferu, które szybko ulegają degradacji. Wykorzystanie mieszaniny fluorku β -D-glukozy jako donora i metylo- α -D-glukopiranozydu jako akceptora, prowadziło do powstania metylo- α -D-glukopiranozylo-(1,4)- α -D-glukopiranozydu, i w mniejszej ilości także α -izo-maltozydu. Oba cukry posiadają konfigurację α , odwrotną niż w donorze.

Istotne znaczenie mają także stosunki ilościowe donora do akceptora i stężenie tych reagentów. Proporcja dawca/biorca reszt glikozylowych może decydować czy biosynteza oligosacharydów zachodzi na drodze kondensacji czy też według mechanizmu transglikozylacji. Obrazuje to przykład otrzymywania galaktotrisacharydu z udziałem egzogalaktanazy w roztworach zawierających różne ilości galaktozy i galaktobiozy (57). Produkty syntezy tworzone były wskutek kondensacji substratów w wyższych stężeniach reagentów,

a oligosacharydy otrzymywane z bardziej rozcieńczonych roztworów stanowiły produkty transglikozylacji. Wpływ wyjściowej zawartości substratów w mieszaninie reakcyjnej na efekty transferu obserwowano natomiast w reakcji katalizowanej przez β -galaktozydazę (48). Stężenie stanowiących donor czy akceptor glikozydów z hydrofobowym aglikonem, można jednak zmieniać w wąskim zakresie, ze względu na ograniczoną rozpuszczalność tych związków. Problem ten rozwiązywany jest poprzez stosowanie mieszających się z wodą korozpuszczalników (56), bądź przez zwiększenie temperatury procesu.

Zmieniając pH reakcji transferu w stosunku do optymalnego dla reakcji hydrolizy można uzyskać poprawę wydajności oligosacharydów. Synteza galaktooligosacharydów katalizowana przez β -galaktozydazę *P. canescens* przebiega efektywnie w pH 5-5,5, podczas gdy najwyższą aktywność hydrolityczną enzym ten przejawia w pH 4,5 (51). Egzogalakتانaza *A. niger* maksymalne właściwości transferazowe wykazuje w pH 7, natomiast optymalny dla hydrolizy odczyn środowiska wynosi 3,5 (57). Dla β -fruktofuranosyldazy *A. oryzae* optimum pH w procesie hydrolizy wynosi 5, a najwyższą wydajność oligosacharydów uzyskuje się w pH 8 (63). Przykłady te świadczą, że zazwyczaj procesom transglikozylacji sprzyja środowisko bardziej alkaliczne. Można sądzić, że produkty transferu są niestabilne w pH optymalnym dla hydrolizy.

Stosowanie wysokich temperatur w reakcjach transglikozylacji rozwiązuje szereg problemów, ułatwia bowiem kontrolę parametrów reakcji. Wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się rozpuszczalność substratów, np. laktozy czy też innych glikozydów. Umożliwia to stosowanie wyższych stężeń substratów, dzięki czemu nie zachodzą procesy hydrolizy (47). Jednocześnie warunki takie nie sprzyjają krystalizacji cukrów i redukują lepkość mieszaniny reakcyjnej, co ułatwia prowadzenie biosyntezy z zastosowaniem immobilizowanych enzymów. Ograniczona również zostaje możliwość występowania zakażeń mikrobiologicznych. Warunkiem biokatalizy w wysokich temperaturach jest jednakże termostabilność i zachowanie wysokiej aktywności operacyjnej enzymu w czasie reakcji. Nakano i wsp. (64) wyizolowali termostabilną β -galaktozydazę z *Saccharopolyspora rectivirgula* o wysokich uzdolnieniach transgalaktozylacyjnych. Uzyskali oni 41% wydajność po 22 godzinach syntezy oligosacharydów, prowadząc proces w temperaturze 70°C.

4. Podsumowanie

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie oligosacharydami jako grupą związków o istotnym znaczeniu biologicznym. Znajdują one zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, w żywieniu ludzi i zwierząt oraz w ochronie zdrowia. W tym kontekście istotne staje się opracowanie wydajnych procesów w większej skali z udziałem biokatalizatorów. Wymaga to skoncentrowania się na poszukiwaniu nowych glikozylotransferaz i hydrolaz glikozydów. Poznanie mechanizmów działania tych enzymów ze szczególnym uwzględnieniem ich regio- i stereospecyficzności oraz ich modyfikacje metodami inży-

nierii genetycznej czy białkowej mogą w istotny sposób zwiększyć możliwości wykorzystania enzymów do syntezy oligosacharydów. Ważnym kierunkiem badań jest też charakterystyka syntez prowadzonych w warunkach niekonwencjonalnych. Nietypowe środowiska reakcyjne cieszą się szczególnym zainteresowaniem, gdyż stwarzają wiele możliwości wpływania na mechanizm działania enzymów. Połączenie tych dwóch aspektów może prowadzić do opracowywania technologii otrzymywania oligosacharydów o dużych walorach użytkowych.

