



Enzymy rozkładające α -(1 \rightarrow 3)-glukany. Część II – Zastosowanie w biotechnologii

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

α -(1 \rightarrow 3)-Glucan-degrading enzymes. Part II – Application in biotechnology

Summary

This paper is focused on actual and potential applications of mutanases as enzymatic dental plaque control agents *in vitro* and *in vivo*. All studies reported so far have demonstrated that mutanase was effective in preventing dental caries, suppressing the glucan-dependent adherence and the accumulation of microorganisms in dental plaque, and removing biofilms from dentures. In addition to their potential usefulness in dentistry as oral therapeutic agents, α -(1 \rightarrow 3)-glucanases might be applicable to investigations of α -(1 \rightarrow 3)-glucosidic linkages occurring in microbial cell-wall structures and glucans of certain higher plants. α -(1 \rightarrow 3)-Glucanases obtained in a pure form are invaluable tools for studying the chemical structures of carbohydrates. Most promising prospects for the practical applications of α -(1 \rightarrow 3)-glucanases in biocontrol of phytopathogenic fungi, as well as in efficient production of fungal protoplasts, are also discussed.

Adres do korespondencji

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

Key words:

mutan, mutanase, α -(1 \rightarrow 3)-glucanase, enzymatic hydrolysis, α -(1 \rightarrow 3)-glucans, practical applications, dental and denture plaque, protoplasts.

1. Wprowadzenie

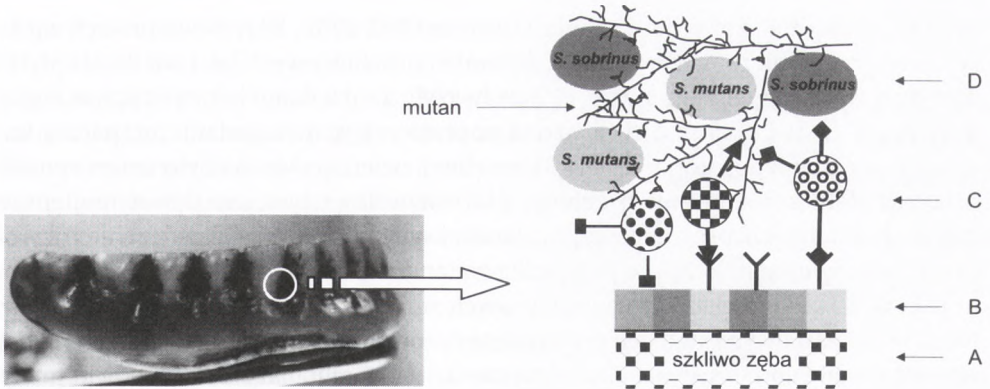
α -(1 \rightarrow 3)-Glukanazy są unikatowymi enzymami zdolnymi do hydrolizy wiązań α -(1 \rightarrow 3) w mutanach i α -glukanach innego pochodzenia.

Mogą one stanowić użyteczne narzędzie do usuwania α -(1 \rightarrow 3)-glukanów z innych polisacharydów oraz do badania struktury chemicznej tego typu biopolimerów. W ochronie roślin przed grzybowymi patogenami szczególnego znaczenia nabiera wytwarzanie biopreparatów rozkładających ściany komórkowe grzybów, których istotnym składnikiem są α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy. Dodatkowo w połączeniu z innymi enzymami α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy mogą ułatwiać tworzenie się protoplastów u grzybów, które zawierają ten glukan w ścianie komórkowej.

Największe jednak możliwości kryje w sobie produkcja mutanaz drobnoustrojowych, które można wykorzystać w stomatologii do zapobiegania próchnicy zębów i oczyszczania z biofilmów protez zębowych. Wykazano bowiem, że efektywnym uzupełnieniem mechanicznych i chemicznych środków higieny jamy ustnej może być stosowanie enzymów, które specyficznie rozkładają makrocząsteczki budujące szkielet płytki nazębnej lub płytki osadzającej się na ruchomych aparatach protezycznych. Proteazy rozkładają białka śliny, które adsorbują się na powierzchni zębów i tworzą błonkę inicjującą powstawanie biofilmu. Zastosowane z lipazami niszczą bakterie poprzez lizę białek i tłuszczów tworzących strukturalne elementy ich komórek, a podane z dodatkiem amylaz zapobiegają rozwojowi kamienia nazębnego przez rozkład kompleksu węglowodanowo-białkowego, który wiąże wapń (1,2). Z kolei dekstranazy i mutanazy można wykorzystać do hydrolizy zrębu płytki nazębnej łączącego poszczególne jej elementy, a zbudowanego głównie z dekstranu i mutanu.

