

Polskie Towarzystwo Przyrodnicze
im. KOPERNIKA

KOSMOS

Wybrane zagadnienia współczesnej biotechnologii
Część 2



Tom 38

WARSZAWA 1989

Numer 1 (202)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Przepraszamy autorów i prenumeratorów za błędne
ustawienie stron 672 i 673. Pomyłka powstała w War-
szawskiej Drukarni Naukowej.

Kosmos nr 4/1988

K O S M O S

Rok założenia 1876



Warszawa 1989

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW,
WŁODZIMIERZ OSTROWSKI, HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (przewodniczący), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI
sekretarz: JADWIGA KOBUSZEWSKA

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI, ANTONI HOFFMAN,
WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW (redaktor naczelny), ALEKSANDRA PRZEŁĘCKA,
KRZYSZTOF STAROŃ, KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI
(zastępca redaktora naczelnego), JERZY ŻUK
sekretarz: JADWIGA KOBUSZEWSKA

Adres redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XIX p.,
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
(tel. 20-02-11, wewn. 25-44)

Wydano z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA, ul. MIODOWA 10

Nakład 1167+103. Ark. wyd. 12,75. Ark. druk. 9,75. Papier druk.
mat. III 71 g. B-1

Oddano do składania 4. XI. 1988 r. Podpisano do druku w
maju 1989 r. Druk ukończono w maju 1989 r.

Zam. 9/89

A-80

Cena zł 250,—

WARSZAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA, WARSZAWA, ul. ŚNIADECKICH 8

OD REDAKCJI

Zgodnie z wcześniejszą zapowiedzią, kolejny numer KOSMOSU poświęcamy współczesnej biotechnologii. Poprzednio (Kosmos t. 36 nr 2/1987) prezentowaliśmy wybrane zagadnienia dotyczące m.in. zastosowania metod i technik inżynierii genetycznej w produkcji białek leczniczych i szczepionek, a także w diagnostyce dziedzicznie uwarunkowanych chorób ludzi i zakażeń wirusowych roślin, biotechnologii antybiotyków, mikrobiologicznej utylizacji celulozy i inżynierii enzymatycznej. Obecnie przedstawiamy problematykę przemysłowych biotechnologii enzymatycznych, biosyntezy witamin oraz chemicznych systemów obronnych roślin. Artykuły dotyczące dwóch pierwszych dziedzin opracowane zostały, na zaproszenie Redakcji, przez współpracowników Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej, pod kierunkiem dyrektora Instytutu i kierownika Centralnego Programu Badań Podstawowych „Doskonalenie procesów technologicznych” — prof. dr Edwarda Galasa. Artykuł prof. dr Andrzeja Zabży o chemicznych systemach obronnych roślin kończy prezentację problematyki badawczej, mieszczącej się w Centralnym Programie badawczo-Rozwojowym „Molekularne podstawy biotechnologii”, której poświęcony był wspomniany poprzedni zeszyt KOSMOSU. Prof. dr Andrzej Zabża jest kierownikiem części tego programu, dotyczącej nisko cząsteczkowych regulatorów funkcjonowania organizmów.

EDWARD GALAS

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

TECHNOLOGIA ENZYMOWA

Technologia enzymowa zajmuje się przemysłowym wykorzystaniem preparatów enzymatycznych o mniejszym lub większym stopniu czystości. Prace dotyczące właściwości, wytwarzania i zastosowania enzymów w przemyśle prowadzone są w Polsce głównie w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej oraz we współpracujących z nim laboratoriach wyższych uczelni, w ramach CPBP: „Doskonalenie procesów biotechnologicznych”.

Zastosowanie enzymów w przemyśle zostało zapoczątkowane ponad 30 lat temu. W tym okresie nastąpił w tej dziedzinie duży postęp, czego dowodem jest chociażby wzrost wartości rynkowej enzymów przemysłowych do ponad 1 mld dolarów USA, głównie dzięki wprowadzeniu proteinaz serynowych do detergentów. Stanowią one obecnie najważniejszą grupę enzymów przemysłowych. Powodzenie proteinaz detergentowych wynika z niemożności ich zastąpienia innymi środkami. Są one endopeptydazami o wysokiej proteolitycznej aktywności i niskiej specyficzności. Ich cząsteczki zachowują stabilność w środowisku alkalicznym i posiadają optimum pH w przedziale 9,0-11,0. Nie wymagają dla swojej aktywności metali. Jest to bardzo ważna właściwość, ponieważ umożliwia stosowanie proteinaz serynowych w środkach piorących, zawierających związki kompleksotwórcze, jak np. tripolifosforany. Światowa produkcja proteinaz serynowych do środków piorących wynosi ok. 500 ton, w przeliczeniu na czyste białko. Handlowe preparaty zawierają 3-6% tego enzymu (tab. 1). Badania nad opracowaniem krajowej technologii produkcji detergentowej proteinaz są prowadzone w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej przez dra T. Trzmiela i innych pracowników tego instytutu i osiągnęły laboratoryjnie wielką skalę, tzn. objętość 80 litrów podłoża hodowlanego. We współpracy z Instytutem Chemii Przemysłowej stwierdzono, że nasz enzym, produkowany na podstawie szczepu *Bacillus*, wyselekcjonowanego przez nas, w pełni odpowiada wymaganiom stawianym przez producentów środków piorących i nie ustępuje enzymom importowanym ze strefy dolarowej.

Tabela 1

Zawartość białka i cena (w markach RFN) niektórych handlowych preparatów enzymatycznych

Enzym	Względna cena DM/kg czystego białka enzymat.	% Enzymu w preparatach handlowych	Forma fizyczna
Glukoamylaza	70	5-10	ciecz
α -Amylaza	550	1-2	ciecz
Proteinaza do detergentów	350	3-6	granulki
Izomeraza glu- kozowa	825	5-10	immobilizowa- ne granulki
Rennina cielęca (chymozyna)	14000	0,1-0,2	ciecz
Rennina mikrobiolo- giczna	1800	0,2-0,4	ciecz ¹

Instytut Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej czyni starania o kontynuację badań w większej skali w zakładzie przemysłowym.

Serynowe proteinazy i metaloproteinazy są produkowane na skalę przemysłową ze szczepów rodzaju *Bacillus*, podczas gdy kwaśne proteinazy aspartylowe otrzymuje się z grzybów, głównie z hodowli *Mucor* i *Endothea*. Wytwarzanie i zastosowanie alkalicznych proteinaz bakteryjnych przedstawione jest w artykule Galasa i Trzmiela w niniejszej publikacji. Nad otrzymywaniem i zastosowaniem proteinaz aspartylowych w serowarstwie badania w Polsce prowadzi prof. Antoni Polanowski w Instytucie Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Najbardziej zbliżony swoimi właściwościami do koagulującego mleko enzymu renniny, występującego w podpuszczce cielęcej, jest enzym z *Mucor*.

Potencjalne zapotrzebowanie na mikrobiologiczną renninę jest tak duże, że w wielu ośrodkach prowadzi się w przyspieszonym trybie prace nad genetyczną konstrukcją szczepów o zwiększonej produktywności, co pozwoli na stosowanie nie oczyszczonego enzymu.

Proteinazy serynowe znajdują coraz szersze zastosowanie również w przemyśle skórzanym do usuwania okrywy włosowej podczas wyprawy skór. W Polsce na dużą skalę wykorzystuje się proces enzymatycznej depilacji głównie w wyprawie skór świńskich. Drugim — równie ważnym procesem — jest zmiękczanie skór, tzn. nadanie im odpowiedniej miękkości; coraz częściej osiąga się ten cel na drodze enzymatycz-

nej, przeprowadzając ten proces w środowisku alkalicznym. W tradycyjnych technologiach depilację i zmiękczenie skór osiąga się przez ich zamaczanie w roztworze Na_2S w $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Alkaliczne środowisko zmiękcza skórę, a Na_2S atakuje wiązania S-S w keratynie niszcząc włos. Proces jest łatwy do kontroli, jednak wysokie stężenie Na_2S (2%) jest niebezpieczne dla pracujących i stwarza poważny problem ścieków. Proteiny serynowe z *Bacillus* przeprowadzają te procesy z zadowalającą szybkością nawet w bardzo niskim stężeniu. Uzyskuje się skórę o pięknej i równej powierzchni. Rosnące wymagania w zakresie ochrony środowiska, wysokie koszty usuwania Na_2S powodują, że proces enzymatyczny depilacji i zmiękczenia skór zdobywa coraz szersze uznanie w wielu krajach i utrwała się przekonanie, że enzymy znajdują powszechne zastosowanie w przemyśle skórzanym do odwłasniania, odwęglniania, rozmaczania, wyprawiania i uszlachetniania okryw włosowych skór futerkowych.

Innym potencjalnym zastosowaniem enzymów jest zastosowanie preparatów celulaz do degradacji materiałów celulozowych z wytworzeniem glukozy lub cukrów ulegających fermentacji. Celuloza występuje w połączeniu z ligniną i hemicelulozą w stosunku 4:3:3. W przyrodzie jest ona degradowana przez enzymy bakterii, grzybów, owadów i zwierząt na olbrzymią skalę (miliony ton dziennie).

Enzymatyczna hydroliza celulozy na skalę przemysłową do cukrów fermentujących jest nadal tylko atrakcyjną możliwością. Hydroliza negatywnej celulozy przebiega pod działaniem kompleksu enzymowego zawierającego celobiohydrolazę, endoglukanazę, egzo-1,4- β -glukozydazę i β -glukozydazę (celobiazę). Rola egzo-1,4- β -glukozydazy w kompleksie celulolitycznym była do niedawna niedoceniana. Problem ten omówiony jest dalej przez Galasa, Pyć i Romanowską.

Szybkość hydrolizy natywnej celulozy jest mała, ponadto występuje inhibicja przez produkt, który musi być usuwany ze środowiska reakcji. Wydaje się, że rozwiązanie problemu sprowadza się do wyselekcjonowania nadproducentów celulaz o wyższej produktywności od obecnie znanych i zwiększenia podatności substratu na atak enzymu. Można przyspieszyć przebieg reakcji przez rozpuszczenie celulozy w odpowiednim solwencie i przeprowadzenie następnie enzymatycznego rozkładu polisacharydu w roztworze lub po wytrąceniu w postaci zawiesiny. Ten sposób zwiększenia szybkości nie znalazł zastosowania na większą skalę mimo, że daje możliwość uzyskania glukozy z 90% wydajnością przy stężeniu substratu do 10%. Stosowane dotychczas rozpuszczalniki: trietanoloamina, wodorotlenek kadmu, kwas fluorowodorowy i mieszaniny: winian sodowy, wodorotlenek sodu, siarczyny sodu, a także stężony kwas siarkowy są zbyt drogie i obciążają środowisko. Tak więc decydującym

problemem w hydrolizie celulozy jest mała podatność substratu na atak enzymu. Jeśli ten problem znajdzie rozwiązanie, można będzie oczekiwać, że enzymatyczna degradacja celulozy będzie równie atrakcyjnym procesem, jak enzymatyczna depolimeryzacja skrobi.

Pektynazy znajdują zastosowanie w przemyśle przetwarzającym owoce i warzywa. Najszerzej są wykorzystywane w klarowaniu soków produkowanych z jabłek, grusz i winogron, w których pektyny wywołują zmętnienie i podwyższoną lepkość. Usunięcie pektyn z soków jest konieczne przed ich koncentracją. Obróbka pektynazą pulpy zwiększa wydajność soku. Pektynazy drobnoustrojowe znajdują zastosowanie w klarowaniu win i w procesach maceracji surowców roślinnych, gdzie w wyniku rozłożenia międzykomórkowej pektyny umożliwiają uzyskanie pojedynczych komórek z tkanek owoców i warzyw.

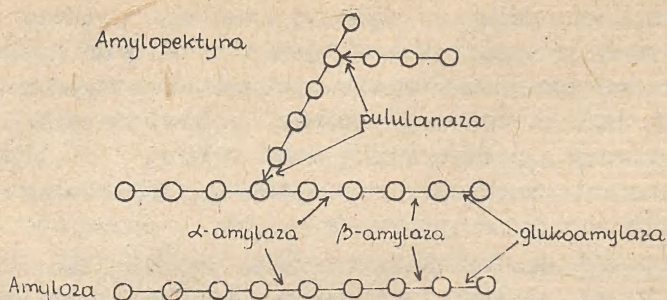
W Polsce produkuje się enzymy pektynolityczne na skalę przemysłową. Pokrywają one w dużym stopniu zapotrzebowanie krajowe. Temat ten szczegółowo omawia artykuł Galasa, Kubik i Turkiewicz.

Druga, duża rynkowo grupa enzymów, również klasyczna jak proteinazy, to karbohydrazy. Są bezkonkurencyjne w procesach hydrolizy skrobi. W ostatnim 20-leciu hydroliza skrobi dla uzyskania syropów o różnorodnym składzie osiągnęła największe znaczenie spośród wszystkich procesów przemysłowych wykorzystujących enzymy (tab. 2). Szczegółowa kombinacja enzymów i warunków daje produkty o ściśle określonych fizycznych i chemicznych właściwościach. Podstawowe procesy enzymatycznej degradacji skrobi, występującej w dwóch formach: amylopektyny i amylozy, przedstawione są na rys. 1 i 2. Niektórym bakteryjnym enzymom stosowanym w hydrolizie skrobi: α -amylazie i enzymom rozszczepiającym wiązania α -1,6-glukozydowe poświęcone są oddzielne artykuły w tej publikacji: E. Galasa i T. Bobowicz-Lassocińskiej oraz E. Galasa, E. Kwapisz i J. Polaka.

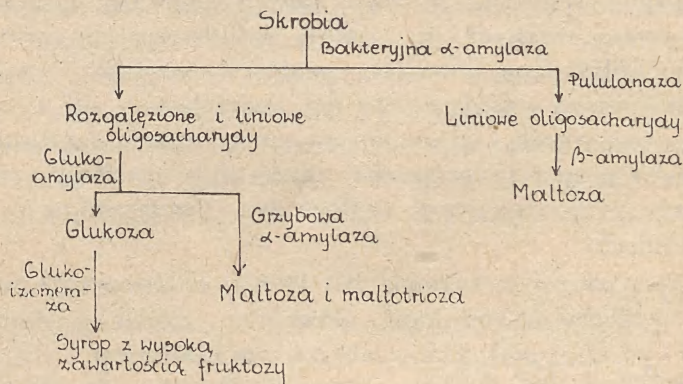
Tabela 2

Zastosowanie enzymów w różnych dziedzinach przemysłu

Detergenty: proteinaza, amylaza
Skrobia: amylaza, glukoamylaza, izomeraza glukozyowa
Mleczarstwo: mikrobiologiczna chymozyna, pepsyna, rennina
Przemysł spirytusowy: amylaza, glukoamylaza
Przemysł owocowy: pektynazy
Piekarnictwo: amylaza, proteinaza
Inne: browarnictwo, odwłascianie, białko, cukier



Rys. 1. Schematyczna struktura fragmentów amylopektyny i amylozy, przedstawiająca wiązania ulegające hydrolizie pod działaniem różnych enzymów. Krążki oznaczają reszty glukozy, przekreślone krążki odpowiadają grukozie z wolną grupą redukującą: → 1,6- α - wiązania; — 1,4- α - wiązania



Rys. 2. Przemysłowy proces hydrolizy skrobi

Innym roślinnym polisacharydem o przemysłowym znaczeniu jest dekstran, w którym dominują wiązania α -1,6-glukozydowe. Enzymatyczna degradacja dekstranów w sokach cukrowniczych przedstawiona jest bardziej szczegółowo w artykule Galasa, Kubik i Sikory.

Przemysłowa produkcja bakteryjnej α -amylazy w Polsce jest oparta na szczepie i technologii Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. Z tego też Instytutu wyjdzie niebawem technologia pululanazy.

Na przestrzeni ostatnich 10 lat dużą uwagę przywiązuje się do badań nad zachowaniem się enzymów w środowiskach o małej zawartości wody. Przywykliśmy do podręcznikowych wiadomości, że enzymy są aktywne w wodzie; okazało się, że wiele reakcji enzymatycznych może przebiegać w środowiskach zawierających poniżej 1% wody. Przeprowadza się te reakcje przy udziale enzymu immobilizowanego na nośniku utrzymującym wodę w stanie ciekłym. W tych warunkach enzym katalizuje

lizuje reakcje w stosunkowo wysokiej aktywności wodnej, podczas gdy zawartość wody w masie substratu jest bardzo niska. Reakcje enzymatyczne w rozpuszczalnikach organicznych posiadają wyjątkowo duże znaczenie w syntezie organicznej, ponieważ środowisko reakcji praktycznie pozbawione wody zabezpiecza aktywność enzymu i całkowicie zapewnia wytworzenie wiązań chemicznych, które w wodzie uległyby pełnemu rozkładowi.