Literatura

1. Sharon N., Lis H., (1993), *Świat Nauki*, 56-63.
2. Karlsson K. A., (1995), *Current Opin. Structur. Biol.*, 5, 622-635.
3. Sharon N., (1995), *Progress in Biotechnology*, Eds. Petersen S. P., Svensson B., Pedersen S., 10, 1-13, Elsevier Science BV, Amsterdam.
4. Murata T., Usui T., (1997), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1059-1066.
5. Monsan P., Paul F., Auriol D., (1995), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 750, 357-363.
6. Gibson G. R., Roberfroid M. B., (1995), *J. Nutr.*, 125, 1401-1412.
7. Bouhnik Y., Flouwe F. B., D'Agay-Abensour L., Pochart P., Gramet G., Durand M., Rambaud J. C., (1997), *J. Nutr.*, 127, 444-448.
8. Campbell J. M., Fahey G. C., Wolf B. W., (1997), *J. Nutr.*, 127, 130-136.
9. Roberfroid M. B., Delzenne N. M., (1998), *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 117-143.
10. Smart J. B., (1993), *Bull. IDF*, 289, 16-22.
11. Playne M. J., Crittenden R. G., (1996), *Bull. IDF*, 313, 10-22.
12. Crittenden R. G., Playne M. J., (1996), *Tren. Food Sci. Technol.*, 7, 353-361.
13. Jee-Kwan H., Chue-Jin K., Chang-Tal K., (1998), *Starch*, 50, 104-107.
14. Baker C. W., (1993), *Food Technol.*, 47, 149-150.
15. Manley-Harris M., Richards G. N., (1993), *Carbohydr. Res.*, 240, 183-196.
16. Meynial-Salles I., Combes D., (1996), *J. Biotechnol.*, 46, 1-14.
17. Toone E. J., Simon E. S., Bednarski M. D., (1989), *Tetrahedron*, 45, 5361-5422.
18. Joziassse D. H., Schiphorst W. E. C. M., Eijnden D. H. van den, Kuik J. A. van, Halbeek H. van, Vliegenthart J. F. G., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 2025-2033.
19. McDowell W., Grier T. J., Rasmussen J. R., Schwarz R. T., (1987), *Biochem J.*, 248, 523-528.
20. Gross H. J., Bunsch A., Paulson J. C., Brossmer R., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 168, 595-601.
21. Watt G. M., Lowden A. S., Flitsch S. L., (1997), *Current Opin. Structur. Biol.*, 7, 652-660.
22. Ichikawa Y., Wang R., Wong C. H., (1994), *Methods Enzymol.*, 247, 107-127.
23. Schuster M., Wang P., Paulson J. C., (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 1135-1136.
24. Monsan P., Paul F., (1995) *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 187-192.
25. Monsan P., Paul F., Remaud M., Lopez A., (1989), *Food Biotechnol.*, 3, 11-29.
26. Kawamura M., Uchiiyama T., Kuramoto T., Tamura Y., Mizutani K., (1989), *Carbohydr. Res.*, 192, 83-90.
27. Koepsell H. J., Tsuchiya H. M., Hellman N. N., Kazenko A., Hoffman C. A., Sharpe E. S., Jackson R. W., (1953), *J. Biol. Chem.*, 200, 793-801.
28. Robyt J. F., Ecklund S. H., (1983), *Carbohydr. Res.*, 121, 279-286.
29. Paul F., Oriol E., Auriol D., Monsan P., (1986), *Carbohydr. Res.*, 149, 433-441.
30. Dedonder R., (1966), *Methods Enzymol.*, 8, 500-505.
31. Tanaka T., Yamamoto S., Oi S., Yamamoto T., (1981), *J. Biochem. (Tokyo)*, 90, 521-526.
32. Kitahata S., Okada S., (1976), *J. Biochem. (Tokyo)*, 79, 641-648.
33. Yamauchi T., Chaen H., Sakai S., Kurimoto M., (1993), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 56-60.