2. Wykorzystanie mutanaz w dentystyce

Udział mutanaz w profilaktyce próchnicy zębów związany jest z budową płytki nazębnej (ang. *dental plaque*) oraz procesami jakie w niej zachodzą. Płytką stanowi biofilm złożony z mikroorganizmów osadzonych w matrycy zbudowanej z polimerów pochodzenia bakteryjnego i ślinowego (rys. 1) (3). Budowa i właściwości polisacharydów wchodzących w skład substancji organicznej płytki mają bardzo duży wpływ na szybkość powstawania zmian próchnicowych. Spośród licznych polimerów budujących płytkę (α -(1 \rightarrow 6)-, α -(1 \rightarrow 4)- i α -(1 \rightarrow 3)-glukany, β -(2 \rightarrow 6)-fruktany), decydującą rolę w etiopatologii próchnicy zębów odgrywa α -(1 \rightarrow 3)-glukan, zwany mutanem. Polimer ten stanowi 1,3-1,4% suchej masy płytki i posiada kilka unikatowych cech, dzięki którym tworzy jej zrąb, tzn. łatwo adsorbuje się do szklawa pokrytego śliną lub błonką nabytą, sprzyja wzajemnemu sklepaniu się bakterii (agregacja) oraz znacznie zwiększa spójność płytki nazębnej (4). Mutany są całkowicie nierozpuszczalne w wodzie i mają strukturę włókien, co sprawia, że nie są rozpuszczane i wmywane przez płyny jamy ustnej. Ponadto, α -(1 \rightarrow 3)-glukany nie poddają się działaniu enzymów, ani tych obecnych w jamie ustnej ani wytwarzanych przez bytujące tam mikroorganizmy, co zapewnia płytce stabilność i trwałość (5-7).



Rys. 1. Schemat płytki nazębnej. A – powierzchnia zęba, B – warstwa glikoprotein ślinowych oraz bakteryjnych, C – mikroorganizmy – pierwsi kolonizatorzy, D – bakterie z grupy *Streptococcus mutans* (4).

Fakt, że zdolność do syntezy mutanu przez paciorkowce zmienne – oprócz zakwaszania i umiejętności przeżycia w kwaśnym środowisku – została uznana za główny czynnik decydujący o ich próchnicotwórczości spowodował, że próby eliminacji tego właśnie składnika płytki nazębnej na drodze enzymatycznej hydrolizy stały się jak najbardziej uzasadnione. Rozkład i usuwanie α -(1 \rightarrow 3)-glukanów prowadzi do zniszczenia lub choćby naruszenia struktury płytki nazębnej, a tym samym może być sposobem zapobiegania próchnicy zębów. Jedyną grupą enzymów mających zdolność hydrolizy wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych są mutanazy. Z uwagi jednak na fakt, że natywne mutany zawierają w swojej strukturze obok wiązań α -(1 \rightarrow 3) również wiązania α -(1 \rightarrow 6)-glukozydowe, do rozkładu tych ostatnich stosuje się niekiedy dekstranazę lub enzym ten podaje się łącznie z mutanazą (8). Należy jednak wyraźnie podkreślić, że w takim układzie dekstranaza spełnia jedynie funkcję pomocniczą, a jedynym enzymem efektywnie rozkładającym natywne i nierozpuszczalne w wodzie mutany pochodzenia paciorkowcowego jest mutanaza. Pomimo że badania nad wykorzystaniem obu tych enzymów w dentystyce prowadzone są od początku lat siedemdziesiątych XX w., to ich wyniki zostały przedstawione zaledwie w kilkunastu doniesieniach i patentach (9-12).

W doświadczeniach prowadzonych na zwierzętach wykazano, że preparat mutanazy podawany z kariogennym pożywieniem szczurom z rodzimą mikroflorą powodował u nich wyraźne zahamowanie próchnicy szczelinowej oraz próchnicy powierzchni gładkich zębów, nie miał natomiast wpływu na redukcję płytki nazębnej. Mutanaza generowała jednak pewne zmiany w składzie populacji bakterii występujących w płytce, powodując selektywne zahamowanie wzrostu paciorkowców *Streptococcus mutans* (13-15). Potwierdzono to w badaniach, w których preparat mutanazy z *Trichoderma harzianum* OMZ 779 zastosowano u względnie gnotobiotycz-

nych szczurów zakażonych szczepem *S. mutans* OMZ 176E. W tych warunkach zaobserwowano ograniczenie zarówno liczby zmian próchnicowych jak i wielkości płytki nazębnej (16). Guggenheim i wsp. (15) zauważyli, że działanie kariostatyczne mutanazy może zostać wydatnie zwiększone poprzez miejscowe podanie preparatu enzymatycznego bezpośrednio do płytki nazębnej zwierząt. Można było w ten sposób osiągnąć efekt zahamowania próchnicy porównywalny z tym, jaki dawały najlepsze znane środki przeciwpróchnicowe, tj. chlorheksydyna i fluorki. Ograniczenie rozwoju tej choroby osiągnęło 70% w przypadku zmian próchnicowych gładkich powierzchni zębów, 85% w przypadku zaawansowanych zmian w bruzdach i szczelinach, natomiast w początkowych stadiach tego rodzaju próchnicy enzym był znacznie bardziej skuteczny niż chlorheksydyna. Profilaktyczne działanie mutanazy związane było prawdopodobnie z występowaniem w jamie gębowej szczurów specyficznych receptorów pozwalających na długotrwałą obecność enzymu i jego powolne uwalnianie.

Pierwsze próby użycia mutanazy z *Aspergillus nidulans* w postaci płukanek do ust dla ludzi nie dały oczekiwanych rezultatów (9). Działanie płukanek kontrolnej (20% roztwór sacharozy) jak i płukanek z mutanazą (20% roztwór sacharozy + mutanaza) było prawie jednakowe, tzn. w obu przypadkach płytka nazębna powstawała z podobną częstotliwością. Jednak u osób stosujących płukanek z mutanazą nastąpiły istotne zmiany w ekologii płytki – działanie enzymu spowodowało ograniczenie liczebności populacji *S. mutans* o blisko 75%, przy niezmienionej liczbie innych drobnoustrojów. Fakt, że podawanie mutanazy nie redukowało wielkości płytki wynika prawdopodobnie stąd, że mutan nie jest jedynym polimerem uczestniczącym w agregacji bakterii i obok homopolimerów, takich jak mutan czy dekstran, w płytce nazębnej znajduje się wiele heteropolimerów (9,16). Jednak, jak już wspomniano, to mutan spełnia nadrzędną rolę w płytce, decydując o udziale w niej bakterii *S. mutans* oraz o zaistnieniu szeregu zjawisk fizykochemicznych, które warunkują kariogennosc takiego układu (17,18).