W wodno-organicznych mieszaninach o wysokiej zawartości niewodnej komponenty obserwuje się przesunięcie równowagi odwracalnych reakcji hydrolizy — syntezy w stronę syntezy, np. w reakcji bezpośredniej enzymatycznej syntezy peptydów przy zastąpieniu wody mieszaniną zawierającą 85% 1,4 butandiolu stała równowagi zwiększa się 80 razy. Można w ten sposób w enzymatycznej syntezie peptydu osiągnąć wydajność 97%. Przeprowadzenie enzymatycznej reakcji w organicznych rozpuszczalnikach w wielu przypadkach jest możliwe w wyniku zastosowania suchych preparatów liofilizowanych enzymów. Wykazano, że liofilizowane preparaty pewnych enzymów, solubilizowane w rozpuszczalnikach organicznych, nie mieszających się z wodą, mają katalityczną aktywność i niezmienną specyficzność działania. Wynika stąd, że suche preparaty enzymów, zawierające minimalną ilość wody hydratacyjnej, zachowują swoje podstawowe właściwości w organicznych rozpuszczalnikach.

Innym kierunkiem w zakresie katalizy w środowiskach bezwodnych jest tzw. micelarna enzymologia. Odwrócone micelle zawierają pewną ilość wody hydratacyjnej, która zabezpiecza katalityczną aktywność enzymu zlokalizowanego w tych micelach. Zupełnie niedawno pojawił się nowy sposób solubilizacji enzymów w rozpuszczalnikach organicznych, chroniący je przed inaktywacją. Jest to tzw. kowalencyjna modyfikacja enzymu glikolem polietylenowym, mającym właściwości zarówno hydrofilowe, jak i hydrofobowe. Dzięki temu enzymy, takie jak lipaza, chymotrypsyna, katalaza, peroksydaza, stają się rozpuszczalne i zachowują aktywność w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: benzen, toluen, chlorowęglowodory.

Najpoważniejsze rezultaty przy zastosowaniu dwufazowych wodno-organicznych układów osiągnięto w enzymatycznej syntezie peptydów, reakcjach estryfikacji i transestryfikacji. Biosyntezie i zastosowaniu lipaz uczestniczących w katalizie syntezy estrów kwasów tłuszczowych i transformacji acylogliceroli poświęcony jest artykuł Antczaka, Krystynowicz i Galasa. Grupa ta ma duże osiągnięcia w zakresie biosyntezy, oczyszczania, charakterystyki i zastosowania lipaz grzybowych, zwłaszcza w odniesieniu do syntezy wiązań estrowych i laktonów kwasów tłuszczowych, a także transformacji triacylogliceroli.

Niektóre lipazy wykazują wymaganą specyficzność i odpowiednią termostabilność. Na przykład firma Novo-Industri w oparciu o lipazę z *Mucor* opracowała immobilizowany katalizator pod nazwą firmową „Lipozyme”. Może on być stosowany w masie i na kolumnach, przejawia 1,3-specyficzność wobec triglicerydów, wykazuje szeroką specyficzność wobec kwasów, działa efektywnie w rozpuszczalnikach organicznych, a także w stopionych kwasach tłuszczowych i tłuszczach w 60–80°C. Nadaje się do stosowania w syntezie estrów i do modyfikacji tłuszczu i olejów. Tak więc immobilizowane lipazy można wykorzystywać na skalę przemysłową w środowiskach bezwodnych.

Wytwarzane są również niespecyficzne lipazy mające zdolność do pełnej wymiany reszt kwasowych w triglicerydach. Lipazy te mogą całkowicie zastąpić stosowane dotychczas metody chemicznej transacylacji.

Te szczególne właściwości lipaz z powodzeniem wykorzystano w przemysłowej transacylacji tłuszczów dla celów spożywczych w układach, w których komponenty są rozpuszczone w rozpuszczalnikach lub bezpośrednio w stopionych tłuszczach. Tą drogą otrzymywane są tłuszcze o określonych właściwościach, np. masło kakaowe lub tłuszcze do pieczenia. W tabeli 3 przytoczono kilka firm, które zajmują się produkcją namiastki masła kakaowego na drodze enzymatycznej transestryfikacji.

Tabela 3

Wybrani producenci masła kakaowego przez transestryfikację

Firma	Surowce	Źródło lipazy	Warunki
Ajinomoto (1982)	olej oliwkowy lub palmowy ester etylowy kwasu stearynowego	<i>Rhizopus delemar</i>	okresowo, benzyna 40°C
Fuji Oil (1983)	środkowe frakcje oleju palmowego, ester etylowy kwasu stearynowego lub palmitynowego	<i>Rhizopus japonicus</i>	okresowo 45°C
Asohi Denka (1983)	olej palmowy, kwas stearynowy	<i>Rhizopus delemar</i>	okresowo, 40°C n-heksan
Unilever (1983)	kwas palmowy, kwas mirystynowy	<i>Asp. niger</i>	ciągły reaktor kolumnowy, 40°C

Transestryfikacja oleju oliwkowego i kwasu palmitynowego lub stearynowego pod działaniem immobilizowanej lipazy z *Rhizopus delemar* pozwala otrzymywać tłuszcze o różnej charakterystyce, np. o określonej temperaturze topnienia.

Lipazy znajdują również zastosowanie w otrzymywaniu optycznie czynnych alkoholi i estrów z racematów przez bezpośrednią estryfikację lub transestryfikację. Na przykład lipaza z *Candida cylindracea* w formie immobilizowanej katalizuje stereospecyficzną estryfikację L-mentolu i kwasu 5-fenylowaleryanowego w apolarnych rozpuszczalnikach: cykloheksanie lub izooktanie.

Lipazy znajdują obecnie zastosowanie również w pralnictwie. Zupełnie niedawno firma Novo wprowadziła nowy preparat enzymatyczny pod nazwą „Lipolaze” przeznaczony do środków piorących. Enzym charakteryzuje się szczególnymi właściwościami: zachowuje swoją aktywność w przedziale pH od 6 do 11, przy czym maksymalną aktywność przejawia w środowisku alkalicznym powyżej 10. Optymalna temp. 40°C i w tej temperaturze zachowuje stabilność w szerokich granicach pH od 6 do 10. Enzym ten produkują w hodowlach wgłębnych grzyby nitkowate alkalofilne. Organizmy te uzyskano metodami inżynierii genetycznej.

Obecnie powstaje nowy kierunek w technologii enzymowej, a mianowicie zastosowanie na skalę przemysłową enzymów przekształcających nitryle do odpowiednich amidów lub, jeśli zachodzi taka potrzeba, do kwasów karboksylowych. Handlowa nitrylaza firmy Novo Industri może być użyta do hydrolizy nitryli z dużą wydajnością, uzyskując produkt o wysokiej czystości. Przewiduje się wykorzystanie nitrylaz do produkcji kaprolaktamu, prekursora nylonu 6. Związek ten można otrzymywać z nitrylu adypinowego w wyniku jego enzymatycznego przekształcenia w monoamid. Upowszechnienie tej metody napotyka na konkurencyjne metody chemiczne, jednak bioprocess ma dużą przewagę, ponieważ nie zanieczyszcza środowiska.

Inny kierunek rysujący się obecnie w technologii enzymowej dotyczy enzymów degradujących cyjanki. Przemysł chemiczny zużywa duże ilości cyjanków (około 3 mln ton/rok). Ponadto występują one w znacznych ilościach w wielu surowcach do produkcji żywności i pasz. Ostatnio coraz więcej uwagi udziela się zastosowaniu enzymów rozkładających te związki. Główne obszary wykorzystania enzymów rozkładających cyjanki: a) ich eliminowanie z odpadów przemysłu chemicznego, b) usuwanie cyjanków z odpadów przemysłu spożywczego, c) odtruwanie żywności i paszy.

Usuwanie cyjanków z różnych materiałów może polegać na ich konwersji do amidu mrówkowego pod działaniem odpowiedniego enzymu lub na enzymatycznej transformacji do kwasu mrówkowego. Przewiduje się, że metody enzymatyczne detoksykacji cyjanków wyprą stosowane dotychczas metody chemiczne. Na razie torują sobie drogę lipazy i nitrylasy, a te z kolei ułatwiają przebicie się innym enzymom.

Perspektywy praktycznych zastosowań w przemyśle rysują się również dla litycznych enzymów ścian komórkowych drobnoustrojów, zwłaszcza w produkcji wytwarzanych przez grzyby białek, które nie ulegają sekrecji z komórek. Problematykę badań w tej dziedzinie prezentuje w swoim artykule Bielecki.

LITERATURA

1. Godtfredsen S. E., Ingvorsen K., Eigved P., Hansen T. T. — Proc. 4th European Congress on Biotechnology 4: 13, 1987.
2. Aunstrup K. — Proc. Third European Congress on Biotechnology 4: 143, 1984, Verlag-Chemie, Weinheim.
3. Cheetham P. S. J. — Enzyme Microb. Technol. 9: 194, 1987.
4. Lazar G., Henkel K. — Fette Seifen Anstrichmittel 10: 394, 1985, Elsevier, Amsterdam.
5. Siemienow A. N. — W: *Chimiczeskaja enzimologija* (Biericzin I. W., Martinek K., red.), s. 103, Izdatielstwo Moskovskogo Uniwiersitieta, 1983.
6. Inada Y., Takahashi K., Yoskimoto T., Ajima A., Matsushima A., Saito Y. — Tibtech — July, 190, 1986.

EDWARD GALAS

TADEUSZ TRZMIEL

Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka

WYTWARZANIE I ZASTOSOWANIE ALKALICZNYCH PROTEINAZ BAKTERYJNYCH

WSTĘP

W ciągu ostatniego dwudziestolecia enzymy zdobyły poważną pozycję w wielu przemysłowych procesach biochemicznych, czego wyrazem jest wzrost handlowego znaczenia preparatów enzymatycznych. Według niektórych danych [1] wartość ich produkcji w skali światowej przekroczyła w 1987 roku 1 miliard dolarów. Prawie 3/5 tej wartości przypada na enzymy produkowane w oparciu o hodowlę bakterii *Bacillus* [2]. Znanych jest aktualnie około 40 pozakomórkowych enzymów wytwarzanych przez różne gatunki bakterii tego rodzaju [3, 4]. Spośród nich na pierwsze miejsce pod względem znaczenia przemysłowego wysuwają się alkaliczne proteinazy zwane subtilizynami, stosowane głównie do wytwarzania enzymatycznych środków piorących. Ich roczna produkcja przekracza 500 ton w przeliczeniu na czyste białko enzymatyczne, co stanowi około 40% ogólnej ilości wytwarzanych w świecie enzymów [5]. Głównymi producentami preparatów proteinaz są: Dania, Holandia, Japonia, RFN i Stany Zjednoczone. Polska importuje preparaty proteinaz dla całego przemysłu krajowego. Tylko w 1987 r. do produkcji enzymatycznych proszków piorących zakupiono w Holandii 531,5 tony preparatu „Maxatase” za kwotę przekraczającą 4,5 mln dolarów. Kilka ośrodków krajowych podjęło, lub prowadzi, badania nad opracowaniem własnej technologii wytwarzania preparatów proteinazowych dla rynku. M.in. w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej przygotowuje się obecnie taką technologię do prób półtechnicznych.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ALKALICZNYCH PROTEINAZ

Proteinazy są to enzymy z podklasy hydrolaz peptydowych, katalizujące reakcje hydrolitycznego rozerwania wiązań peptydowych w białkach i peptydach. Biorąc za podstawę budowę centrum aktywnego po-

dzielono je na cztery grupy: serynowe (EC 3.4.21.), cysteinowe (EC 3.4.22.), aspartylowe (lub kwaśne — EC 3.4.23.) i metaloproteinazy (EC 3.4.24.). Alkaliczne proteinazy pozakomórkowe wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bacillus* należą do podklasy proteinaz serynowych i w „Nomenklaturze Enzymów” [6] umieszczone są pod numerem EC 3.4.21.14, jako subtilizyny. Obok alkalicznej proteinazy bakterie rodzaju *Bacillus* wytwarzają pozakomórkową metaloproteinazę (EC 3.4.24.4), zwaną zwyczajowo obojętną proteinazą z uwagi na jej optymalne pH działania 7,3 [7]. Ponadto w filtratach pochodzających z *B. cereus* wyjątkowo znaleziono proteinazę kwaśną [8].

Alkaliczne proteinazy w zależności od szczepu bakterii *Bacillus* stosowanego do ich wytwarzania mogą nieco różnić się właściwościami fizyko-chemicznymi (optymalnym pH działania, masą cząsteczkową, punktem izoelektrycznym, stabilnością, składem aminokwasowym czy zdolnością do hydrolizy syntetycznych substratów). Na podstawie tych różnic, Keay [9] podzielił subtilizyny na dwie grupy: subtilopeptydazy A i subtilopeptydazy B. Subtilopeptydazy A (m.in. obejmujące subtilizyny: Carlsberg, z *B. licheniformis* i *B. pumilus*) wykazują optimum pH 10,6 i zachowują 50% aktywności przy pH 7,5; punkt izoelektryczny (pI) tych enzymów wynosi 9,4-9,6; białko enzymatyczne zbudowane jest z 274 reszt aminokwasowych i ma więcej treoniny, argininy, tyrozyny i alaniny niż grupa subtilopeptydaz B.

Subtilopeptydazy B (m.in. subtilizyny: Novo, BPN, z *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* i z *B. subtilis* NRRL-3411) charakteryzują się niewielką zależnością aktywności od pH w przedziale 7-10,5. Optimum pH wynosi 10,2, przy czym w pH 7,5 zachowane jest 78% aktywności enzymu. Zbudowane są one z 275 reszt aminokwasowych, a ich punkt izoelektryczny mieści się w granicach pH 7,8-8,6.

Pomimo dość dużych różnic w sekwencji aminokwasów, wszystkie subtilizyny mają bardzo zbliżoną strukturę przestrzenną [10]. Przejawiają one podobny mechanizm działania i mają takie samo centrum aktywne, w którym decydującą rolę odgrywa seryna [11]. Wszystkie też ulegają całkowitej inaktywacji przez diizopropylodifluorofosforan (DFP), specyficzny inhibitor wszystkich proteinaz serynowych. Subtilizyny odporne są na działanie wielu czynników denaturujących. Utrzymują one aktywność proteolityczną i esterolityczną w stężonych roztworach mocznika, etanolu czy dioksanu. Enzymy te nie tracą aktywności w środowisku silnie alkalicznym, w obecności detergentów, wybielaczy tkanin i środków piorących [12, 13].

Niektóre szczepy *Bacillus* pod wpływem pewnych czynników (np. mutagennych), mogą wraz z subtilizynami uwalniać do podłoża hodowlanego alkaliczne proteinazy serynowe, będące w normalnych warunkach

enzymami wewnątrzkomórkowymi (np. ISP-proteinazę, Bacillopeptydazę F czy proteinazę W₁). Stwierdzono, że te wewnątrzkomórkowe proteinyzy są homologami subtilizyno-podobnych enzymów [14]. Znane są również szczepy *Bacillus* wytwarzające alkaliczne proteinyzy (aktywne i stabilne w pH 11-12), nie będące homologami subtilizyn [15]. Alkaliczne proteinyzy z grupy subtilizyno-podobnych mogą być wytwarzane także przez niektóre szczepy *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, czy też przez *Malbranchea pulchella* [16, 17, 18]. Szczegółową klasyfikację proteinał alkalicznych zaproponował w 1974 roku Morihara [19].

WYTWARZANIE PREPARATÓW ALKALICZNEJ PROTEINAZY

Technologia produkcji alkalicznej proteinyzy dzieli się na dwa główne etapy: proces biosyntezy enzymu przez bakterie i proces jego wyodrębniania z podłoża pohodowlanego bakterii. Proces biosyntezy alkalicznej proteinyzy z reguły prowadzi się w oparciu o węglbną hodowlę bakterii z rodzaju *Bacillus*. Potencjalnie dobrymi „producentami” subtilizyny są szczepy: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amylo-liquefaciens* [20, 21]. Od produktywności bakterii (ilości wytwarzanego enzymu) zależy opłacalność produkcji i koszt końcowego preparatu. Uzyskanie wysokowydajnego szczepu związane jest z wieloletnimi badaniami (wyodrębnianie drobnoustrojów ze środowiska naturalnego, selekcja, mutagenizacja i zastosowanie technik inżynierii genetycznej). Szczepy produkcyjne są odpowiednio starannie przechowywane (na skosach i w formie zliofilizowanej) i w określonych odstępach czasu uaktywniane.

Hodowlę bakterii prowadzi się w fermentorach na ciekłych pożywkach o ściśle określonym składzie. Dla każdego szczepu bakteryjnego (nawet w obrębie tego samego gatunku) skład pożywki należy dobierać indywidualnie. Niedawno wykazano [22, 23], że hodowla czystych morfologicznie wariantów *B. subtilis* na tym samym podłożu prowadzić może głównie do syntezy obojętnej proteinyzy lub wyłącznie alkalicznej. Stwierdzono ponadto, że nawet niewielkie zmiany w składzie podłoża (np. w stężeniu niektórych składników) mogą spowodować znaczne polepszenie syntezy proteinał.

Z substancji wchodzących w skład podłoża hodowlanego największy wpływ na biosyntezę proteinał mają związki stanowiące źródło węgla. Mogą to być węglowodany w postaci poli-, oligo-, jak i monosacharydów.