34. Davis G., Henrissat B., (1995), *Structure*, 3, 853-859.
35. Crout D. H. G., Vic G., (1997), *Current Opin. Structur. Biol.*, 7, 637-644.
36. Johansson E., Hedbys L., Larsson P. O., (1986), *Biotech. Lett.*, 8, 421-424.
37. Rastall R. A., Rees N. H., Wait R., Adlard M. W., Bucke C., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 53-57.
38. Ajisaka K., Nishida H., Fujimoto H., (1987), *Biotech. Lett.*, 9, 243-248.
39. Nicolov Z. L., Meagher M. M., Raily P. J., (1989), *Biotech. Bioeng.*, 34, 694-704.
40. Rastall R. A., Adlard M. W., Buck C., (1991), *Biotech. Lett.*, 13, 501-504.
41. Ravet C., Thomas D., Legoy M. D., (1993), *Biotech. Bioeng.*, 42, 303-308.
42. Canfarella L., Nikolov Z. L., Reilly P., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 383-387.
43. Laroute V., Wiellemot R. M., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 528-534.
44. Laroute V., Wiellemot R. M., (1989), *Biotech. Lett.*, 11, 249-254.
45. Vic G., Biton J., Le Beller D., Michel J. M., Thomas D., (1995), *Biotech. Bioeng.*, 109-116.
46. Johansson E., Hedbys L., Mosbach K., Larsson P. O., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 347-352.
47. Prenosil J. E., Stuker E. K., Bourne J. R., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 1019-1025.
48. Shin H. J., Yang J. W., (1994), *Biotech. Lett.*, 16, 1157-1162.
49. Nilsson K. G. I., (1988), *Carbohydr. Res.*, 180, 53-59.
50. Nilsson K. G. I., (1987), *Carbohydr. Res.*, 167, 95-103.
51. Abjelian B. A., (1998), *Priklad. Biokhim. Mikrob.*, 34, 365-369 oraz: Kitahata S., Fujita K., Takagai Y., Hara K. M., Hashimoto H., Tanimoto T., Koizumi K., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 242-245.
52. Kitahata S., Fujita K., Takagai Y., Hara K., Hashimoto H., Tamimoto T., Koizumi K., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 242-245.
53. Nilsson K. G. I., (1987), in: *Biocatalysis in Organic Media*, Eds. Laone C., Tramper J., Lilly M. D., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 369-374.
54. Duan K. J., Shen D. C., Lin M. T., Hsueh H. C., (1994), *Biotech. Lett.*, 16, 1151-1156.
55. Shen D. C., Huang C. I., Duan K. J., (1997), *Biotech. Techniques*, 11, 287-291.
56. Bielecki S., Buchowiecka A., (1996), *Biotechnologia*, 2, 184-191.
57. Bonnin E., Thibault J. F., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 99-106.
58. Fujimoto H., Nakano H., Isomura M., Kitahata S., Ajisaka K., (1997), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1258-1261.
59. Bielecki S., Somiari R. I., (1996), *Biocatalysis and Biotransformations*, 13, 217-231.
60. Usui T., Morimoto S., Hayakawa Y., Kawaguchi M., Murata T., Matahira Y., Nishida Y., (1996), *Carbohydr. Res.*, 285, 29-39.
61. Kitahata S., Brewer C. F., Sgenghof D. S., Sawai T., Hehre E. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 6017-6026.
62. Mooser G., (1992), *The Enzymes*, Ed. Sigman D. S., vol. XX, Academic Press, New York, 187-233.
63. Nakano M., Harada M., Kodama Y., Nakayama T., Shibano Y., Amachi T., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 657-663.

Enzymatic synthesis of oligosaccharides

Summary

A key role of oligosaccharides in biological processes becoming more obvious every day. An increasing interest in this group of biomolecules is related to their broad spectrum of applications, i.e. in food, feed and pharmaceutical industries, in cosmetics and medicine. Efficient, full-scale processes that allow to produce different types of these oligomers are of great importance. Biocatalysis is considered very attractive in comparison to the non specific, time-consu-

ming and often environmental unfriendly chemical technologies of oligosaccharide production. Two groups of enzymes are involved in this process, transferases and glycosidase. This review describes oligosaccharide synthesis through the reactions of transfer, transglycosylation and reverse hydrolysis.

Key words:

oligosaccharide, glycosyl transferase, glycosidase, transglycosylation, reverse hydrolysis.

Adres do korespondencji:

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