Zadowolające wyniki w postaci redukcji płytki nazębnej u ludzi osiągnięto dopiero, wówczas gdy zastosowano preparat grzybowej mutanazy pochodzący ze szczepu *T. harzianum* OMZ 779 (19). Równocześnie zaobserwowano jednak występowanie efektów ubocznych w postaci podrażnień języka i miejscowych uczuleń, związanych z obecnością, w nieoczyszczonych preparatach mutanazy, aktywności proteolitycznej. Niedogodności tych można jednakże uniknąć stosując wysokooczyszczone preparaty rekombinowanej mutanazy, wolne od jakichkolwiek aktywności towarzyszących lub poszukując nowych szczepów nie wytwarzających proteaz (20,21).

Biopreparaty mutanolityczne mogą być używane jako dodatki do płukanek do ust, past do zębów, gum do żucia, a nawet żywności. Okazało się przy tym, że nie bez znaczenia jest wybór nośnika. Zastosowanie do tego celu gumy do żucia ma szczególne zalety ze względu na przedłużone działanie mutanazy, zwiększone wydzielanie śliny oraz mechaniczne usuwanie „naruszonej” przez enzym płytki (20).

Mutanaza grzybowa nie stanowi jedynej formy biopreparatu, który może być wykorzystany w profilaktyce próchnicy. Wyraźne zahamowanie przyrostu płytki na

wargowych i językowych powierzchniach zębów przednich, które nastąpiło w wyniku działania bakteryjnej mutanazy z *Pseudomonas* sp. zaobserwowali Inoue i wsp. (22). Korzystne może być również użycie kompozycji, zawierających enzymy hydrolizujące mutan i hamujące jego powstawanie, np. mutanazę, dekstranazę i proteazę (23). Intensywnie badana jest także możliwość dodawania do środków higieny jamy ustnej mutanazy pochodzącej z *Bacillus* (21), lub naturalnych inhibitorów aktywności glukozylotransferaz paciorkowców zmiennych (24).

Możliwości wykorzystania mutanazy w praktyce stomatologicznej nie ograniczają się tylko do usuwania płytki nazębnej, ale też innych biofilmów powstających w jamie ustnej, np. płytki protez (ang. *denture plaque*) gromadzącej się na ruchomych aparatach protetycznych. W wyniku obserwacji mikroskopowych dowodzi się, że struktura tej płytki jest bardzo podobna do płytki nazębnej (25). Płytki protez występuje u większości osób korzystających z uzupełnień protetycznych i jest przyczyną licznych stanów zapalnych jamy ustnej, których głównym sprawcą są zasiedlające biofilm drożdże z rodzaju *Candida*, a w szczególności patogenny gatunek *C. albicans*, izolowany u 50 do 100% pacjentów ze zmianami podłoża protetycznego. Kluczem do utrzymania błony śluzowej jamy ustnej we właściwej kondycji jest, jak się wydaje, skuteczna metoda czyszczenia uzupełnień protetycznych (26). Do tej pory, zdolność mutanazy do usuwania płytki protez testowano w niewielu ośrodkach na świecie. W latach siedemdziesiątych XX w. duński zespół Budtz-Jørgensena prowadził szeroko zakrojone prace nad enzymatycznym oczyszczaniem protez zębowych przy użyciu dekstranazy, mutanazy i proteazy, stosowanych oddzielnie lub w mieszaninie. W charakterze kontroli używano placebo lub handlowego preparatu do czyszczenia ruchomych uzupełnień protetycznych o nazwie Steradent[®]. Badaniu poddano około 200. ochotników korzystających z kompletnych uzupełnień protetycznych. Jedynym sposobem czyszczenia aparatów w czasie trwania eksperymentów było zanurzanie ich – raz dziennie na 15 minut – w roztworze sporządzonym przez rozpuszczenie jednej tabletki preparatu enzymatycznego w 150 ml wody. Skuteczność działania enzymów oceniano na podstawie obserwacji zmian w wielkości (rozległości) płytki, stanu błony śluzowej podniebienia oraz ilości komórek drożdży w wymazach pobranych z błony śluzowej podniebienia i płytki osadzonej na powierzchni stycznej protezy z błoną śluzową.

W pierwszej fazie badań ochotnicy stosowali przez 2 tygodnie tabletki zawierające bardzo duże dawki glukanaz (około 1500 jednostek enzymatycznych) i porcję proteazy w ilości 1,5 jednostki. Stwierdzono, że mieszanina składająca się z mutanazy i proteazy skuteczniej oczyszcza protezy niż te same enzymy użyte oddzielnie, czego wyrazem była poprawa stanu błony śluzowej podniebienia, obniżenie liczby komórek drożdży w wymazach oraz spadek liczby leukocytów (23).

Następnie sprawdzono, czy mieszanka enzymatyczna użyta w bardziej racjonalnym stężeniu (5-krotnie mniejsza ilość mutanazy) zapobiega powstawaniu biofilmu na nowych, specjalnie przygotowanych dla ochotników protezach. Po miesiącu stosowania proponowanej metody czyszczenia okazało się, że płytka odkładała się za-

równy na aparatach traktowanych enzymami, placebo, jak i handlowymi preparatami czyszczącymi. Jednak w grupie ochotników stosujących enzymy do czyszczenia protez można było zaobserwować, że utworzona na uzupełnieniach protetycznych płytka miała o wiele mniejszą powierzchnię (27).