Stężenie skrobi lub produktów jej lhydrolizy w środowisku hodowlanym może się wahać w granicach 0,1-15% [24]. Jako źródło węgla stosuje się również glukozę, maltozę, laktozę, sacharozę, glicerol oraz sole organicznych kwasów [25, 26]. Jednakże niektóre z wymienionych cu-

krów, zwłaszcza glukoza, u pewnych szczepów mogą powodować represję kataboliczną syntezy proteinaz [27, 28]. Istotnym składnikiem podłoża hodowlanego są substancje będące źródłem azotu. Mogą nimi być zarówno substancje organiczne (mąka sojowa, białka, peptyny itp.), jak i mineralne. Ogólnie uważa się, że do indukcji biosyntezy pozakomórkowych proteinaz niezbędna jest stała obecność w środowisku hodowlanym białka-induktora [23, 29]. Wiele drobnoustrojów potrzebuje do wzrostu i rozwoju substancji biologicznie czynnych (witamin, zasad purynowych i pirymidynowych), których źródłem mogą być ekstrakty kukurydziane, drożdżowe lub kielki słodowe [26, 30, 31]. Stymulatorami biosyntezy proteinaz mogą też być jony metali Mn^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} [25, 26].

Do czynników mających wpływ na biosyntezę proteinaz należy zaliczyć także pH podłoża. Drobnoustroje produkujące alkaliczne proteiny dobrze rozwijają się w środowisku obojętnym i słabo alkalicznym [32, 33]. Również temperatura hodowli mikroorganizmów ma wpływ na syntezę enzymów. Dla bakterii z rodzaju *Bacillus* wytwarzających alkaliczną proteinazę stosuje się dość szeroki zakres temperatur — $24-36^{\circ}C$ [12, 35]. Odpowiednie stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu jest następnym ważnym czynnikiem wpływającym na syntezę proteinaz przez bakterie tlenowe. Niedostatecznie natlenione środowisko w czasie hodowli bakterii z rodzaju *Bacillus* jest często przyczyną małej wydajności biosyntezy proteinaz i innych pozakomórkowych enzymów [31, 35].

Jak już wspomniano, hodowlę bakterii prowadzi się w fermentorach, zwanych także bioreaktorami. Typowy fermentor przemysłowy [36, 37] zbudowany jest ze stali kwasoodpornej, ma płaszcz grzejny (umożliwiający zarówno sterylizację pożywki powyżej $100^{\circ}C$, jak i jej chłodzenie), wyposażony jest w układ do pomiaru i regulacji temperatury, układ napowietrzająco-mieszący (mieszadło, bełkotka); układ do pomiaru i regulacji pH oraz układ do „gaszenia” piany powstającej w czasie intensywnego mieszania pożywki. Pożywkę napowietrza się sterylnym powietrzem (cały proces hodowli bakterii prowadzony musi być w sterylnych warunkach). Pojemność fermentorów przemysłowych waha się od 6 do $150\ m^3$. Pożywkę zaszczipia się tzw. *inoculum*, 21-24 godzinną hodowlą bakterii z mniejszego fermentora, stanowiącą materiał posiewowy czystej kultury drobnoustrojów. Czas właściwej hodowli bakterii jest różny i waha się od 24 do 27 godzin [13], a nawet do 72 godzin [2]. Po zakończeniu hodowli podłoże schładza się (przeważnie do $15^{\circ}C$) i poddaje obróbce w celu wyodrębnienia preparatu enzymatycznego. Pierwszym zadaniem jakie wyłania się w tym etapie technologicznym jest oddzielenie biomasy i części stałych podłoża od cieczy. W tym celu do

podłoża pochodowlanego dodaje się odpowiednie czynniki koagulujące, np. fosforan lub chlorek wapnia, polielektrolity [38, 39]. Skoagulowane osady biomasy oddziela się od cieczy przez wirowanie [40]. Często podobny efekt uzyskuje się przez dodanie 2-4% ziemi okrzemkowej i filtrację cieczy [2]. Po oddzieleniu fazy stałej, ciecz kilkakrotnie filtruje się do uzyskania całkowitej klarowności, a następnie przepuszcza przez filtry bakteriologiczne. Tym sposobem zapewnia się osiągnięcie czystości mikrobiologicznej (jałowości) gotowego preparatu. Przesącze podłoży pochodowlanych zateża się następnie do odpowiedniego stężenia. W ostatnich latach stosuje się proces ultrafiltracji, który nie tylko pozwala zateżyć ciecz, ale i oddzielić od niej niskocząsteczkowe zanieczyszczenia [5, 40, 41]. W starszych technologiach do tego celu stosuje się zateżanie próżniowe w wyparkach.

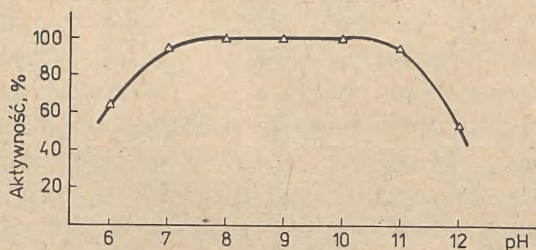
Na etapie zateżenia kończy się proces technologiczny w przypadku otrzymania ciekłych preparatów enzymatycznych. W końcowej fazie, do gotowych koncentratów ewentualnie dodaje się stabilizatory, np. 10-20% NaCl [2, 38]. Preparaty w stanie stałym otrzymuje się z częściowo zateżonych przesący przez wytrącenia proteinyazy rozpuszczalnikami organicznymi, wysalanie solami nieorganicznymi, liofilizację lub suszenie rozpyłowe. Na przykład, preparaty proteinyazy alkalicznej do enzymatycznych proszków piorących najkorzystniej jest otrzymywać przez wysalanie siarczanem sodu [2, 42]. Utworzony osad enzymu oddziela się przez wirowanie lub filtrację, suszy w suszarkach próżniowych i miele w młynkach kulowych. Od początku lat siedemdziesiątych preparaty proteinyazy alkalicznej do detergentów produkuje się w formie kapsułkowanego granulatu, aby w ten sposób zmniejszyć rozpylanie enzymu w powietrzu. W tej formie preparat enzymatyczny nie wywiera drażniącego i uczulającego działania na organizm ludzki i jest bezpieczny w masowym stosowaniu.

ZASTOSOWANIE PREPARATÓW ALKALICZNEJ PROTEINAZY

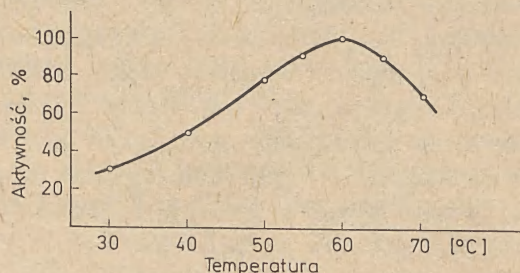
Alkaliczne proteinyazy znalazły już szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu [43, 44]. Pierwotnie proteinaz bakteryjnych używano do produkcji sucharów. Niewielkie ilości proteinaz stosuje się w przemyśle rybnym w celu przyspieszenia dojrzewania solonych i marynowanych śledzi, a w przemyśle mięsnym w procesie dojrzewania mięsa wołowego. Przemysł piwowarski wykorzystuje preparaty proteinaz do stabilizacji klarowności piwa, w przemyśle paszowym stosuje się je wraz z L-amylazą jako dodatek do pasz dla drobiu i bydła. Wysoka aktywność i stabilność w alkalicznym środowisku daje możliwość zastosowania alkalicznej proteinyazy do depilacji skór, którą przeprowadza

się w pH 9,0 [15, 45]. Z powodzeniem preparaty proteinaz stosuje się w procesach oczyszczania ścieków przemysłowych, zawierających różnorodne substancje organiczne, w tym głównie białka [45]. Z innych zastosowań można wymienić przemysł kosmetyczny, wykorzystujący proteiny jako dodatek do past do zębów, bądź razem z lipazami jako składnik środków przeciwlupieżowych, do pielęgnacji skóry i włosów itp. [45, 46].

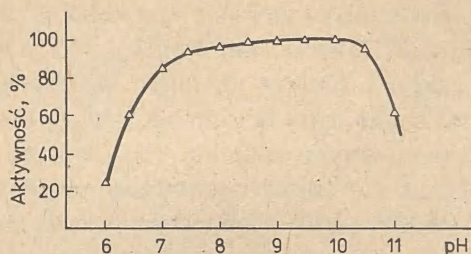
Jednakże największe zastosowanie preparaty alkalicznej proteiny znalazły w przemyśle środków piorących [2, 47]. Od lat szukano łatwego sposobu usuwania z powierzchni tkanin nierozpuszczalnych w wodzie plam pochodzenia organicznego zawierających krew, tłuszcz, śluz, skrobię itp. Problem ten rozwiązano dodając do środków piorących alkaliczną proteinazę. Dodatek enzymu waha się w granicach 0,5-1%. O szczególnej przydatności i efektywności działania alkalicznej proteiny w środkach do prania decydują następujące jej właściwości: wysokie pH i temperatura działania, trwałość w alkalicznym środowisku, względnie wysoka termostabilność, niezależność aktywności od stężenia jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} , trwałość w roztworach wobec innych składników piorących. Na rysunkach 1, 2, 3 i 4 oraz w tabeli 1 przedstawiono charakterystycz-



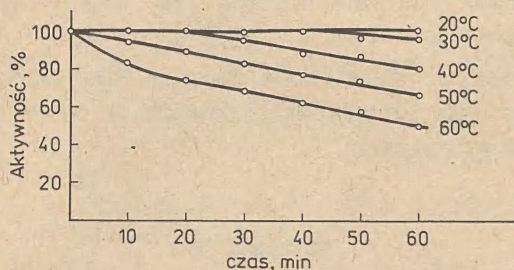
Rys. 1 Wpływ pH na aktywność preparatu „Protogal S”



Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność preparatu „Protogal S”



Rys. 3. Wpływ temperatury na stabilność preparatu „Protogal S”



Rys. 4. Wpływ pH na stabilność preparatu „Protogal S”

Tabela 1

Stabilność preparatu „Protogal S” w roztworach zawierających substancje stosowane w enzymatycznych środkach piorących

Składnik środka piorącego	Udział % w proszku	Stężenie składnika w 100 ml roztworu w mg	Pozostała po 60 min. inkubacji aktywność enzymatyczna w stos. do roztw. wodnego, w %
Deterlon	20	200	46
Kosulfonat	15	150	93
Mydło	10	100	33
Rokafenon N-8	25	250	81
Rokanol RZ-12	20	200	83
Kaminox R2RM	5	50	17
Trójpolfosforan sodowy	30	300	92
Trójpolfosforan sodowy	40	400	37
Ergon B	3	30	80
Glikocel	3	30	64
Metakrzemian sodu	5	50	100
Szkło wodne	10	10	79
Węglan sodowy	10	100	70
Kwaśny węglan sodowy	20	200	91
Siarczan sodowy	15	150	62
Nadboran sodowy	15	150	97
Podchloryn sodowy	5	50	70

ne własności preparatu alkalicznej proteinazy, „Protogal S”, otrzymywanego w skali wielkolaboratoryjnej (pojemność fermentora 150 dm³) w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. Od kilku lat prowadzi się na całym świecie badania zmierzające do opracowania technologii otrzymywania alkalicznej proteinazy w formie unieruchomionej na nierozpuszczalnym nośniku. Pomimo, że w skali przemysłowej proces dotychczas nie został opanowany, znaleziono już potencjalne możliwości zastosowania unieruchomionej proteinazy. I tak np. duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem unieruchomionej formy proteinazy alkalicznej do produkcji penicyliny [48], do rozdziału syntetycznych, racemicznych pochodnych aminokwasów [48, 50], do otrzymywania syntetycznych estrów [51].

Można przypuszczać, że w miarę doskonalenia metod unieruchomiania alkalicznej proteinazy, jej preparaty znajdą się w powszechnym użyciu w wielu gałęziach przemysłu.

LITERATURA

1. Godtfredsen S. E., Ingvorsen K., Eigtved P., Hansen T. T. — Proc. 4th European Congress on Biotechnology 4: 13, 1987.
2. Aunstrup K., Andersen O., Falch E. A., Nielsen T. K. — Microb. Technol. 1: 282, 1979.
3. Priest F. G. — Bacteriol. Rev. 41: 711, 1977.
4. Zemek J., Augustin J., Borriß R., Kuniak L., Svabova M. — Folia Microbiol. 26: 403, 1981.
5. Aunstrup K. — Appl. Biochem. Biotechnol. 2: 198, 1980.
6. *Enzyme Nomenclature* — Academic Press, London 1984.
7. Keay L., Wildi P. S. — Biotechnol. Bioengin. 12: 179, 1970.
8. Melachouris N., Tukey S. L. — J. Dairy Sci. 51: 650, 1968.
9. Keay L., Moser P. W., Wildi B. S. — Biotechnol. Bioengin. 12: 213, 1970.
10. Bosshard H. R., Berger A. — Biochemistry 13: 266, 1974.
11. Markley J. L. — Biochemistry 17: 4648, 1978.
12. Christensen P. N., Holm P., Sonder B. — J. Amer. Oil Chemists Soc. 55: 109, 1978.
13. Patent PRL 137479, 1984.
14. Strongin A. Y., Izotova L. S., Abramov Z. T., Ermakova L. M. — Arch. Microbiol. 119: 287, 1978.
15. Aunstrup K., Outtrup H., Andersen O. — Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, Kyoto, 1972.
16. Gaucher G. M., Stevenson K. J. — W: *Methods in enzymology*. T. XLX, Academic Press, London, 1967.
17. Mosolov V. V., Fedurkina N. N., Valueva T. A. — Biochem. Bioph. Acta 522: 187, 1978.
18. Glemża A. A. — Prikl. Biochim. Mikrobiol. 18: 792, 1982.
19. Morihara K. M. — Adv. Enzymology 41: 179, 1974.
20. Keay L. — Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, Kyoto, 1972.

21. Jemceva T. W., Konovalov S. A. — Prikl. Biochim. Mikrobiol. 14: 661, 1978.
22. Bachmatova I. W., Glemza A. A., Zharikova P. G. — Prikl. Biochim. Mikrobiol. 17: 415, 1981.
23. Strongin A. J., Lukin A. A., Izotova L. S., Ermakova L. M., Stepanov A. M. — Mikrobiologia 46: 539, 1977.
24. Patent 20 23847, Francja, 1971.
25. Coleman G. — J. Gen. Microbiol. 49: 421, 1967.
26. Jemceva T. W. — Prikl. Biochim. Mikrobiol. 11: 391, 1975.
27. Barr J. G. — J. Appl. Bacteriol. 39: 1, 1975.
28. Heinken F. G., O'Connor R. J. — J. Gen. Microbiol. 73: 35, 1972.
29. Trzmiel T. — Praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź, 1983.
30. Patent 3632 957, USA, 1973.
31. Markkanen P. H., Bailey M. I. — J. Appl. Biotechnol. 24: 93, 1974.
32. Kitada M., Horikoshi K. — J. Ferment. Technol. 54: 579, 1975.
33. Patent 472797, Japonia, 1973.
34. Stahls S., Olsson O. — Arch. Microbiol. 113: 221, 1977.
35. Trzmiel T., Idziak J., Galas E. — *Postępy Inżynierii Bioreaktorowej II Sympozjum*, Łódź, 1985.
36. Atkinson B. — *Biochemical reactors*. Pion Limited, London, 1974.
37. Brauer H. — *Biotechnology* 2: 395, 1985.
38. Rzędowski W., Załęski J. — *Przem. Ferment. Roln.* 1: 1, 1975.
39. Galas E., Trzmiel T., Idziak J., Szczesna M. — *Biotechnologia i chemia żywności*. Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Łódź, 1985.
40. Charm S. E., Matteo C. C. — W: *Methods in enzymology*. T. XXII, Academic Press, London, 1971.
41. Kałumiane K. A., Golger L. I. — *Mikrobnnye fermentnyye preparaty*. Piszczewaja Promysliennost, Moskwa, 1979.
42. Zgł. patentowe PRL P-260887, 1986.
43. Sawicka R. — *Przem. Ferment. Roln.* 5: 2, 1977.
44. Cotle J. — *Rivista Italiana* 59: 5, 1977.
45. Walker G. J., Dewar M. D. — *Carbohydr. Res.* 39: 303, 1975.
46. Aunstrup K. — W: *Biotechnological applications of protein and enzyme*. Academic Press, New York, 1977.
47. Schutt K., Schmidt-Kostner G., Arens A. — *Biotechnol. Bioengin.* 27: 420, 1985.
48. Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K. — *Biotechnol. Bioengin.* 19: 1351, 1977.
49. Olivien R., Fascetti E., Angelini L., Depen L. — *Enzym. Microbiol. Technol.* 1: 201, 1979.
50. Ingalls R. G., Squires R. G., Butler L. G. — *Biotechnol. Bioengin.* 17: 1627, 1975.

EDWARD GALAS

RITA PYC

IRENA ROMANOWSKA

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

EGZO-1,4- β -GLUKOZYDAZA

W artykule niniejszym przedstawiono obecne poglądy na rolę w hydrolizie celulozy, najmniej poznanego składnika kompleksu celulolitycznego — egzo-1,4- β -glukozydazy.

Szerokie studium dotyczące natury substratów celulozowych oraz ich celulolizy zostało przeprowadzone przez Cebrata [1], eksponującego rolę w tym procesie trzech podstawowych składników kompleksu celulolitycznego: endoglukanazy, celobiohydrolazy i β -glukozydazy. Niniejsze opracowanie poszerza przedstawione przez Cebrata wiadomości na temat mechanizmu enzymatycznej hydrolizy celulozy, poprzez podkreślenie w tym mechanizmie niedocenionej często roli egzo-1,4- β -glukozydazy.

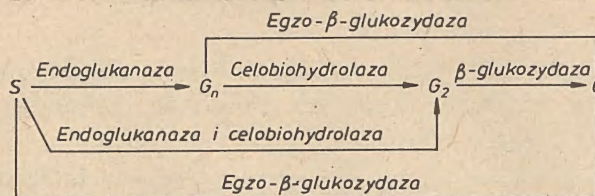
MECHANIZM DEGRADACJI CELULOZY

Grupa enzymów, katalizujących hydrolityczny rozkład celulozy i jej pochodnych, została nazwana kompleksem celulolitycznym. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, kompleks celulolityczny składa się z czterech typów hydrolaz [2]:

1. Celulazy, czyli endo-1,4- β -glukanazy, dla której często w literaturze stosuje się nazwę endoglukanaza (4-glukanohydrolaza-1,4- β -D-glukanu, EC 3.2.1.4).
2. 1,4- β -Celobiozydazy celulozy, czyli egzo-celobiohydrolazy określanej w literaturze jako celobiohydrolaza (celobiohydrolaza-1,4- β -D-glukanu EC 3.2.1.91).
3. 1,4- β -Glukozydazy glukanu, czyli egzo-1,4- β -glukozydazy (glukohydrolaza-1,4- β -D-glukanu, EC 3.2.1.74). Dla enzymu tego przyjęto w niniejszym artykule skrótową nazwę egzo- β -glukozydaza.
4. β -Glukozydazy, czyli celobiazy (glukohydrolaza- β -D-glukozydu, EC 3.2.1.21).

W związku z ogromną złożonością kompleksu celulolitycznego, poglądy dotyczące mechanizmu degradacji celulozy na przestrzeni wielu lat ulegają ciągłym zmianom i do tej pory mechanizm ten nie jest w pełni wyjaśniony. Większość proponowanych w literaturze schematów hydrolizy celulozy, uwzględnia w nim udział tylko trzech podstawowych składników kompleksu celulolitycznego: endoglukanazy, celobiohydrolazy i β -glukozydazy, pomija natomiast ważną rolę egzo- β -glukozydazy [3, 4].

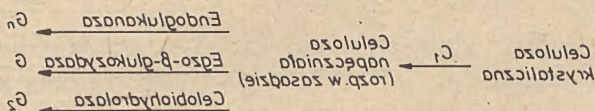
Przekonujący schemat enzymatycznej hydrolizy celulozy został zaproponowany przez Kłosow a [5-8] (rys. 1).



Rys. 1. Schemat enzymatycznej hydrolizy celulozy zaproponowany przez Kłosow a. S — substrat celulozowy, G_n — celooligosacharydy, G_2 — celobioza, G — glukoza

Zgodnie z koncepcją Kłosow a, endoglukanaza działa na substrat celulozowy w sposób nieuporządkowany, dając częściowo rozłożoną celulozę nierozpuszczalną (podczas hydrolizy nierozpuszczalnych substratów) oraz mieszaninę podstawionych celodekstryn (podczas hydrolizy rozpuszczalnych pochodnych celulozy, np. karboksymetylocelulozy (CMC)). Celobiohydrolaza oraz częściowo endoglukanaza odszczepiają hydrolitycznie celobiozę od nieredukujących końców łańcuchów poli- lub oligosacharydów. β -Glukozydaza katalizuje hydrolizę celobiozy do glukozy. Wreszcie egzo- β -glukozydaza odszczepia reszty glukozy bezpośrednio od nieredukującego końca łańcucha celulozy lub celooligosacharydów.

Rola egzo- β -glukozydazy w hydrolizie celulozy została wcześniej już dostrzeżona przez Reese'a [9], który opracował metodę oznaczania tego enzymu i wykazał jego obecność w wielu kompleksach enzymatycznych (rys. 2).



Rys. 2. Schemat enzymatycznej hydrolizy celulozy zaproponowany przez Reese'a

Również wielu innych autorów [10], chociaż z niezwykłą ostrożnością, uwzględniało udział egzo- β -glukozydazy w mechanizmie rozkładu celulozy, jednakże istotne wady metody Reese'a oznaczania tego enzymu (trudno dostępny substrat) uniemożliwiały do lat osiemdziesiątych (do momentu opracowania przez Klosowa nowej metody jego oznaczania) szczegółowe zbadanie tego zagadnienia.

Brak w literaturze określonego mechanizmu enzymatycznej hydrolizy celulozy wynika przede wszystkim z wykorzystania przez różnych autorów kompleksów celulolitycznych o różnym składzie jakościowym i ilościowym, różniących się szybkością hydrolizy celulozy. Prowadzi to do wysuwania niejednoznacznych wniosków, opartych na wynikach pomiarów oznaczania aktywności poszczególnych składników tego kompleksu w różnych warunkach i przy użyciu różnych substratów celulozowych. Ponadto, większość autorów dokonujących analizy kinetyki enzymatycznej hydrolizy celulozy, rozpatruje oddzielnie efekty działania każdego ze składników kompleksu celulolitycznego. Uproszczenie to, dla większości rozpatrywanych przypadków, obarczone jest dużym błędem, gdyż dla różnych kompleksów celulolitycznych etapy ograniczające szybkość hydrolizy celulozy są różne. Poza tym szybkość hydrolizy celulozy może ulegać zmianie w trakcie prowadzenia tego procesu.

ROLA EGZO- β -GLUKOZYDAZY W HYDROLIZIE CELULOZY

Pomimo umieszczenia w „Nomenklaturze enzymów” egzo- β -glukozydazy (EC 3.2.1.74), enzymu odszczepiającego cząsteczki glukozy od nieredukującego końca łańcucha celulozy, nieznany był do niedawna stopień jego rozprzestrzenienia w większości kompleksów celulolitycznych różnego pochodzenia. W procesie enzymatycznej hydrolizy celulozy, część glukozy winna więc być tworzona bez udziału β -glukozydazy i ta część glukozy powinna powstawać wskutek działania egzo- β -glukozydazy (rys. 1). Wielu autorów [11, 12] uważa jednakże, że glukoza tworzy się w zasadzie w wyniku działania β -glukozydazy oraz wewnątrzcząsteczkowego działania endoglukanazy i celobiohydrolazy na celooligosacharydy. Specjalne badanie tego problemu przy użyciu ilościowych metod kinetycznych prowadzone przez Sinicyna i in. [5, 13] pozwoliło na stwierdzenie, że w literaturze nie jest doceniana rola egzo- β -glukozydazy w hydrolizie celulozy i że w wielu preparatach celulolitycznych, egzo- β -glukozydaza odgrywa większą rolę w tworzeniu glukozy niż β -glukozydaza.

W celu oceny roli egzo- β -glukozydazy i β -glukozydazy w tworzeniu glukozy z celulozy, Kłosow i in. [5, 7, 8] określali kinetykę hydrolizy rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych substratów celulozowych, prowadzonej przy użyciu różnych kompleksów celulolitycznych, przedstawionych w tabeli 1.

Tabela 1

Aktywność różnych kompleksów celulolitycznych

Rodzaj preparatu	Rodzaj mikroorganizmu	Aktywność [IU/g]		
		endoglu- kanaza	egzo- β -glu- kozydaza	β -gluko- zydaza
Płyn pohodowlany *	<i>T. reesei</i> 13/10	8,6	2,10	0,03
	<i>T. viride</i> 44	4,8	1,20	0,05
	<i>G. candidum</i> 3C	0,7	0,14	1,30
	<i>T. longibrachiatum</i>	1,8	0,38	0,03
	<i>A. terreus</i> 17p	4,2	0,16	0,37
	<i>A. niger</i> [20]	12,0	0,85	9,64
Prep. handlowe				
Nagase (Japonia)		60	20	17
Rapidase (Francja)		700	5	< 1
Serva (RFN)	<i>A. niger</i>	120	20	425
Sigma (USA)	<i>A. niger</i>	110	< 7	735
Koch- Light (W. Br.)	<i>A. niger</i>	290	5	50
Sigma (USA)	<i>T. viride</i>	20	3	11
Novo (Dania)	<i>T. reesei</i>	3000	350	20
Preparaty techniczne oczyszczone metodą filtracji w żelu	<i>T. lignorum</i>	830	130	100
	<i>T. lignorum</i>	830	200	270
	<i>T. longibrachiatum</i>	1000	175	70
	<i>G. candidum</i>	5700	250	90
	<i>G. candidum</i>	4000	600	800
	<i>T. koningii</i>	1300	180	57
	<i>A. awamori</i>	170	240	6200
	<i>A. terreus</i>	1160	120	130

* Aktywność [IU/ml]

Wiadomo, że jednym z produktów enzymatycznej hydrolizy celulozy jest glukoza. Zgodnie z powszechnym do niedawna przekonaniem, glukoza ta tworzy się w zasadzie (a zdaniem niektórych autorów — wyłącznie) w wyniku hydrolizy celobiozy (pośredniego produktu rozkładu celulozy) prowadzonej za pomocą β -glukozydazy. Jednakże, czy β -glukozydaza wszystkich przedstawionych w tabeli 1 kompleksów celulolitycznych jest zdolna do tworzenia całej ilości glukozy w procesie hydrolizy celulozy? Gdyby tak było, wówczas w układzie reakcyjnym celobioza winna nagromadzić się w takim stężeniu, przy którym szybkość jej rozkładu zgodnie ze stałą Michaelisa-Menten winna być równa szybkości tworze-

nia glukozy. Jednakże teoretyczne stężenie celobiozy obliczone przy założeniu, że z niej powstaje cała ilość glukozy w mieszaninie reakcyjnej, dla większości kompleksów celulolitycznych (przedstawionych w tab. 1) znacznie przewyższa stężenie celobiozy i oligosacharydów rzeczywiście tworzących się w tej reakcji. Świadczy to o obecności w przedstawionych kompleksach innego poza β -glukozydazą enzymu, w wyniku działania którego powstaje glukoza. Teoretyczne stężenie celobiozy oblicza się wg wzoru [8]:

$$[G_2]_{\text{teor.}} = \frac{K_3}{\frac{2V_3}{v_{st}} - 1}, \quad [1]$$

gdzie: v_{st} — stacjonarna szybkość tworzenia glukozy z CMC pod wpływem kompleksu celulolitycznego,

K_3 i V_3 — stała Michaelisa-Menten i maksymalna szybkość działania β -glukozydazy w kompleksie celulolitycznym (wielkości ustalone doświadczalnie).

Względny udział β -glukozydazy i egzo- β -glukozydazy w hydrolizie CMC do glukozy przedstawia tabela 2 [7, 8]. Udział egzo- β -glukozydazy w tym procesie określono z różnicy między szybkością tworzenia glukozy ustaloną eksperymentalnie, a obliczoną teoretycznie wg wzoru [1].

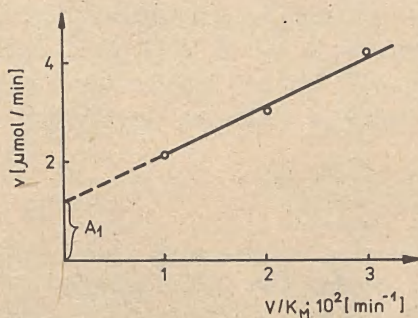
Tabela 2

Porównanie roli egzo- β -glukozydazy i β -glukozydazy z różnych kompleksów celulolitycznych w hydrolizie CMC do glukozy

Źródło enzymów	Metoda oznaczania	Względny udział w hydrolizie [%]	
		β -glukozydaza	egzo- β -glukozydaza
<i>G. candidum</i>	obliczenia teoretyczne wg zależności [1]	15-40	60-85
<i>T. reesei</i>		2	98
<i>S. dimorphosporum</i>		5	95
<i>T. lignorum</i>		15-40	60-85
<i>T. koningii</i>		20	80
<i>T. longibrachiatum</i>		40	60
<i>A. niger</i>		70-100	0-30
<i>A. foetidus</i>		100	0
<i>T. reesei</i>	selektywna inhibicja β -glukozydazy glukonolaktone	8	92
<i>T. longibrachiatum</i>		30	70
<i>T. lignorum</i>		70	30
<i>A. foetidus</i>		100	0

Z przedstawionych danych wynika, że główny udział w tworzeniu glukozy z CMC przez kompleks celulolityczny z *Trichoderma* i *Geotrichum* odgrywa egzo- β -glukozydaza. Natomiast kompleks celulolityczny z *Aspergillus* tworzy glukozę głównie pod działaniem β -glukozydazy.

Przy użyciu przytoczonej wyżej metody nie można ustalić udziału egzo- β -glukozydazy w hydrolizie celulozy dla preparatów celulolitycznych o stosunkowo wysokiej aktywności β -glukozydaz, dla których $[G_2]_{\text{teor.}} < [G_2 + G_n]_{\text{eksp.}}$. Kłosow [5, 7, 8] stwierdził, że po dodaniu niewielkich ilości β -glukozydazy do badanego kompleksu celulolitycznego, szybkość tworzenia glukozy z CMC jest proporcjonalna do aktywności β -glukozydazy (rys. 3). Ekstrapolacja tej zależności do teoretycznej zerowej zawartości β -glukozydazy w badanym kompleksie celulolitycznym pozwoliła na wysunięcie wniosku, że glukoza tworzona jest w badanym procesie nawet przy nieobecności β -glukozydazy. Dane te przekonująco wskazują na udział egzo- β -glukozydazy w hydrolizie karboksymetylocelulozy do glukozy.



Rys. 3. Wpływ ilości β -glukozydazy dodanej do kompleksu celulolitycznego, na stacjonarną szybkość uwalniania D-glukozy z karboksymetylocelulozy. Symbol A_1 odpowiada aktywności egzo- β -glukozydazy

Rola egzo- β -glukozydazy w hydrolizie celulozy została również potwierdzona przez Kłosow [8, 13] metodą selektywnego hamowania działania β -glukozydazy zawartej w badanym kompleksie celulolitycznym, przy użyciu D-glukono-1,5- δ -laktonu. W ten sposób glukoza powstająca w wyniku hydrolizy celulozy jest efektem działania egzo- β -glukozydazy zawartej w tym kompleksie. Określony powyższą metodą udział egzo- β -glukozydazy w hydrolizie celulozy przedstawiono w tabeli 2 [8]. Wyniki te są porównywalne z uzyskanymi za pomocą poprzednio opisanej metody.

Szczegółowe badania dotyczące roli egzo- β -glukozydazy i β -glukozydazy w hydrolizie celulozy wykazały [8, 13], że w miarę wzrostu stopnia hydrolizy celulozy, ulega zmianie względna rola tych enzymów w tworzeniu glukozy (tab. 3).

Tabela 3

Wpływ czasu reakcji na zmiany roli egzo- β -glukozydazy i β -glukozydazy z różnych kompleksów celulolitycznych w hydrolizie substratów celulozowych

Źródło enzymów	Czas reakcji [h]	Udział egzo- β -glukozydazy w tworzeniu glukozy [%] z		
		CMC	bibuła filtracyjna	celuloza mikrokryst.
<i>T. reesei</i>	0,5	98	95	56
	6	55	33	42
	24	0	11	20
<i>T. longibrachiatum</i>	0,5	57	69	42
	6	46	33	—
	24	0	20	—
<i>T. lignorum</i>	0,5	70	38	30
	6	30	33	28
	24	0	25	25

Z danych przytoczonych w tabeli 3 widać, że w początkowym okresie enzymatycznej hydrolizy substratów celulozowych, glukoza tworzona jest głównie w wyniku działania egzo- β -glukozydazy. W miarę upływu czasu reakcji, udział egzo- β -glukozydazy w tworzeniu glukozy ulega wyraźnemu obniżeniu, na korzyść glukozy tworzonej pod wpływem β -glukozydazy. Po ok. 24 godzinach tego procesu, glukoza tworzona jest głównie w wyniku działania β -glukozydazy, a nie egzo- β -glukozydazy.

Powyższe zjawisko tłumaczy się [8, 13] sukcesywnym obniżaniem szybkości działania endoglukanazy, gdyż wraz ze wzrostem stopnia konwersji celulozy, maleje ilość łatwo dostępnych części substratu do działania tego enzymu. Ponieważ endoglukanaza limituje działanie egzo- β -glukozydazy w hydrolizie nierozpuszczalnych substratów celulozowych, więc szybkość tworzenia glukozy w wyniku działania egzo- β -glukozydazy konsekwentnie zmniejsza się. Tymczasem β -glukozydaza nadal, ze stałą szybkością, hydrolizuje pośredni produkt hydrolizy — celobiozę do glukozy, tym samym stopniowo zwiększając udział tego enzymu w tworzeniu ogólnej ilości glukozy.

W przypadku rozpuszczalnej karboksymetylocelulozy, endoglukanaza stosunkowo szybko rozszczepia substrat, po czym praktycznie wstrzymuje swoje działanie, podczas gdy egzo- β -glukozydaza i β -glukozydaza

wolno wytwarzają glukozę. Ponieważ szybkość działania egzo- β -glukozydazy stopniowo maleje w miarę skracania się łańcuchów podstawionych celooligosacharydów, a specyficzność β -glukozydazy w stosunku do celobiozy jest stała, wzrasta więc względny udział tej ostatniej w tworzeniu glukozy z rozpuszczalnego substratu celulozowego.