Celem ostatniego etapu badań była ocena długoterminowego (trzymiesięcznego) stosowania środka enzymatycznego do codziennego oczyszczania protez używanych od dłuższego czasu przez osoby starsze, z widocznymi zmianami zapalnymi na błonie śluzowej podniebienia, wynikającymi z korzystania z zainfekowanych uzupełnień protetycznych i złej higieny. W grupie pacjentów stosujących enzymy stwierdzono ograniczenie wielkości płytki po 6 tygodniach trwania eksperymentu, a stan błony śluzowej jamy ustnej ulegał poprawie w miarę upływu czasu (28). Dodatkową zaletą stosowania enzymatycznej metody czyszczenia uzupełnień protetycznych jest jej prostota oraz mała czasochłonność, co zmniejsza możliwość ich zniszczenia (upuszczenie, złamanie) w trakcie użytkowania przez starsze osoby. Poza tym, w obserwacji działania handlowych preparatów czyszczących wykazano, że tak krótki czas ekspozycji aparatów protetycznych na działanie tych środków jest niewystarczający, co powoduje, że są one niewiele bardziej skuteczne od placebo czy wody wodociągowej (23,26).

W badaniach nad grzybowymi i bakteryjnymi mutanazami i możliwością ich praktycznego wykorzystania w dentystyce uczestniczy od wielu lat grupa badawcza prof. Szczodraka z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w Lublinie. Ostatnio, w celu rozwiązania niektórych kwestii aplikacyjnych, zespół podjął ścisłą współpracę z Katedrą i Zakładem Stomatologii Zachowawczej AM w Lublinie. Badania z zakresu wykorzystania mutanaz w praktyce stomatologicznej należą do pionierskich w Polsce, a jednym z ich wątków jest użycie tych enzymów do usuwania płytki protez (26,29).

W doświadczeniach prowadzonych *in vitro* przetestowano działanie trzech enzymów glukanolitycznych: grzybowej egzomutanazy ze szczepu *T. harzianum* CCM F-340 (30), bakteryjnej endomutanazy z *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1 (31) oraz handlowego preparatu dekstranazy z firmy Sigma-Aldrich. Specjalnie przygotowane płytki akrylowe, imitujące aparaty protetyczne, opłaszczano wstępnie jałową śliną, a następnie osadzano na nich biofilm utworzony przez 9 gatunków bakterii izolowanych z jamy ustnej oraz jeden gatunek drożdży *C. albicans*. Płytki akrylowe pokryte biofilmem umieszczano na 12 godzin w roztworach buforowych o temperaturze 40°C, które zawierały poszczególne enzymy lub ich mieszaniny. Kontrolę stanowiły płytki zanurzone w samym buforze lub w wodzie z dodatkiem handlowego środka do czyszczenia ruchomych uzupełnień protetycznych. W badaniach po raz pierwszy zastosowano mieszaninę dwóch różnych mutanaz i dekstranazy, a ich synergiczne działanie powodowało całkowite usuwanie biofilmu osadzonego na modelu protezy (rys. 2). Należy przy tym podkreślić, że stężenia poszczególnych glukanaz w mieszaninach reagujących były kilkanaście razy niższe od tych jakie stosowano w doświadczeniach Budtz-Jørgensena (23), przy czym podobnie jak w doświadczeniach szkoły duńskiej, preparat handlowy użyty do usuwania warstwy biofilmu z płytek akrylowych był nieskuteczny, tzn. nie naruszał struktury płytki protez.



Rys. 2. Enzymatyczne usuwanie biofilmu związanego z płytką akrylową (26). Widok przed (I), po 12-godzinnej hydrolizie (II) i kilkakrotnym płukaniu wodą (III). (A – kontrola bez dodania enzymu, B – preparat handlowy, C – egzomutanaza + dekstranaza, D – endomutanaza + dekstranaza, E – egzomutanaza + endomutanaza + dekstranaza).

3. Enzymatyczny rozkład α -(1 \rightarrow 3)-glukanów ściany komórkowej

α -(1 \rightarrow 3)-Glukanazy znalazły również zastosowanie jako skuteczne narzędzie w analizie strukturalnej oraz hydrolizie α -(1 \rightarrow 3)-glukanów pochodzących z innego źródła niż paciorkowcowe. Polimery tego typu występują jako składniki strukturalne ścian komórkowych zdecydowanej większości grzybów, głównie z rodzaju *Ascomycetes* i *Basidiomycetes* (32,33) oraz niektórych roślin wyższych, np. mango (34). Ściany komórkowe grzybów składają się z pięciu głównych polimerów, β -(1 \rightarrow 3)-glukanu, β -(1 \rightarrow 6)-glukanu, α -(1 \rightarrow 3)-glukanu, chityny i glikoprotein (35), przy czym ilość α -(1 \rightarrow 3)-glukanów kształtuje się na poziomie 9-46% suchej masy ściany, a w owocnikach niektórych podstawczaków sięga nawet 88% (36).