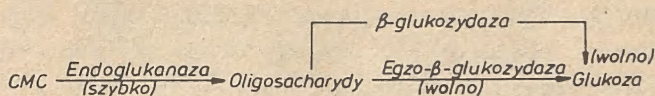
Zgodnie więc z przytoczonymi powyżej faktami, stopniowe obniżanie roli egzo- β -glukozydazy w hydrolizie celulozy, w miarę wzrostu stopnia konwersji substratu, uwarunkowane jest parametrami kinetycznymi działania poszczególnych składników kompleksu celulolitycznego prowadzącego hydrolizę.

WPLYW STRUKTURY SUBSTRATU NA SZYBKOŚĆ JEGO HYDROLIZY

Szybkość hydrolizy substratów celulozowych, prowadzonej przy użyciu egzo- β -glukozydazy, w istotny sposób zależy od ich struktury wewnętrznej i maleje w następującej kolejności [8, 13]: karboksymetyloceluloza — bibuła filtracyjna — mikrokryształiczna celuloza. Na przykład, szybkości tworzenia glukozy [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$] z przedstawionych wyżej substratów, przez egzo- β -glukozydazy różnych szczepów grzybów wynoszą odpowiednio: dla *T. reesei* — 55:21:9, dla *T. longibrachiatum* — 20:15:5 i dla *T. lignorum* — 16:35:0,25 (stężenie CMC — 3 g/l, a stężenie substratów nierozpuszczalnych — 7,5 g/l, pH 4,5, temp. 20°C). Spadek szybkości działania egzo- β -glukozydazy na substraty celulozowe w przedstawionym szeregu, odzwierciedla wzajemne zależności między fazami limitującymi szybkość hydrolizy tych substratów o różnych strukturach wewnętrznych.

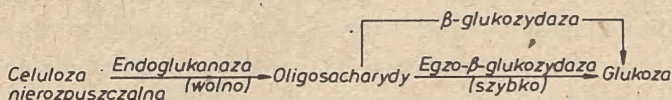
Klosow i Sinicyn [8, 13] stwierdzili, że w procesie enzymatycznej hydrolizy rozpuszczalnego substratu — karboksymetylocelulozy, szybkość działania endoglukanazy na ten substrat jest znacznie większa od szybkości działania na niego pozostałych składników kompleksu celulolitycznego i nie limituje ona ogólnej szybkości tworzenia glukozy. W tym przypadku, enzymami limitującymi szybkość tworzenia glukozy są β -glukozydaza i (lub) egzo- β -glukozydaza.

Z punktu widzenia etapów reakcji limitujących szybkość tworzenia glukozy z rozpuszczalnej karboksymetylocelulozy, związek ten jest istotnie odpowiednim substratem do określania aktywności egzo- β -glukozydazy kompleksu celulolitycznego. Jeśli selektywnie zahamujemy działanie β -glukozydazy, np. za pomocą glukonolaktonu, wówczas szybkość tworzenia glukozy z CMC limitowana jest tylko szybkością działania egzo- β -glukozydazy. Przedstawione fakty stanowią podstawę wykorzystania CMC — rozpuszczalnej pochodnej celulozy — do oznaczania aktywności egzo- β -glukozydazy w kompleksie celulolitycznym (rys. 4).



Rys. 4. Enzymy limitujące szybkość tworzenia glukozy z rozpuszczalnej karboksymetylocelulozy

Z kolei, w procesie hydrolizy nierozpuszczalnych substratów celulozowych, szybkość działania endoglukanazy ulega istotnemu obniżeniu i może ona w znacznym stopniu limitować szybkość tworzenia glukozy [8, 13] (rys. 5).



Rys. 5. Enzymy limitujące szybkość tworzenia glukozy z nierozpuszczalnej celulozy

Zgodnie z przedstawionym schematem, szybkość tworzenia glukozy z nierozpuszczalnych substratów celulozowych, w obecności nadmiaru glukonolaktonu, charakteryzuje aktywność endoglukanazy kompleksu celulolitycznego, a nie aktywność zawartej w tym kompleksie egzo- β -glukozydazy. Przedstawiony fakt jest wskazówką do ostrożnego wyciągania wniosków z analizy kinetycznej enzymatycznej hydrolizy nierozpuszczalnych substratów celulozowych.

METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI EGZO- β -GLUKOZYDAZY

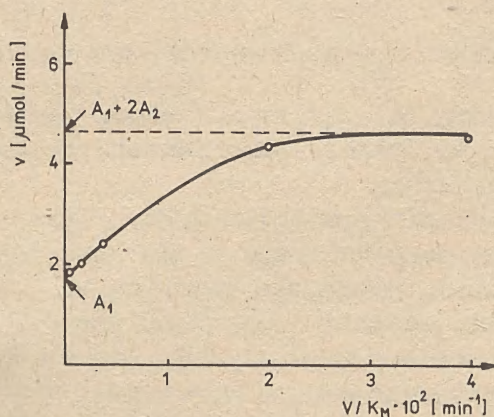
Egzo- β -glukozydazy, ze względu na brak do niedawna jednoznacznej metody określania ich aktywności, są najmniej poznаныmi składnikami kompleksu celulolitycznego.

Oznaczanie aktywności egzo- β -glukozydazy polega na określeniu ilości glukozy uwolnionej przez ten enzym z odpowiedniego substratu, w odpowiednich warunkach, w ciągu określonego czasu.

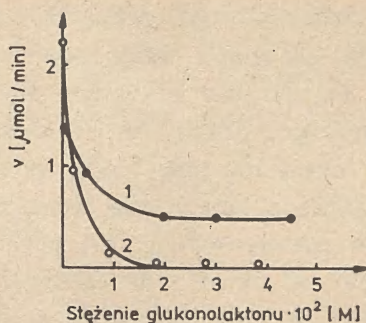
Pierwsza metoda oznaczania aktywności egzo- β -glukozydazy została opracowana przez Reese'a [14] w 1969 r. Jako substrat niezbędny do oznaczania aktywności tego enzymu, wykorzystał on celotetraozę. W metodzie tej nie została uwzględniona specyficzność substratowa enzymów pochodzących z różnych źródeł i możliwość (w pełni prawdopodobnego) udziału endoglukanazy w hydrolizie celotetraozy. Są to, obok wykorzystania kosztownego substratu — celotetraozy, niewątpliwe wady przed-

stawionej metody. Tym niemniej praca Reese'a miała duże znaczenie, wykazała bowiem obecność egzo- β -glukozydazy w wielu kompleksach celulolitycznych różnego pochodzenia.

Dopiero ok. 10 lat później, K l o s o w i in. [5, 6, 7, 13, 15] opracowali trzy metody oznaczania aktywności egzo- β -glukozydazy w kompleksach celulolitycznych, w których w znacznym stopniu wyeliminowali wady występujące w metodzie Reese'a oznaczania aktywności tego enzymu. W charakterze substratu do działania egzo- β -glukozydazy został wykorzystany rozpuszczalny substrat celulozowy — karboksymetyloceluloza lub produkt jej częściowej hydrolizy. W pierwszych dwóch metodach wykorzystuje się fakt tworzenia glukozy z karboksymetylocelulozy pod działaniem dwóch enzymów kompleksu celulolitycznego: egzo- β -glukozydazy i β -glukozydazy. W pierwszej z metod podwyższa się aktywność β -glukozydazy w stosunku do egzo- β -glukozydazy przez dodatek oczyszczonego preparatu β -glukozydazy pochodzącego z innego źródła i ekstrapoluje się liniową zależność szybkości tworzenia glukozy od aktywności β -glukozydazy, do hipotetycznego kompleksu celulolitycznego nie zawierającego β -glukozydazy (rys. 3 i 6). W drugiej metodzie, obniża się selektywnie aktywność β -glukozydazy za pomocą specyficznego inhibitora D-glukono-1,5- δ -laktonu (rys. 7). W trzeciej metodzie oznaczania aktywności egzo- β -glukozydazy wykorzystuje się celodekstryny selektywnie rozkładane przez ten enzym. Zaproponowana przez Klosowa karboksymetyloceluloza i celodekstryny są doskonałymi substratami do szybkich metod oznaczania aktywności egzo- β -glukozydazy.



Rys. 6. Wpływ ilości β -glukozydazy dodanej do kompleksu celulolitycznego, na stacjonarną szybkość uwalniania D-glukozy z karboksymetylocelulozy. Symbole A_1 i A_2 określają odpowiednio aktywności egzo- β -glukozydazy i celobiohydrolazy



Rys. 7. Wpływ stężenia D-glukono-1,5- δ -laktonu dodanego do kompleksu celulolitycznego, na stacjonarną szybkość uwalniania D-glukozy z karboksymetylocelulozy (1) i celobiozy (2)

CZYNNIKI REGULUJĄCE BIOSYNTEZĘ EGZO- β -GLUKOZYDAZY

Regulacja biosyntezy kompleksu enzymów celulolitycznych, prowadzonej przez mikroorganizmy, znajduje się w ostatnim czasie w centrum problematyki biokonwersji celulozy. Poznanie zasady regulacji biosyntezy tych enzymów pozwoli na otrzymanie preparatów celulolitycznych o określonym, żądanym składzie. Spośród składników kompleksu celulolitycznego, najmniej poznany jest problem regulacji biosyntezy egzo- β -glukozydazy.

Szerokie badania dotyczące regulacji biosyntezy egzo- β -glukozydazy przez *A. terreus*, *A. niger* i *T. reesei* prowadzone były przez Okuniewa [17, 18], Galasa [19, 20] i Farkasa [21]. Autorzy wykazali indukujący wpływ celulozy na biosyntezę tego enzymu. Okuniew [17] stwierdził, że biosynteza egzo- β -glukozydazy przez *A. terreus* prowadzona jest tylko w podłożach zawierających celulozę, nie zachodzi zaś w podłożach zawierających łatwo przyswajalne źródła węgla — cukry proste, a także karboksymetylocelulozę. Stwierdził on ponadto, że enzym ten w trakcie hodowli mikroorganizmów jest w pełni wydzielany przez nie do podłoża hodowlanego, a regulacja jego biosyntezy kontrolowana jest poprzez represję kataboliczną oraz indukcję. Spośród wielu poddanych ocenie metylowych pochodnych cukrów, najlepszym induktorem biosyntezy egzo- β -glukozydazy przez *A. terreus* okazał się metylcelobiozyd.

ZAKOŃCZENIE

W związku z ciągłym wzrostem zainteresowania enzymatyczną hydrolizą celulozy do glukozy, rośnie liczba prac dotyczących egzo- β -glukozydazy. Wydzielenie tego enzymu z kompleksu celulolitycznego i otrzy-

manie jego dobrze oczyszczonego preparatu, w znacznym stopniu ułatwiłoby rozwiązanie problemu enzymatycznej hydrolizy celulozy. Enzymu tego jednak do tej pory nie udało się selektywnie wydzielić z kompleksu celulolitycznego, głównie ze względu na brak, do niedawna, jednoznacznej metody określania jego aktywności. Szerokie prace nad tym enzymem prowadzone w Instytucie Biochemii i Fizjologii Mikroorganizmów AN ZSRR zostały uwieńczone opracowaniem metody jego oznaczania, co pozwoliło już obecnie na częściową jego charakterystykę i z pewnością umożliwi w najbliższym czasie pełne poznanie natury tego enzymu.

LITERATURA

1. Cebrat S. — Kosmos 36: 227—245, 1987.
2. *Enzyme nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry.* Academic Press, New York, 1984.
3. Reese E. T., Siu R. G. H., Levinson H. S. — J. Bacteriol. 59: 485-497, 1950.
4. Ryu D. D. Y., Mandels M. — Enzyme Microb. Technol. 2: 91-102, 1980.
5. Klosow A. A., Rabinowicz M. L., Sinicyn A. P., Czuriłowa I. W., Grigorasz S. J., — Bioorg. Chimija 6: 1225-1242, 1980.
6. Klosow A. A., Rabinowicz M. L. — W: *Enzyme engineering — future directions.* Wingard L. B. (red.), New York-London. Plenum Press 5: 83-165, 1980.
7. Skriabin G. H., Gołowlew E. L., Klosow A. A. — *Problemy biokonwersji roślinnego syryja.* Nauka, Moskwa, str. 93-136, 1986.
8. Klosow A. A. — W: *Chimическая энзимология.* Berezin W., Martinek K. (red.), Moskwa, str. 189-250, 1983.
9. Reese E. T. — W: *Recent advances in phytochemistry.* Loewus F. A., Runeckles V. C. (red.), Plenum Publishing Corporation, New York, str. 311-367, 1977.
10. Lee Y. H., Fan L. T. — W: *Advances in biochemical engineering.* Fiechter A. (red.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, str. 101—129, 1980.
11. Wood T. M., Mc Crae S. J. — Biochem. J. 128: 1183-1192, 1972.
12. Halliwell G., Griffin M. — Biochem. J. 135: 587-594, 1973.
13. Sinicyn A. P., Klosow A. A. — Biochimija 46: 202-213, 1981.
14. Reese E. T. — Adv. Chem. Series, Washington 95: 26-33, 1969.
15. Klosow A. A., Grigorasz S. J. — Biochimija 47: 409-418, 1982.
16. Rabinowicz M. L., Martjanow W. A., Czumak G. A., Klosow A. A. — Bioorg. Chimija 8: 396-403, 1982.
17. Okuniew O. N., Swistowa I. D., Zeriebcow N. A., Gołowlew E. L. — Mikrobiol. 52: 39-45, 1983.
18. Okuniew O. N., Swistowa I. D., Zeriebcow N. A., Gołowlew E. L. — Mikrobiol. 52: 202-208, 1983.

19. Galas E., Pyć R., Romanowska I. — Proceeding 4-th European Congress of Biotechnology 1987, Neycel O. M., Van der Meer R. R., Luyb'en K. Ch. M. (red.), Amsterdam, June, 14-19, 2: 274-277, 1987.
20. Galas E. i in. — Sprawozdanie z pracy badawczej wykonanej w ramach CPBP 04.11, Łódź 1987.
21. Farkas V., Kolarova N., Labodova J., Bauer S. — 3rd Symposium of Socialist Countries on Biotechnology 25-29, 04, 1983, Bratislava, str. 527-531, 1983.

EDWARD GALAS

CELINA KUBIK

MARIANNA TURKIEWICZ

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

DROBNOUSTROJOWE ENZYMY PEKTYNOLITYCZNE I ICH ZASTOSOWANIE

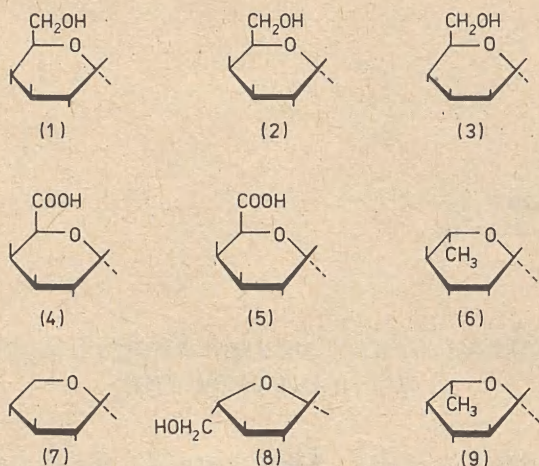
W artykule przedstawiono charakterystykę substancji pektynowych i degradujących je enzymów, omówiono przemysłowe metody produkcji drobnoustrojowych preparatów pektynolitycznych oraz podstawowe możliwości ich zastosowania.

SUBSTANCJE PEKTYNOWE

Substancje pektynowe stanowią grupę strukturalnych roślinnych heteropolisacharydów odpowiedzialnych za utrzymywanie spójności tkanek. Występują głównie w przestrzeni międzykomórkowej (blaszce środkowej) oraz w pierwotnej ścianie komórek roślinnych.

Głównym monosacharydem wchodzącym w skład substancji pektynowych jest kwas D-galakturnowy, którego reszty są w różnym stopniu zestryfikowane metanolem. W znacznie mniejszych ilościach występują w substancjach pektynowych reszty innych cukrów prostych, takich jak glukoza, galaktoza, mannoza, ramnoza, ksyloza, arabinoza, fukoza i kwas glukuronowy (rys. 1) [1]. W skład substancji pektynowych wchodzi więc także polisacharydy, jak poligalakturnonidy o różnym stopniu metoksylacji, ramnogalakturnonidy, arabany, galaktany i arabanogalaktanty. Ich struktura została stosunkowo dobrze poznana.

W poligalakturnonidach reszty kwasu D-galakturnowego są połączone wiązaniami 1,4- α -glikozydowymi w długie łańcuchy o spiralnej strukturze [2]. Wysokomolekularny kwas poligalakturnonowy, w niewielkim tylko stopniu zestryfikowany metanolem (do 10%), jest zwany kwasem pektynowym. Rozpuszcza się on w wodzie tylko w postaci alkalicznych soli, pektynianów [1]. Kwasy poligalakturnonowe o wyższym stopniu metoksylacji są to rozpuszczalne w wodzie pektyny. Pektyny o niskim

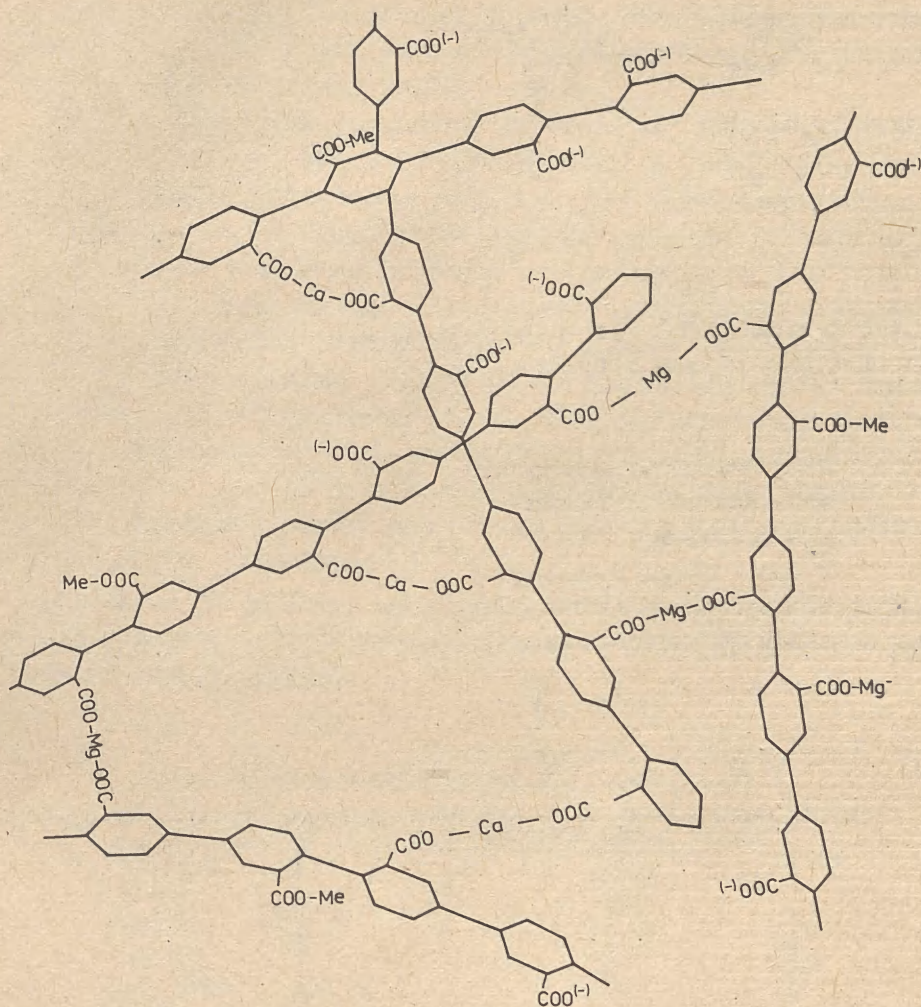


Rys. 1. Monosacharydy wchodzące w skład substancji pektynowych. 1 — D-glukoza, 2 — D-galaktoza, 3 — D-mannoza, 4 — kwas D-glukuronowy, 5 — kwas D-galakturonowy, 6 — L-ramnoza, 7 — D-ksyloza, 8 — L-arabinoza, 9 — L-fukoza [1]

stopniu metoksylacji, zawierające wg Gierschnera [1] poniżej 50% reszt zestryfikowanego metanolem kwasu D-galakturonowego, zwykle 35-40% [2], tworzą z jonami wapnia wypadające z roztworów żele [1, 2]. Cechą charakterystyczną pektyn o wysokim stopniu metoksylacji (ponad 50% [1]) jest zdolność do tworzenia żeli w środowisku kwaśnym i przy dużym stężeniu sacharozy (50-70%), która działając odwadniająco ułatwia asocjację łańcuchów pektyny [2]. Wyróżnia się pektyny wolno zastygające, w których stopień estryfikacji reszt kwasu D-galakturonowego mieści się w granicach 55-65% i pektyny szybko zastygające, zestryfikowane w 70-80% [2].

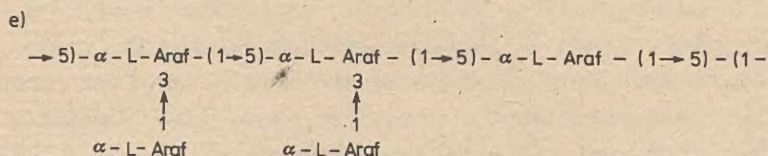
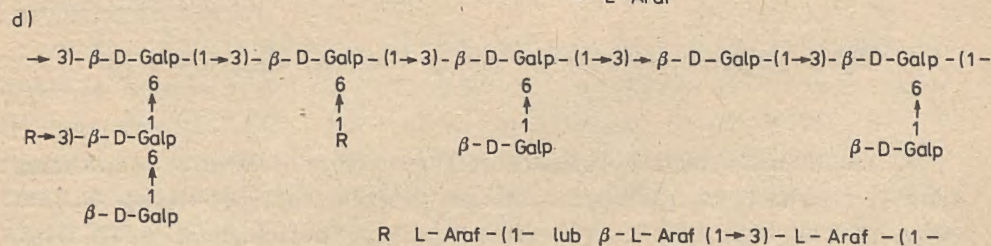
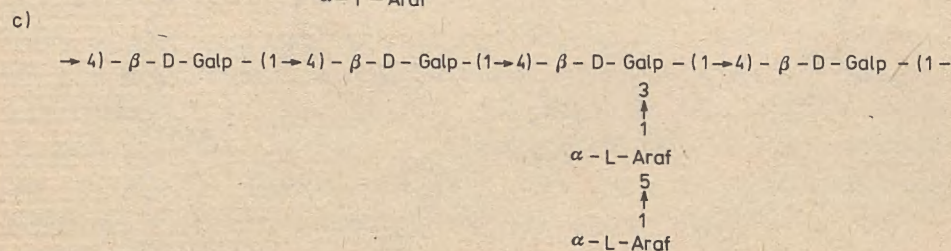
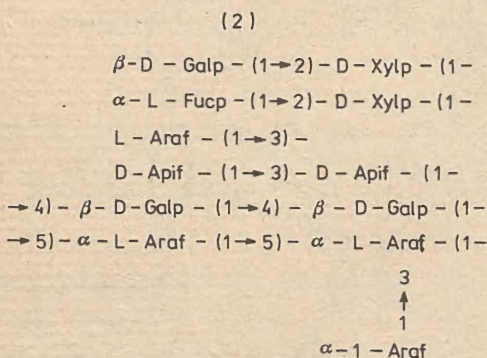
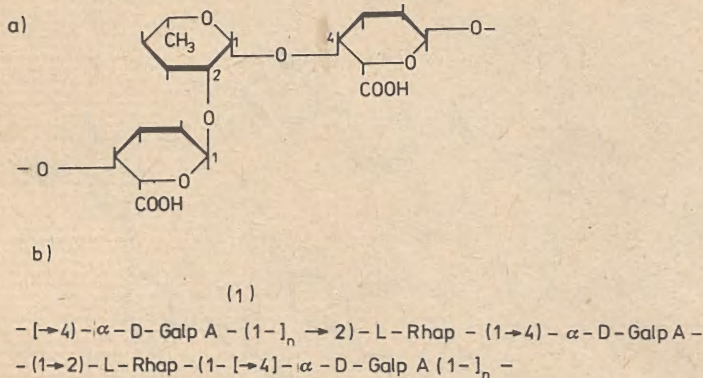
Według Mohra [3], w skład blaszki środkowej komórek roślinnych wchodzi kwas pektynowy o bardzo niskim stopniu estryfikacji, usieciowane jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} (rys. 2), natomiast w pierwotnej ścianie komórkowej występuje nierozpuszczalna protopektyna, zbudowana z pektyn o wyższym stopniu metoksylacji, połączonych z innymi składnikami, wśród których najważniejsze to ramnogalakturonidy, arabanogalaktany I i II oraz arabany.

Ramnogalakturonidy, wchodzące w skład protopektyny, są zbudowane z jednostek kwasu D-galakturonowego połączonych wiązaniami 1,4- α w łańcuchy, w które są wplecione w sposób przypadkowy reszty ramnozy połączonej wiązaniami 1,2- α i 1,4- α (rys. 3a) [1]. Związki te zawierają łańcuchy boczne o różnej długości i składzie (rys. 3b) [4].



Rys. 2. Model struktury pektyny blaszki środkowej, wg Mohra [3]

W arabanogalakthanach I jednostki D-galaktozy połączone wiązaniami 1,4- β tworzą łańcuch główny, z którym wiązaniami 1,3- α łączą się łańcuchy boczne zbudowane z reszt arabinozy, połączonych wiązaniami 1,5- α (ryc. 3c). Polisacharydy te są związkami o charakterze obojętnym. Arabanogalakthany II zawierają w głównym łańcuchu reszty D-galaktozy, połączone wiązaniami 1,3- β , w krótkich łańcuchach bocznych zaś reszty L-arabinozy połączone między sobą wiązaniami 1,3- β i poprzez reszty D-galaktozy związane z łańcuchem głównym wiązaniami 1,6- β (rys. 3d).



W arabanach reszty L-arabinozy są w łańcuchu głównym połączone wiązaniami 1,5- α , zaś w odgałęzieniach zawierających pojedyncze reszty tego cukru, wiązaniami 1,3- α (rys. 3e).

Uważa się, że nierozpuszczalność protopektyny tkanek roślinnych wynika nie tylko z jej wysokiego powinowactwa do jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , sieciujących sąsiadujące łańcuchy pektyn, ale jest również spowodowana występowaniem wiązań wodorowych pomiędzy grupami karboksylowymi reszt kwasów uronowych a grupami hydroksylowymi reszt cukrowych celulozy i hemicelulozy oraz resztami hydroksyaminooacylowymi białek ściany komórkowej. Wpływają na nią ponadto liczne oddziaływania van der Waalsa między protopektyną i innymi składnikami ściany komórkowej oraz oddziaływania między obojętnymi resztami monosacharydów łańcuchów bocznych protopektyny i resztami aminoacylowymi białek ściany komórkowej [5]. Nierozpuszczalność protopektyny wynika też z fizycznego przeplecenia jej składników z innymi polimerami pierwotnej ściany komórkowej [2].

Stwierdzono, że podczas dojrzewania owoców i niektórych warzyw następuje częściowe przekształcenie się nierozpuszczalnej protopektyny w rozpuszczalną pektynę [2].

Tabela 1

Zawartość pektyn w niektórych owocach i warzywach [2]

Surowiec	Zawartość pektyn, % s.m.
Winogrono	0,2-1,0
Jabłko	0,5-1,6
Grejpfrut	1,6-4,5
Cytryna,	3,0-4,0
— miąższ	25
Rzepa	10
Burak cukrowy, miąższ	30

Synteza substancji pektynowych w roślinach zachodzi we wczesnych stadiach wzrostu, podczas zwiększania powierzchni ściany komórkowej [6]. Zawartość pektyn w niektórych owocach i warzywach przedstawiono w tabeli 1 [2].

Rys. 3. Schematy struktury substancji pektynowych pierwotnej ściany komórkowej roślin [4]: a — połączenie reszt ramnozy, występujących w łańcuchu głównym ramnogalakturonidu, b — struktura głównego (1) i bocznego (2) łańcuchów ramnogalakturonidu, c — struktura arabanoglikanów I, d — struktura arabanoglikanów II, e — struktura arabanów

Cechują się one, zależnie od pochodzenia, różnym stopniem metoksy-lacji i polimeryzacji, który jest jedną z ich charakterystycznych właści-wości. Masa cząsteczkowa pektyn waha się od 20 do 360 kDa i jest za-leżna od metody ich wyodrębniania [7-9]. Aby otrzymać charaktery-styczną dla danego materiału roślinnego pektynę, należy ją ekstrahować w łagodnych warunkach, gdyż w zależności od pH, temperatury i czasu ekstrakcji, z tego samego materiału można otrzymać pektyny różniące się nie tylko masą cząsteczkową, ale również ilością łańcuchów bocznych oraz grup metoksylowych [7].

Pektyny rozpuszczają się w wodzie dając lepkie roztwory, a ich roz-puszczalność jest tym większa im wyższy stopień estryfikacji lub niższy stopień polimeryzacji [10]. Wspomniana poprzednio zdolność żelowania pektyn w odpowiednich warunkach jest od dawna wykorzystywana przy produkcji dżemów i deserów. Jest ona tym większa, im większa masa cząsteczkowa pektyny. Pektyny poddawane hydrolizie kwasowej w nis-kiej temperaturze tracą nieuronowe cukry oraz ulegają demetoksy-lacji [11], co wykorzystuje się przy otrzymywaniu niskometoksylo-wanych pektyn i całkowicie zdemetoksylowanego kwasu poligalak-turonowego, zwanego również kwasem pektowym. Podczas działania na pektyny rozcieńczonymi zasadami, w niskiej temperaturze następuje hydrolitycz-ne odszczepienie grup metoksylo-wych, w wyższej zaś depolimeryzacja łańcucha [11, 12].

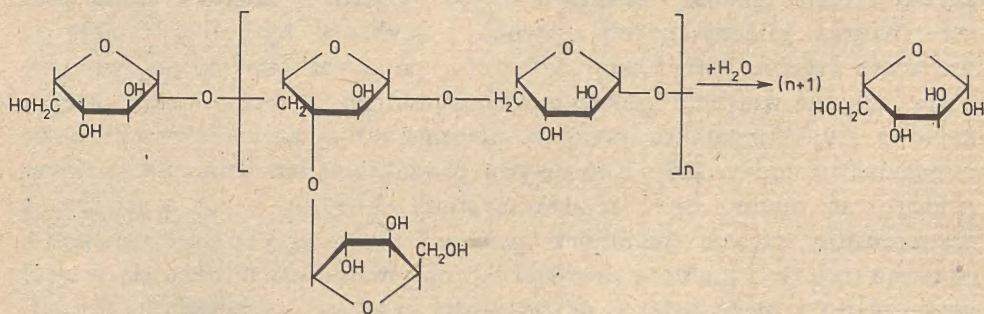
ENZYMY PEKTYNOLITYCZNE — KLASYFIKACJA, CHARAKTERYSTYKA, WYSTĘPOWANIE

Enzymy degradujące substancje pektynowe są wytwarzane przez roś-liny i wiele mikroorganizmów. Należą do nich enzymy deestryfikują-ce i depolimeryzujące. W klasyfikacji enzymów depolimeryzujących uwzględniono mechanizm ich działania (hydrolityczny lub transeliminacy-jny), rodzaj degradowanego substratu (pektyna lub kwas pektowy) oraz pozycję (endo lub egzo) rozszczepianego wiązania glikozydowego w łańcuchu.

Nie wszystkie dotąd opisane w literaturze enzymy pektynolityczne uwzględniono w klasyfikacji, przede wszystkim ze względu na niepełną ich charakterystykę. Sklasyfikowano następujące enzymy [13]: pektyno-esterazę (EC 3.1.1.11), poligalak-turonazę (EC 3.2.1.15), egzopoligalak-turonazę (EC 3.2.1.67), egzopoli- α -D-galak-turonozydazę (EC 3.2.1.82), liazę pektatową (EC 4.2.2.2), liazę pektynową (EC 4.2.2.10), liazę egzopoliga-lakturonianową (EC 4.2.2.9) i liazę oligogalak-turonidową (EC 4.2.2.26). Można się spodziewać, że wkrótce zostaną sklasyfikowane dalsze enzy-my pektynolityczne, takie jak polimetylogalak-turonaza (PMG) opisana

m.in. przez Batemana [14] i Rexową-Benkową [15], egzopolimetylogalakturnaza, egzoliaza pektynianowa i oligogalakturnaza, której dwa typy wyizolowali z *Bacillus* sp. Nagel i Hasegawa [16, 17]. Jeden z nich hydrolizuje nienasycone [16], drugi zaś nasycone [17] oligogalakturnidy. Obydwa są enzymami wewnątrzkomórkowymi.

Według Whitakera [4] do enzymów związanych z degradacją substancji pektynowych należy też zaliczyć arabanazy, m.in. α -L-arabinofuranozydazę (EC 3.2.1.55), katalizującą terminalne rozszczepienie arabanu. Enzym ten preferuje hydrolizę wiązań bocznych 1,3- α , a w dalszej kolejności wiązań 1,5- α głównego łańcucha arabanu (rys. 4). Jego obecność w preparatach pektynolitycznych stosowanych do klarowania soków owocowych jest niekorzystna, ponieważ dobrze rozpuszczalny w sokach wyjściowy araban przechodzi w wyniku hydrolizy wiązań 1,3- α w słabo rozpuszczalny i wolnohydrolizujący 1,5- α -araban, tworzący trudne do usunięcia zmetnienia.