α -(1 \rightarrow 3)-Glukanazy należą do enzymów mykolitycznych i są wykorzystywane m. in. w analizie chemicznej i w badaniach ultrastruktury ściany komórkowej grzybów oraz do produkcji biopreparatów chroniących rośliny przed grzybowymi patogenami. Selektywny rozkład poszczególnych składników ściany przy użyciu różnych glukanaz (β -(1 \rightarrow 3)-, β -(1 \rightarrow 6)-, α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy, chitynazy) zaowocował powstaniem techniki zwanej *enzyme dissection* (ang.), pozwalającej na skuteczną i efektywną izolację protoplastów z komórek grzybowych. Początkowo enzymów litycznych używano w procedurach otrzymywania wolnych od komórek ekstraktów (37) oraz uwalniania organelli komórkowych do badań biochemicznych (38). W dalszym etapie, poprzez wieloletnie doskonalenie metod enzymatycznego otrzymywania grzybowych protoplastów, przyspieszono badania związane z poznaniem struktury, wzrostu i odżywiania komórki (39,40), izolacją błon cytoplazmatycznych (41), lokalizacją enzymów (42), badaniem systemów osmotycznych (43), analizą wpływu różnych czynników fizycznych na komórkę (44,45), biosyntezą i mechanizmem działania antybiotyków (46,47) oraz regeneracją ściany komórkowej (48,49). Poza tym, uwalnianie protoplastów za pomocą enzymatycznego „koktajlu” stało się skutecznym narzędziem wykorzystywanym w inżynierii genetycznej do badań związanych z izolacją DNA (50,51) oraz fuzją protoplastów pomiędzy różnymi gatunkami: *Aspergillus nidulans* i *A. rugosus* (52), *A. nidulans* i *A. fumigatus* (53), *Mucor pusillus* i *M. miechei* (54), *Penicillium roquefortii* i *P. chrysogenum* (55), *P. chrysogenum* i *P. cyaneofulvum* (56), *Gandoderma lucidum* i *G. applanatum* (57), *Lentinus edodes* i *G. lucidum* (58).

Na rynku pojawiło się wiele preparatów zawierających enzymy lityczne, w których aktywność α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy stanowiła istotną część składową (tab. 1). Jednym z najczęściej stosowanych preparatów był Novozym 234 (zwany również Mutanase-Novozym 234), otrzymywany z hodowli *T. harzianum*. Początkowo służył on jako źródło mutanazy używanej do rozkładu α -(1 \rightarrow 3)-glukanów syntetyzowanych przez *S. mutans* (60). Jego właściwości lityczne zostały wykorzystane stosunkowo późno. W 1981 r. Stephen i Nasim (61) oraz Hamlyn i wsp. (59) użyli Novozymu 234 do izolacji protoplastów z komórek różnych grzybów. Wysoka skuteczność działania tego preparatu zaowocowała licznymi pracami i wykorzystaniem go do efektywnej izolacji protoplastów z licznych gatunków drożdży: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*

pombe, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulanas*, *Schwanniomyces alluvius* (61), *Trichosporon cutaneum* (62), *Paracoccidioides brasiliensis* (63) i grzybów strzępkowych: *Neurospora crassa* (64), *Gremmeniella abietina*, *Ascocalyx abietis* (49), *Lentinus lepideus* (48), *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. rugulosus*, *Penicillium chrysogenum*, *Volvariella volvacea* (59), *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, *Epidermophyton floccosum* (65), *Trichoderma harzianum* (66), *Trichothecium roseum* (67), *Termitomyces clypeatus* (68), *Sporotrichum thermophile* (69), *Pseudozyma flocculosa* (70), *Eremothecium ashbyii*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum* (71). Porównanie aktywności litycznej Novozymu 234 z innymi preparatami handlowymi przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1

Aktywność α -(1 \rightarrow 3)-glukanolityczna w niektórych handlowych preparatach enzymów litycznych (59,60)

Preparat enzymatyczny (Firma)	Specyficzna aktywność α -(1 \rightarrow 3)-glukanolityczna ($\times 10^{-2}$)
Novozym 234 (Novo)	6,57
Cellulase (Merck)	9,75
Cellulase CP (Sturge)	4,57
Cellulase CT (Sturge)	2,87
β -D-Glucanase (BDH)	33,3
Helicase (I ⁿ Industrie Biologique)	3,16
Lytic enzyme L ₁ (BDH)	9,68
Cereflo 200L (Novo)	10,59
β -D-Glucuronidase (Sigma)	1,30

Tabela 2

Porównanie działania litycznego handlowych preparatów enzymatycznych (o stwierdzonej aktywności α -(1 \rightarrow 3)-glukanolitycznej) w kierunku uwalniania protoplastów z komórek wybranych grzybów (59)

Preparat enzymatyczny (firma)	Liczba uwolnionych protoplastów					
	$(\times 10^{-6}/\text{ml})$					(%)
	<i>A. chrysogenum</i> ^a	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>V. volvacea</i>	<i>S. cerevisiae</i> ^b
1	2	3	4	5	6	7
Novozym 234 (Novo)	148 \pm 12	190 \pm 53	1,57 \pm 0,71	37,9 \pm 5,0	1,53 \pm 0,05	98,9 \pm 0,3
Cellulase (Merck)	8,00 \pm 3,27	2,07 \pm 0,57	0,83 \pm 0,33	–	<0,25	67,9 \pm 6,5
Cellulase CP (Sturge)	133 \pm 18	19,0 \pm 5,0	0,94 \pm 0,06	8,3	<0,25	36,4 \pm 21,9
Cellulase CT (Sturge)	1,67 \pm 1,03	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	6,40 \pm 6,80
β -D-Glucanase (BDH)	<0,25	–	–	<0,25	<0,25	<0,50
Helicase (I ⁿ Industrie Biologique)	93,3 \pm 10,3	–	–	–	–	–
Lytic enzyme L ₁ (BDH)	237 \pm 29	–	–	–	–	–