Rys. 4. Hydroliza arabanów przez α -L-arabinofuranozydazę, wg Whitakera [4]

Pektynoesterazy (PE), hydrolizujące wiązania estrowe w pektynie z uwolnieniem alkoholu metylowego, występują u wielu roślin i drobnoustrojów. Szczególnie wysoką aktywność wykazują pektynoesterazy owoców cytrusowych i pomidorów [18]. Są one wytwarzane również przez niektóre bakterie, m.in. rodzaju *Xantomonas* i *Clostridium* oraz liczne grzyby mikroskopowe rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i innych (tab. 2). Pektynoesterazy wykazują wysoką specyficzność względem zmetoksyloowanych reszt kwasu galakturonowego w pektynie, potrafią również hydrolizować, chociaż o wiele wolniej, i inne wiązania estrowe, np. utworzone z udziałem alkoholu etylowego, propylowego i alilowego [19]. Pektynoesterazy roślinne atakują cząsteczkę pektyny od redukującego końca, albo też obok wolnej grupy karboksylowej [20] i dalej działają wzdłuż łańcucha, dając obszary poligalakturnidu łatwo tworzące sole wapniowe [21]. Podobnie działa enzym z *Fusarium oxysporum* [22], natomiast pektynoesteraza z *Clostridium multifementans* atakuje pektynę

tylko od redukującego końca łańcucha [23]. Pektynoesterazy roślin cechują się optymalnym pH działania w zakresie 6-9 [18], grzybów — 3,5-7,0, bakterii — 7,0-9,0 [22, 24]. Enzymy wytwarzane przez grzyby są zwykle bardziej termostabilne od bakteryjnych [22, 24]. Stosunkowo dobrze zostały zbadane pektynoesterazy owoców cytrusowych, które destryfikując pektynę mogą powodować wytrącanie się pektatów lub pektynianów wapnia. Jest to zjawisko korzystne przy produkcji klarownych soków cytrusowych, a niepożądane przy otrzymywaniu soków o trwałych zmętnieniach [18]. Natywne pektynoesterazy owoców cytrusowych należy inaktywować, gdy owoce te wykorzystuje się do produkcji pektyn. Zapobiega to otrzymywaniu niskozmetoksyloowanych produktów.

Endopoligalakturonazy (endo-PG), zwane potocznie poligalakturonazami, hydrolizują wewnętrzne wiązania 1,4- α w kwasie pektowym w sposób nieuporządkowany, wytwarzając oligogalakturonidy. Powodują szybki spadek lepkości substratu dzięki hydrolizie zaledwie kilku procent wiązań glikozydowych. Stopień i szybkość hydrolizy maleje ze wzrostem stopnia estryfikacji substratu, ponieważ enzymy te rozszczepiają jedynie wiązania glikozydowe sąsiadujące z wolną grupą karboksylową [22]. Poligalakturonazy są znacznie mniej aktywne w hydrolizie oligogalakturonidów [25]. Końcowymi produktami ich działania na kwas pektowy są mono-, di- i trigalakturonidy. Enzymy te są wytwarzane przez rośliny wyższe (pomidory, grusze i inne), grzyby mikroskopowe, bakterie (tab. 2) i niektóre drożdże. Ich optymalne pH mieście się w granicach 4-5,5 i może zależeć od wielkości cząsteczki substratu, np. poligalakturonaza z drożdży w hydrolizie kwasu pektowego wykazywała optymalne pH 4,4, zaś w hydrolizie kwasu tetragalakturonowego — 3,4 [26]. Niektóre z tych enzymów wykazują znaczną termostabilność, np. poligalakturonaza z *Asp. niger* zachowywała ok. 30% aktywności po 30 min. inkubacji w 80°C w pH 6,0 [27]. Większość scharakteryzowanych endopoligalakturonaz to enzymy o średniej masie cząsteczkowej w zakresie 30-40 kDa [2].

Sklasyfikowane dwie egzopoligalakturonazy różnią się mechanizmem działania: jedna z nich (EC 3.2.1.67, egzo-PG) uwalnia od nieredukującego końca kwasu pektowego kolejne reszty kwasu D-galakturonowego, druga (EC 3.2.1.82, egzo-PG-2) odszczepia od nieredukującego końca digalakturonidy. Znalezione je w roślinach wyższych, pleśniach i bakteriach [18]. Enzymy te wykazują podobne jak endopoligalakturonazy optymalne pH w zakresie 4,0-6,0 [28, 29].

Liazy pektynowe (PMGL) rozszczepiają na drodze transeliminacji wewnętrzne wiązania 1,4- α -glikozydowe w pektynie, nie działają natomiast na kwas pektowy. Wytwarzają je prawie wyłącznie pleśnie [30, 31].

Tabela 2

Mikroorganizmy, produkujące enzymy pektynolityczne [2]

Producent	Enzym						
	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG	OGL
<i>Bacillus</i> sp			+			+	
<i>B. sp</i> Rk9			+				
<i>B. subtilis</i>			+				
<i>B. polymyxa</i>			+				
<i>B. pumilus</i>			+				
<i>B. sphaericus</i>			+				
<i>B. stearothermophilus</i>			+				
<i>Erwinia aroideae</i>		+	+				+
<i>E. carotovora</i>		+	+				+
<i>Pseudomonas</i> sp			+				+
<i>P. fluorescens</i>			+				
<i>P. marginalis</i>	+	+	+				
<i>Xanthomonas</i> sp	+		+				
<i>X. campestris</i>	+		+				
<i>X. cyanopsidis</i>			+				
<i>Clostridium multifementans</i>	+		+				
<i>C. aurantibutyricum</i>	+		+				
<i>C. felsineum</i>		+	+				
<i>Cytophaga johnsonii</i>			+				
<i>C. deprimata</i>			+				
<i>C. albogilva</i>			+				
<i>Streptomyces nitrosporeus</i>			+				
<i>Trichoderma koningii</i>		+					
<i>T. pseudokoningii</i>		+					
<i>Cercospora arachidicola</i>		+					
<i>Cephalosporium</i> sp			+				
<i>Aspergillus niger</i>	+	+		+	+		
<i>A. sojae</i>				+			
<i>A. saito</i>		+					
<i>Fusarium culmorum</i>			+				
<i>F. oxysporum</i>			+				
<i>F. solani</i>			+		+		
<i>Penicillium expansum</i>		+					
<i>P. italicum</i>					+		
<i>P. digitatum</i>	+			+	+		
<i>P. chrysogenum</i>	+	+					
<i>Rhizoctonia fragariae</i>		+					
<i>Rh. solani</i>	+	+					
<i>Rhizopus arrhizus</i>		+					

Najlepszymi substratami dla tych enzymów są wysokoestryfikowane pektyny, ulegające depolimeryzacji w miejscach sąsiadujących z grupami metoksyłowymi [18]. Optymalne pH liaz pektynowych leży w zakresie 5-8,5. Ich powinowactwo do substratów wzrasta ze wzrostem stopnia estryfikacji w pH 5-6, zaś spada ze zmniejszeniem się długości

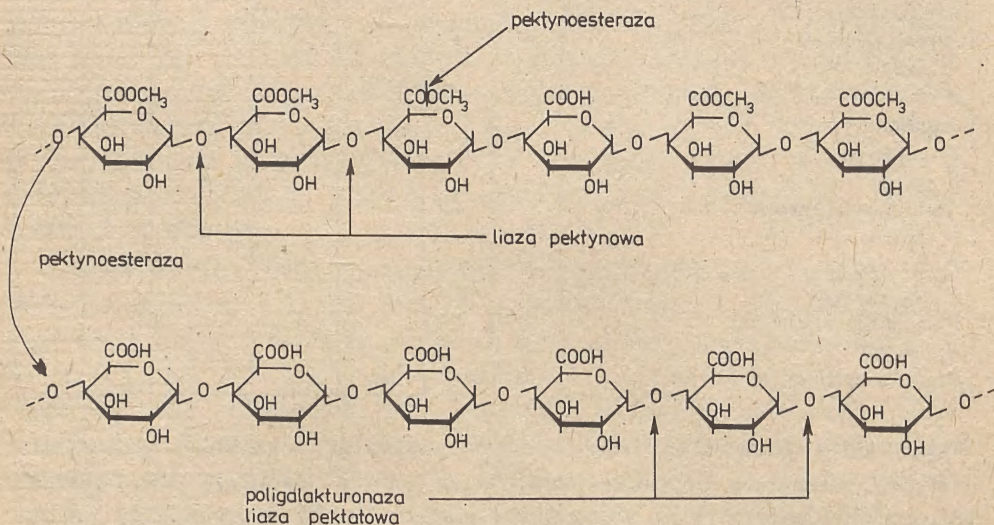
łańcucha. Przy niższych wartościach pH liazы pektynowe wykazują wzrost powinowactwa do pektyn o niskim stopniu metoksylacji [32].

Liazy pektatowe (PGL) rozszczepiają wewnętrzne wiązania glikozydowe w kwasie poligalakturonowym, lecz nie działają na pektyny. Są one wytwarzane przez rośliny wyższe, grzyby, a przede wszystkim bakterie (tab. 2). Ich optymalne pH jest zasadowe i leży w zakresie 8-10 [33, 34]. Wymagają obecności jonów wapnia w środowisku [33], które przypuszczalnie stabilizują natywną konformację cząsteczki enzymu, na co wskazywać może np. podwyższona termostabilność enzymu z *B. pumilus* [35] w ich obecności. Przypuszcza się, że substratem odpowiednim dla tych enzymów są długie łańcuchy poligalakturonidów połączonych mostkami wapniowymi [36].

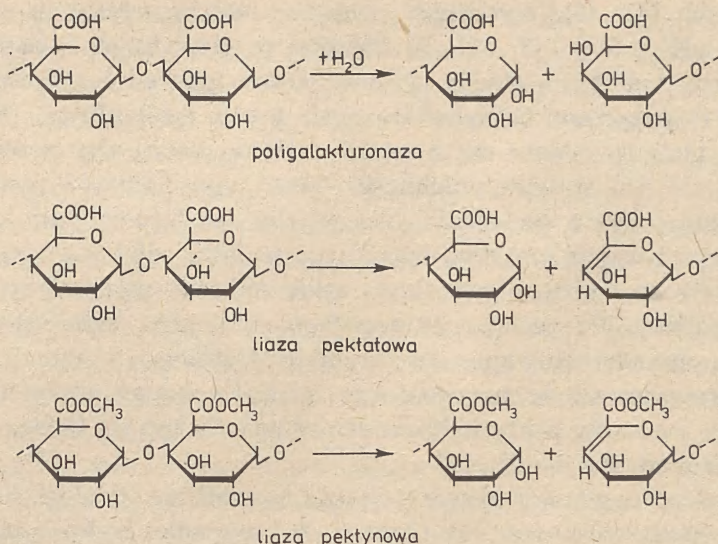
Liazy egzopoligalakturonianowe (egzo-PGL) odszczepiają na drodze transeliminacji nienasycone dimery od redukującego końca kwasu poligalakturonowego. Wykazują wysokie optymalne pH działania (8-9,5) i są aktywowane przez jony wapniowe [37-40]. Dobrymi producentami tych enzymów są *Erwinia dissolvens*, *Streptomyces* oraz *Fusarium*.

Liazy oligogalakturonidowe (OGL) uwalniają nienasycone końcowe reszty kwasu D-galakturonowego z oligogalakturonidów i wolniej z kwasu pektowego. Ich substraty mogą mieć nasycony i nienasycony charakter. Enzymy te są wytwarzane przez wiele mikroorganizmów, w tym *Erwinia* i *Pseudomonas* [41, 42].

Na rysunku 5 przedstawiono sposób działania głównych enzymów pektynolitycznych na cząsteczkę pektyny i kwasu pektowego, na rys. 6 — hydrolityczny i transeliminacyjny rozkład substancji pektynowych.



Rys. 5. Schemat działania enzymów pektynolitycznych na cząsteczkę pektyny i kwasu pektowego, wg Pilnika i Rombouts [18]



Rys. 6. Hydrolityczny i transesteracyjny rozkład substancji pektynowych, wg Pilnika i Rombouts [18]

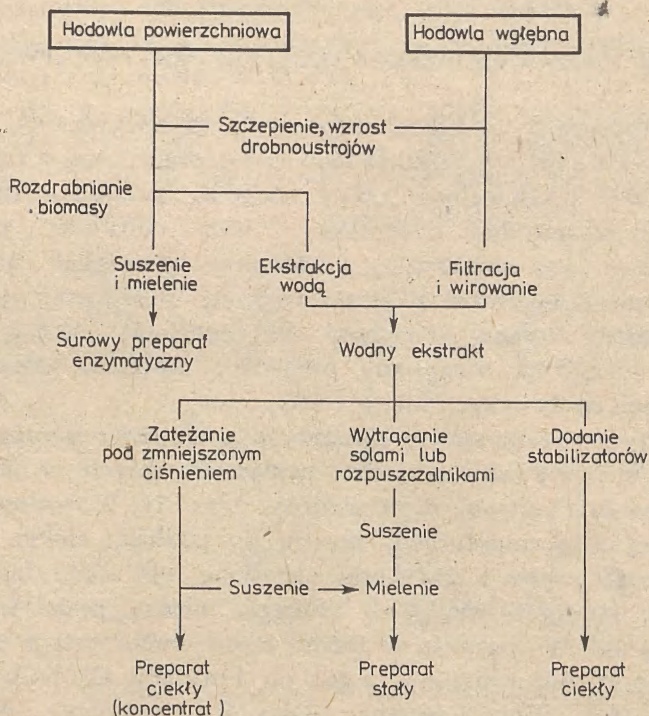
PRZEMYSŁOWA PRODUKCJA ENZYMÓW PEKTYNOLITYCZNYCH

W przemysłowej produkcji enzymów pektynolitycznych wykorzystywane są głównie grzyby mikroskopowe, w szczególności z rodzaju *Aspergillus* [43-45], produkujące pozakomórkowo kompleks enzymatyczny, obejmujący różnorodne hydrolazy i liazy substancji pektynowych. W kompleksie tym najbardziej pożądanymi ze względu na praktyczne wykorzystanie preparatów pektynolitycznych są enzymy depolimeryzujące, natomiast wysoka aktywność pektynoesterazy jest zwykle niekorzystna z uwagi na uwalniany przez nią metanol, którego obecność w produktach spożywczych nie jest wskazana.

W praktyce przemysłowej wykorzystuje się dwie zasadniczo różniące się metody otrzymywania enzymów pektynolitycznych: w hodowli wgłębnej lub powierzchniowej drobnoustroju (rys. 7). W **hodowli wgłębnej**, prowadzonej w fermentorach, stosuje się podłoża ciekłe, zawierające ustalone źródła węgla i azotu oraz określone sole mineralne. Najczęściej używanymi źródłami węgla są: glukoza, melasa, mąka kukurydziana, otręby pszenne. W charakterze źródeł azotu wykorzystuje się sole amonowe, ekstrakt kukurydziany, pogon po destylacji alkoholu lub ekstrakt drożdżowy [46]. Stymulatorami biosyntezy enzymów pektynolitycznych są wprowadzane do podłoża surowce o wysokiej zawartości pektyn, takie jak wysłodki buraczane, wyciągi jabłkowe, skórki owoców

cytrusowych [47, 48]. Wydajność pektynaz jest najwyższa w hodowlach o niskim pH (3,5-4) [43, 49]. W **hodowli powierzchniowej** zasadniczym składnikiem podłoża są otręby pszenne obok odpowiedniego źródła azotu, induktorów enzymów pektynolitycznych i soli mineralnych. Wszystkie składniki podłoża miesza się z wodą w takiej ilości, aby pozostało ono wilgotne, ale nie straciło pulchności. Tego typu hodowle prowadzi się albo w komorach z umieszczonymi w nich perforowanymi kuwetami, wypełnionymi cienką warstwą wilgotnego podłoża, albo też w poziomach, obracających się bębnach o średnicy kilku metrów, wypełnionych podłożem do połowy. Po zaszczepieniu podłoża zawieszają zarodników, urządzenia są przedmuchiwane sterylnym powietrzem, a proces wzrostu grzyba prowadzi się w temperaturze 30-32°C. Odpowiednią wydajność biosyntezy enzymów pektynolitycznych osiąga się zwykle w ciągu 3-7 dób wzrostu drobnoustrojów.

Po hodowli węgłnej enzymy obecne w podłożu oddziela się od biomasy na drodze wirowania lub filtracji. W przypadku hodowli powierzchniowej ekstrahuje się je wodą z dodatkiem odpowiednich stabilizatorów, stosując ekstrakcję w przeciwnie, ewentualnie biomase wraz z pod-



Rys. 7. Ogólny schemat technologiczny przemysłowej produkcji enzymów pektynolitycznych, wg Kilara [46]

łożem suszy się w odpowiednich warunkach i stosuje jako surowy preparat enzymatyczny. Oddzieloną od biomasy ciecz pochodzącą lub ekstrakt wodny z grzybni zateża się w urządzeniach wyparnych i po dodaniu stabilizatorów przechowuje w postaci koncentratu, bądź też otrzymuje się z nich preparaty enzymatyczne w postaci stałej, stosując wysalanie siarczanem amonowym, sodowym czy chlorkiem sodowym lub wytrącanie takimi rozpuszczalnikami organicznymi jak izopropanol, aceton, etanol, metanol. Wytrącone osady białek enzymatycznych suszy się w niskiej temperaturze i przy obniżonym ciśnieniu, stosuje się też suszenie rozpyłowe. Suchy preparat po rozdrobnieniu jest łączony w celu standaryzacji aktywności pektynolitycznej z odpowiednimi wypełniaczami. Stosuje się tu zwykle żelatynę, kazeinę, glukozę, sacharozę, laktozę, skrobię, mąkę.

W tabeli 3 zestawiono najważniejsze handlowe preparaty enzymów pektynolitycznych. Należy zaznaczyć, że wszystkie te preparaty zawierają domieszki innych enzymów. Najczęściej są to celulazy, amylazy, hemicelulazy, proteazy, arabanazy i galaktanazy. Rynek enzymów pektynolitycznych jest stosunkowo mały, ale bardzo konkurencyjny, a ich produkcja wzrasta. W USA w 1982 r. wartość wszystkich produkowanych preparatów enzymatycznych wynosiła ok. 57,7 mln dolarów, w tym preparatów pektynolitycznych — 2,2 mln [46].