1	2	3	4	5	6	7
Cereflo 200L (Novo)	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,60±0,43
β-D-Glucuronidase (Sigma)	–	–	–	–	–	91,1±6,5

^a – poddany wstępnej obróbce za pomocą ditiotreitolu (DTT)

^b – poddany wstępnej obróbce za pomocą merkaptotetanolu

Wyższa skuteczność tego preparatu wyrażała się aktywnością w stosunku do wszystkich testowanych szczepów. Różnorodność budowy ściany komórkowej badanych grzybów była natomiast ograniczeniem dla efektywnego działania innych handlowych preparatów, szczególnie β-D-Glucanase (BDH), Helicase (l'Industrie Biologique) oraz Lytic enzyme L₁ (BDH), które były aktywne wyłącznie w stosunku do *A. chrysogenum*.

Szerokie spektrum działania Novozymu 234 związane było z tym, że posiadał on w swoim składzie całą gamę aktywności glukanolitycznych oraz proteazowych, które nie były spotykane w innych preparatach litycznych (59).

U wielu gatunków grzybów chityna i β-glukany tworzą fibrylarny szkielet ściany komórkowej, zaś do głównych komponentów wchodzących w skład spoiwa tej konstrukcji należą białka i α-glukany. Ait-Lahsen i wsp. (72) opisali α-(1→3)-glukanazę (AGN13.1) z *T. harzianum*, która wiązała się ze ścianą komórkową różnych patogennych grzybów (*A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Penicillium aurantogriseum*) i powodowała znaczną jej degradację. Wykazano, że enzym ten działa destrukcyjnie zarówno w stosunku do grzybni jak i zarodników. Dodatek do podłoża 270 μg/ml α-(1→3)-glukanazy hamował w około 70% tworzenie zarodników u *P. aurantogriseum*, a uzupełnienie 90 μg/ml AGN13.1 podłoża wzrostowego zaszczerpionego wykiełkowanymi sporami *A. niger*, *B. cinerea* oraz *P. aurantogriseum* hamowało znacząco ich rozwój.

Gatunki *Trichoderma* od wielu lat badane są pod kątem możliwości zastosowania jako czynnik biokontroli w rolnictwie (73). Kontrola biologiczna obejmuje użycie korzystnych mikroorganizmów, takich jak grzyby i bakterie, do zwalczania i kontroli patogenów roślin i chorób przez nie powodowanych. *Trichoderma* wykorzystuje kilka mechanizmów antagonizmu, m.in. aktywnie pasożytuje na gospodarzu grzybowym poprzez rozpoznawanie, wiązanie i niszczenie za pomocą enzymów jego ściany komórkowej, a następnie korzystanie z zawartości komórek patogenu. Szczególnie użyteczne są w tym procesie enzymy chitynolityczne i glukanolityczne wytwarzane przez pasożyta. Rozkładają one efektywnie ścianę komórkową gospodarza przez hydrolizę biopolimerów nie występujących w tkankach roślinnych (74). Wspomniane enzymy wchodziły w skład całego zestawu enzymatycznego, określane go mianem enzymów degradujących ścianę komórkową (ang. CWDEs). Także oczyszczone CWDEs z różnych gatunków *Trichoderma* skutecznie hamują kiełkowanie spor

i wzrost grzybni wielu patogenów, np. *Rizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, a szczególnie *Botrytis* (75).

Nieobecność w ścianie komórkowej roślin wyższych α -(1 \rightarrow 3)-glukanów i aktywności α -(1 \rightarrow 3)-glukanolitycznej daje szerokie pole do wykorzystania mikroorganizmów (szczególnie grzybów wytwarzających α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy) jako skutecznego narzędzia w walce z patogenami roślin. W tym kontekście ekspresja genu kodującego α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy w transgenicznym roślinach mogłaby spowodować nabycie przez te organizmy dodatkowej odporności na patogeny grzybowe. Z kolei α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy degradujące ściany komórkowe grzybów są już stosowane w biologicznej ochronie roślin jako komponenty biopreparatów chroniących rośliny przed grzybowymi patogenami (72).

Preparat α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy w postaci Novozymu 234 był również wykorzystywany do enzymatycznej obróbki wodnych roztworów heteropolisacharydów wytwarzanych przez *Xantomonas*, *Arthobacter* i *Sclerotium*, m.in. ksantanów (76). Ze względu na ich zdolność do znacznego zwiększania lepkości środowiska, związki te są szeroko stosowane jako środki zagęszczające w przemyśle spożywczym. Służą też do odzyskiwania ropy naftowej – wodne roztwory heteropolisacharydów o stężeniu od 300 do 3000 ppm są używane do usuwania oleju z częściowo wyczerpanych złóż. Skutkiem ubocznym ich stosowania jest jednak zatykanie porów w utworach skalnych, do których je wprowadzono. Powoduje to niepożądane wzrosty ciśnienia i niemożność odzyskania oleju. Zatykanie porów spowodowane jest obecnością w roztworach polimerów nierozpuszczalnych cząstek (bakterie) oraz półprzezroczystych agregatów lub mikrożeli. Dodatek Novozymu 234 powodował rozpuszczenie tych inkluzji, a tym samym polepszenie zdolności filtracyjnych i ułatwienie dozowania roztworów heteropolisacharydów.

4. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa wynika, że enzymatyczna hydroliza bakteryjnych i grzybowych α -(1 \rightarrow 3)-glukanów stanowi aktualny i ważny problem biotechnologiczny. Jego rozwiązanie może doprowadzić do przełomu w dentystyce, gdzie specyficzne α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (mutanazy), usuwające z powierzchni zębów paciorkowcowe mutany, można będzie efektywnie wykorzystać do zapobiegania próchnicy i oczyszczania aparatów protetycznych z bakteryjnych filmów. Próchnica zębów jest nadal naszym problemem narodowym i dotyczy 85-90% Polaków, przy czym szczególnie podatne na tę chorobę są dzieci i młodzież ze względu na specyficzną budowę zęba. Zaawansowana próchnica oraz zły stan dziąseł mogą również prowadzić do miażdżycy naczyń i chorób serca (zapalenie wsierdza, niedomykalność zastawek). W związku z tym poszukuje się intensywnie nowych induktorów i producentów mutanaz, a najnowsze badania zmierzają do skonstruowania komensalnych mikroorganizmów będących antagonistami próchnicotwórczych szczepów

pacjorkowców zmiennych. Z kolei α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy degradujące ściany komórkowe grzybów są wykorzystywane do produkcji grzybowych protoplastów i wytwarzania skutecznych biopreparatów chroniących rośliny przed grzybowymi patogenami. W ostatnich latach dokonał się też duży postęp w oczyszczaniu α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz, poznaniu ich struktury molekularnej oraz zbadaniu genów odpowiedzialnych za syntezę tych specyficznych biokatalizatorów. Kontynuacja tych badań zmierza w kierunku lepszego zrozumienia mechanizmów indukcji i regulacji syntezy α -(1 \rightarrow 3)-glukanaz, poprawienia ich stabilności oraz otrzymania genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów ukierunkowanych na szybką i wydajną produkcję tych enzymów w skali technicznej.

Literatura

1. Tsuchiya R., (2001), US Patent N° 6,254,856.
2. Hohn-Berg I. C., Kalfas S., Malmsten M., Arnebrant T., (2001), Eur. J. Oral Sci., 109, 316-324.
3. Marsh P. D., Martin M., (1994), *Mikrobiologia jamy ustnej*, PWN, Warszawa.
4. Wiater A., Szczodrak J., (2003), *Biotechnologia*, 3, (62), 193-206.
5. Guggenheim B., Haller R., (1972), J. Dent. Res., 51, 394-402.
6. Hotz P., Guggeheim B., Schmid R., (1972), Caries Res., 6, 103-121.
7. Hare M. D., Svensson S., Walker G. J., (1978), Carbohydr. Res., 66, 245-264.
8. Wiater A., Szczodrak J., Rogalski J., (2004), Proc. Biochem., 39, 1481-1489.
9. Kelstrup J., Funder-Nielsen T. D., Møller E. N., (1973), Acta Odont. Scand., 31, 249-253.
10. Fuglsang C. C., (2002), US Patent N° 6,355,228.
11. Aaslyng D., Tsuchiya R., Nielsen P. H., (1998), CA Patent N° 2294585.
12. Kim D., Kim D-W., Heo S-J., Ryu S-J., (2002), US Patent N° 6,485,953.
13. Regolati B., Guggenheim B., (1974), Helv. Odont. Acta, 18, 97-100.
14. Guggenheim B., Regolati B., Riethel P., Weller H. K., (1975), Dtsch. Zahnärztl., 30, 611-613.
15. Guggenheim B., Regolati B., Schmid R., Mühlemann H. R., (1980), Caries Res., 14, 128-135.
16. Guggenheim B., Regolati B., Mühlemann H. R., (1972), Caries Res., 6, 289-297.
17. Guggenheim B., (1970), Helv. Odont. Acta, 14, 89-108.
18. Critchley P., (1971), Dtsch. Zahnärztl. Z., 26, 1155-1161.
19. Kelstrup J., Holm-Pedersen P., Poulsen S., (1978), Scand. J. Dent. Res., 86, 93-102.
20. Tsuchiya R., Fuglsang C. C., Johansen C., Aaslyng D., (1998), J. Dent. Res., 77, 2713.
21. Asai Y., Odera M., Kikawa H., Shimotsuura I., Yokobori Y., Hirano M., Shibuya K., (1998), US Patent N° 5,741,487.
22. Inoue M., Yakushiji T., Mizuro J., Yamamoto Y., Tanii S., (1990), Clin. Prevent. Dent., 12, 10-14.
23. Budtz-Jørgensen E., Kelstrup J., (1977), Scand. J. Dent. Res., 85, 209-215.
24. Pleszczyńska M., Wiater A., Szczodrak J., Bachanek T., (2003), Nowa Stomatologia, 8, (26), 163-167.
25. Theilade J., Budtz-Jørgensen E., (1980), J. Biol. Buccale, 8, 287-297.
26. Wiater A., Pleszczyńska M., Szczodrak J., Bachanek T., (2005), Dent. Med. Probl., 42, 241-247.
27. Budtz-Jørgensen E., (1977), J. Biol. Buccale., 5, 239-244.
28. Budtz-Jørgensen E., (1978), J. Oral Rehabil., 5, 35-39.
29. Szczodrak J., Wiater A., Pleszczyńska M., (2005), Zgłoszenie patentowe nr P-373211.
30. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., Próchniak K., (2005), Braz. J. Microbiol., 36, 137-146.
31. Pleszczyńska M., Wiater A., Szczodrak J., Marek-Kozaczuk M., (2005), *1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, Badajoz, Spain, Book of Abstracts, 379.
32. Borgia P. T., Dodge C. L., (1992), J. Bacteriol., 174, 377-383.
33. James P. G., Cherniak R., (1990), Carbohydr. Res., 206, 167-172.

34. Das A., Rao C. V. N., (1965), *Aust. J. Chem.*, 18, 845-850.
35. Grün C. H., (2003), *Structure and biosynthesis of fungal α -glucans*, Ed. Grün C. H., Utrecht University, the Netherlands, 9-33.
36. Jelsma J., Kreger D. R., (1979), *Carbohydr. Res.*, 71, 51-64.
37. Eddy A. A., Williamson D. H., (1957), *Nature*, 179, 1252-1253.
38. Longley R. P., Rose A. H., Knights B. A., (1968), *Biochem. J.*, 108, 401-412.
39. Bachmann B. J., Bonner D. M., (1959), *J. Bacteriol.*, 78, 550-556.
40. Eddy A. A., Williamson D. H., (1959), *Nature*, 183, 1101-1104.
41. Garcia Mendoza C., Villanueva J. R., (1967), *Biochem. Biophys. Acta.*, 135, 189-197.
42. Nurminen T., Oura E., Suomalainen H., (1970), *Biochem. J.*, 116, 61-69.
43. Lillehoj E. B., Ottolenghi P., (1966), in: *Symposium über Hefe-Protoplasten, Jena, 1965*, Ed. R. Müller, Akademie-Verlag, Berlin, 145.
44. Svihla G., Schlenk F., Dainko J. L., (1961), *J. Bacteriol.*, 82, 808-814.
45. Rodriguez Aguirre M. J., Garcia Acha I., Villanueva J. R., (1964), *Antonie van Leeuwenhoek*, 30, 33-34.
46. Lampen J. O., Arnow P. M., Borowska Z., Laskin A. I., (1962), *J. Bacteriol.*, 84, 1152-1160.
47. Kinsky S. C., (1963), *Archs. Biochem. Biophys.*, 102, 180-188.
48. Kim B. K., Kang J. H., Jin M., Kim H. W., Shim M. J., Choi E. C., (2000), *Life Sci.*, 66, 1359-1367.
49. Petrini L., Petrini O., (2001), *Acta Biol. Hung.*, 52, 307-313.
50. Morris N. R., (1978), *J. Gen. Microbiol.*, 106, 387-389.
51. Bhanoori M., Venkateswerlu G., (1998), *Mutat. Res.*, 405, 29-34.
52. Bradshaw R. E., Lee K. V., Peberdy J. F., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3525-3533.
53. Ferenczy M., Szegedi M., Kevei F., (1977), *Experientia*, 33, 184-186.
54. Onuki T., Etoh Y., Beppu T., (1982), *Agric. Biol. Chem.*, 46, 451-458.
55. Anne J., Eyssen H., de Somer P., (1976), *Nature*, 262, 719-721.
56. Peberdy J. F., Eyssen H., Anne J., (1977), *Mol. Gen. Genet.*, 157, 281-284.
57. Park Y. D., Yoo Y. B., Shin P. G., You C. H., Cha D. Y., Park Y. H., Lee J. S., (1988), *Kor. J. Mycol.*, 16, 79-86.
58. Bok J. W., Choi E. C., Kim B. K., (1994), *Arch. Pharm. Res.*, 17, 492-496.
59. Hamlyn P. H., Bradshaw R. E., Mellon F. M., Santiago C. M., Wilson J. M., Peberdy J. F., (1981), *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 321-325.
60. Peberdy J. F., (1985), in: *Fungal protoplasts*, Eds. Peberdy J. F., Ferenczy L, Marcel Dekker, New York, 31-44.
61. Stephen E. R., Nasim A., (1981), *Can. J. Microbiol.*, 27, 550-553.
62. Liu W., Zhu W. M., (2000), *Proc. Biochem.*, 35, 659-664.
63. de Moraes Borba C., Meirelles M. N. S. L., Mendes da Silva A. M., de Oliveira P. C., (1994), *Mycoses*, 37, 317-323.
64. Quigley D. R., Taft C. S., Stark T., Selitrennikoff C. P., (1987), *Exp. Mycol.*, 11, 236-240.
65. Srikantha T., Rao G. R., (1984), *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1503-1506.
66. Stasz T. E., Harman G. E., Weeden N. F., (1988), *Mycologia*, 80, 141-150.
67. Balasubramanian N., Juliet G. A., Srikalaivani P., Lalithakumari D., (2003), *Can. J. Microbiol.*, 49, 263-268.
68. Mukherjee M., Sengupta S., (1988), *Can. J. Microbiol.*, 34, 1330-1332.
69. Johri B. N., Alurralde J. D., Klein J., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 367-371.
70. Cheng Y., Bélanger R. R., (2000), *FEMS Microbiol. Lett.*, 190, 287-291.
71. Lakshmi B. R., Chandra T. S., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 699-702.
72. Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., de la Cruz J., Monte E., Llobell A., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5833-5839.
73. Howell C.R., (2003), *Plant Dis.*, 87, 4-10.
74. Monte E., (2001), *Int. Microbiol.*, 4, 1-4.
75. Benítez T., Limón C., Delgado-Jarana J., Rey M., (1998), *Trichoderma and Gliocladium*, Eds. Kubicek C.P., Harman G.E., 2, 101-127, Taylor and Francis, London.
76. Gozard J. P., Jarry A., Luccioni A., (1988), US Patent N° 4,775,632.