Tabela 3

Handlowe preparaty enzymów pektynolitycznych

Nazwa preparatu	Pochodzenie
Clarizyme	Francja
Igrazyme M-10	Szwajcaria
Clerzyme	USA
MRS-Pectinase	RFN
Panzym super	RFN
Pectinex	Szwajcaria
Pektinol B ₁	RFN
Pectolyase	Japonia
Pectolase	Dania
Rochament P	RFN
Sparck-1	USA
Ultrazyme-100	Szwajcaria
Ultrazyme SE 604	Szwajcaria
Biozym P	RFN
Pektinol 41-P i D	USA
Mazerase PG-237	Węgry
Effectase	Jugosławia
Pectawamolin P 10	ZSRR
Pectafotidin	ZSRR
Pectinaza	Bułgaria
Pektopol P i PT	Polska

W Polsce preparaty pektynolityczne o handlowej nazwie Pektopol są wytwarzane w ZPOW „Pektowin” w Jasle, począwszy od końca lat sześćdziesiątych. Trzeba podkreślić, że była to pierwsza uruchomiona na skalę przemysłową produkcja enzymów w naszym kraju. Roczna produkcja Pektopolu przekracza 250 ton, jednakże ilość ta nie zaspokaja potrzeb rynku krajowego i musi być uzupełniana importem.

Od dawna wiadomo, że poważnym źródłem enzymów pektynolitycznych może być przemysł kwasu cytrynowego. Szczepy *A. niger* nagromadzają znaczne ilości tych enzymów podczas fermentacji cytrynowej w hodowlach powierzchniowych na pożywce melasowej [50-53]. Badania naszego zespołu [54] wykazały, że aktywność enzymów pektynolitycznych syntetyzowanych przez *A. niger* podczas fermentacji cytrynowej w krajowych wytwórniach jest wysoka, a skład kompleksu pektynolitycznego korzystny (małe ilości pektynoesterazy). Chociaż w końcu fermentacji przeważająca ilość enzymów pektynolitycznych (ok. 80-90%) znajduje się w brzeczce fermentacyjnej, jednakże też grzybnia *A. niger* stanowi liczące się ich źródło. Prowadzono wiele prac mających na celu opracowanie metod wyodrębniania tych enzymów z brzeczki, obok kwasu cytrynowego [51-53, 56, 57], jak również z odpadowej grzybni [50, 55]. W opracowywaniu metod otrzymywania preparatów pektynolitycznych z surowców po fermentacji cytrynowej duże nadzieje należy wiązać z wykorzystaniem procesu ultrafiltracji [56], który przy dostępności właściwych membran, mógłby być prostą i taną metodą rozdzielenia enzymów i kwasu cytrynowego w brzeczce oraz zateżniania i oczyszczania ekstraktów enzymatycznych z grzybni.

ZASTOSOWANIE ENZYMÓW PEKTYNOLITYCZNYCH

Preparaty pektynolityczne znajdują zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym, przede wszystkim owocowo-warzywnym przy produkcji różnorodnych przetworów, jak również w przemyśle winiarskim.

Przy traktowaniu zmiążdżonych owoców i warzyw preparatami enzymów. dąży się do częściowego lub nawet całkowitego rozplynnienia surowców stosowanych w produkcji pulp i nektarów, zwiększenia wydajności soku i właściwej ekstrakcji substancji barwnych i zapachowych; natomiast w produkcji soków zastosowanie preparatów enzymów o odpowiednim składzie powinno prowadzić do zmniejszenia lepkości soków przed ich zateżnianiem, ułatwiać ich klarowanie, filtrację i stabilizację. Gdy celem technologii jest rozplynnienie surowca, jak np. przy produkcji puree dla dzieci oraz nektarów i soków ze stabilnym zmętnieniem, stosowane preparaty powinny mieć własności macerujące, tj. zawierać obok enzymów pektynolitycznych określone ilości celulaz i he-

micelulaz. Preparaty takie określa się często mianem maceraz. Podczas przygotowywania zateżonych nektarów traktowanie surowca macerazą musi być ściśle kontrolowane, aby depektynizacja nie była zbyt głęboka [58] i nie przyczyniała się do spadku stabilności zmetnienia.

Ostatnio preparaty pektynolityczne stosuje się coraz szerzej w przemysłowym wyodrębnianiu soku i substancji aromatycznych z owoców cytrusowych. W procesie tym po termomechanicznym rozdrobnieniu surowca prowadzi się jego obróbkę enzymatyczną [59]. W produkcji soków są wykorzystywane nie tylko handlowe preparaty pektynolityczne pochodzenia pleśniowego, lecz również natywne enzymy występujące w roślinach, czego przykładem może być zastosowanie enzymów pomidora w otrzymywaniu soków marchwiowych i buraczanych [60].

Najstarszym i największym odbiorcą handlowych preparatów pektynolitycznych są producenci klarownych soków owocowych. Badania nad klarowaniem soków jabłkowych z udziałem różnych enzymów pektynolitycznych nie dały odpowiedzi, które z nich odgrywają najistotniejszą rolę w tym procesie [61, 62]. Neubeck [63] i Yamashi [64] uzyskiwali dobre efekty klarując sok jabłkowy mieszaniną poligalakturonazy i pektynoesterazy, zaś Ishii [65] osiągnął podobne wyniki stosując oczyszczoną liazę pektyny. Wykazał on również [65], że przy depektynizacji soku jabłkowego w pH 3,5 z udziałem poligalakturonazy i pektynoesterazy flokulacja zmetnień następowała w momencie, gdy ok. 30% wiązań estrowych i tylko 5% glikozydowych pektyny uległo hydrolizie. Analiza składników zmetnień wykazała, że są to kompleksy białkowo-węglowodanowe, w których pod powierzchnią ujemnie naładowanych białek, pektyn i innych węglowodanów znajdują się dodatnio naładowane białka. Częściowa hydroliza tej ujemnie naładowanej powłoki powoduje odkrycie dodatnio naładowanych powierzchni, dzięki czemu następuje przyciąganie cząsteczek i kląskowanie.

Według badań Drzazgi i Mitek [66], w wyniku depektynizacji soków jabłkowych preparatami Pektopol P i PT, w ciągu 4 godzin procesu następuje częściowa deestryfikacja pektyn i ich degradacja do cząsteczek o masie ok. 35 kDa, które nie wykazują zdolności żelowania podczas otrzymywania koncentratów soków.

Szybkość procesu klarowania zależy od pH, temperatury, stężenia enzymu i czasu jego działania. Niektóre preparaty enzymatyczne zawierają domieszkę 0,005-0,01% żelatyny, która, z jednej strony tworzy kompleksy żelatynowo-taninowe pomocne przy klarowaniu, z drugiej zaś, usuwa inhibitor pektynaz — taninę [67].

Soki, szczególnie jabłkowe, wytwarzane na początku sezonu, zawierają znaczne ilości skrobi, stąd w ich klarowaniu stosuje się preparaty zawierające α -amylazę o niskim optymalnym pH. Jędrzychowska

i in. [68] najlepszy efekt klarowania uzyskiwali stosując preparat Pektopol PA, zawierający kompleks enzymów pektynolitycznych i amylolitycznych. W usuwaniu pektyn z soków można wykorzystywać też wyłącznie pektynoesterazę, a powstający kwas pektowy wytrącać w formie nierozpuszczalnych pektatów. Klarowanie można też prowadzić dodając do soku kwas pektowy z jonami wapnia. Obserwuje się wówczas współtrącanie pektatu wapnia wraz z innymi cząsteczkami [58].

Duże ilości preparatów pektynolitycznych zużywa przemysł winiarski podczas produkcji win zarówno gronowych, jak i owocowych z jabłek, gruszek i owoców jagodowych. Użycie tych preparatów jest korzystne, zwłaszcza przy produkcji win czerwonych fermentujących na miazdze [69, 70]. Ujemną stroną stosowania preparatów pektynolitycznych w winiarstwie jest wzrost zawartości metanolu w winach [71].

Enzymy pektynolityczne mogą być również wykorzystywane poza przemysłem spożywczym, np. w procesach konserwacji drewna i w maceracji łądy lnu. W pierwszym przypadku chodzi o usunięcie substancji pektynowych w celu zwiększenia przepuszczalności włókna drzewnego [72], co ułatwia wchłanianie konserwantów. Uważa się, że proces ten powinno się prowadzić zanurzając materiał drzewny w specjalnych zbiornikach w kąpeli wodnej, szczepionej bakteriami o uzdolnieniach pektynolitycznych [73].

Do obróbki łądy lnianych powinno stosować się według Łobanoka i in. [74] preparaty pektynolityczne o niewielkiej aktywności celulolitycznej, co pozwala otrzymać włókno o wysokiej wytrzymałości. Preparaty o odpowiednim dla przemysłu lniarskiego składzie otrzymywano z *Penicillium digitatum* 24, *Aspergillus carbonarius* 77 i *Aspergillus alliaceus* 497. Opisywano również [75] proces maceracji słomy lnianej w kąpielach szczepionych *Clostridium felsineum*.

LITERATURA

1. Gierschner K. — Gordian 7: 171, 1981.
2. Fogarty W. M. — Pectic enzymes, s. 111, w: Microb. Enz. Biotechn., Dep. Ind. Microb. Univ. College, Dublin, Ireland, Appl. Sci. Publ., London, N.I, 1983.
3. Mohr H., Schopfer P. — Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1978.
4. Whitaker J. R. — Enzyme Microb. Technol. 6: 341, 1984.
5. Barthley I. M. — Phytochemistry 13: 407, 1974.
6. Northcote D. H. — Symp. Soc. Exp. Biol. 17: 157, 1963.
7. Ducloux H., Stutz E. — Adv. Enzymol. 20: 341, 1958.
8. Porwal S., Chakravarti B. P. — Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 5: 327, 1970.
9. Newbold R. P., Joslyn M. A. — J. Assoc. Offic. Agric. Chem. 35: 872, 1952.

10. Garczewa I. M. — *Technol. ferm. prep.*, Piszcz. Promyszl., Moskwa, 1975.
11. Doesbura J. J. — *Pectic Subst. in Fresh and Preserved Fruits and Veg.*, I.B.V.T. Comunic., 25, Wagenigen, Netherlands, 1965.
12. O'Colla P. S., O'Donnel J. J., Freley J. M. D. — *Proc. Chem. Soc.* 68, 1962.
13. *Enzyme Nomenclature*, Recomend. Nomencl. Commit. Int. Union Bioch. (Publ. Int. Union Bioch. Acad. Press, Inc.) 1984.
14. Bateman D. F., Millar R. Z. — *Ann. Rev. Phytopatology* 4: 119, 1966.
15. Rexová-Benková L., Slezárik A. — *Coll. Czechosl. Chem. Comm.* 31: 122, 1966.
16. Nagel C., Hasegawa S. — *J. Food Sci.* 33: 378, 1968.
17. Hasegawa S., Nagel C. — *Arch. Biochem. Biophys.* 124: 513, 1968.
18. Pilnik W., Rombouts F. M. — *Enzymes food process.* (red. Birch.), 105, 1980.
19. MacDonnel L. R., Jang R., Jansen E. F., Linewaever H. — *Arch. Biochem. Biophys.* 28: 26, 1950.
20. Solms J., Deuel H. — *Helv. Chim. Acta* 38: 321, 1955.
21. Kohn R., Furda J., Kopec Z. — *Collect. Czech. Chem. Commun.* 33: 264, 1968.
22. Miller L., Macmillan J. D. — *Biochemistry* 10: 570, 1971.
23. Lee M., Macmillan J. D., Miller L. — *J. Bacteriol.* 103: 595, 1970.
24. Miller L., Macmillan J. D. — *J. Bact.* 102: 72, 1970.
25. Rexová-Benková L., Markovič O. W. — *W: Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* t. 33: 323, 1976 (R. S. Tipson i D. Horton), Acad. Press, N.Y.
26. Demain A. L., Phaff H. J. — *J. Biol. Chem.* 210: 381, 1954.
27. Mill R. J., Tuttobello R. — *Biochem. J.* 79: 57, 1961.
28. Hatanaka C., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 33: 116, 1974.
29. Hatanaka C., Ymamura T. — *Agr. Biol. Chem.* 38: 2267, 1974.
30. Kamimiya S., Izaki K., Takahashi H. — *Agr. Biol. Chem.* 38: 1071, 1974.
31. Van Houdenhoven F. E. A. — *Studies on Pectin Liase*. Agr. Univ., Dep. Bioch., Wagenigen, Neth., 1975.
32. Edstrom R. D., Phaff H. J. — *J. Biol. Chem.* 239: 2403, 1964.
33. Kelly C. T., Fogarty W. M. — *Can. J. Microbiol.* 24: 1164, 1978.
34. Cheeson A., Codner R. C. — *J. Appl. Bacteriol.* 44: 347, 1978.
35. Dave B. A., Vaughn R. H. — *J. Bacteriol.* 108: 166, 1971.
36. Kohn R. — *Carbohydrate Res.* 20: 351, 1971.
37. Hatanaka C., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 36: 2307, 1972.
38. Hatanaka C., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 37: 593, 1973.
39. Sato M., Kaji A. — *Agr. Biol. Chem.* 41: 2199, 1977.
40. Urbanek H., Zalewska-Sobczak J., Krzechowska M. — *Bull. Acad. Pol. Sci., Biol.*, C. 111, 24, 1976.
41. Moran F., Nasuno S., Starr M. P. — *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 734, 1968.
42. Hatanaka C., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 34: 1618, 1970.
43. Nyiri L. — *Process Biochem.* 3 (8): 27, 1968.
44. Nyiri L. — *Process Biochem.* 4 (8): 27, 1969.
45. Sider W., Zuber H. — *Europ. J. Appl. Microbiol.* 4: 255, 1978.
46. Kilara A. — *Process Biochem.* 6-7: 35, 1982.
47. Zetelaki K. — *Process Biochem.* 11 (7): 11, 1976.

48. Szajer I. — *Acta Microbiol. Pol.* 27: 237, 1978.
49. Zetelaki-Horvath K. — *Acta Aliment.* 7: 209, 1978.
50. Pelz A. — *Nahrung* 8: 228, 1964.
51. Leśniak W., Jurzyk T., Pietkiewicz J. — *Przem. Ferm. Rolny* 1: 17, 1977.
52. Dmitriew S. M., Fedosiejew W. F., Miéchiedowa N. A. — *Pat. ZSRR* 184785, 1966.
53. Epstein R. B., Faber E. L., Piesina S. A. — *Prikl. Bioch. Microbiol.* 5: 289, 1969.
54. Galas E., Kubik C., Turkiewicz M., Zielińska M., Kałużewska M., Florianowicz T. — *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.* 2: 15, 1985.
55. Galas E., Kubik C., Turkiewicz M., Zielińska M., Florianowicz T. — *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.* 11-12: 20, 1986.
56. Izbiński T. W., Milewski J., Sawicka-Zukowska R. — *Pat. PRL* 131813, 1986.
57. Milewski J., Izbiński T. W., Zdziennicki A., Lewandowska A. — *Pat. PRL* 132931, 1986.
58. Baumann J. W. — W: *Enzym. Food Process.* (G. G. Birch, N. Blakebrough, K. J. Parker red.), *Appl. Sci., Publ. London*, s. 129, 1981.
59. Rombouts F. M., Pilnik W. — W: *Economic Microbiol.*, vol. 5, *Microb. Enz. Bioconv.* (A. H. Rose, red.) *Acad. Press, London*, s. 227, 1980.
60. Pressy R., Avants J. K. — *J. Food Sci.* 40: 937, 1975.
61. Schubert E. — *Biochem. Z.* 78: 323, 1952.
62. Schubert E. — *Nature* 169: 931, 1952.
63. Neubeck C. E. — *J. Assoc. Official Agr. Chem.* 42: 374, 1959.
64. Yamasaki M., Yasui T., Arima K. — *Agr. Biol. Chem.* 31: 552, 1967.
65. Ishii S., Yokotsuka T. — *J. Agr. Food Chem.* 21: 269, 1963.
66. Drzazga B., Mitek M. — *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.* 9: 20, 1987.
67. Hathway D. E., Seakins J. W. T. — *Biochem. J.* 70: 158, 1958.
68. Jędrychowska B., Kluszczyk H., Rzędowski W., Sawicka-Zukowska R. — XVIII sesja Nauk.: *Techn. Żywn. — Operacje i Proc. Jedn.*, Gdańsk 29-30.VI, 1987, s. 135.
69. Braddock R. J., Kesterson J. W. — *J. Food Sci.* 41: 82, 1976.
70. Terčelj D., Kocjanac M. — *Jugosl. Vinograd Vinar.* 18 (9): 20, 1984.
71. Łukawska-Pietrzak Z., Czyżycki A. — *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.* 3: 16, 1985.
72. Dunleary J. A., Fogarty W. M. — *Proc. 2-nd Biodeterior. Symp.*, Lunteran, s. 10, 1971.
73. Fogarty W. M. — *Process Biochem.* 8 (6): 30, 1973.
74. Łobanok A. G., Michaiłowa R. W., Oparina A. A. — *Prikl. Bioch. Microbiol.* 21 (2): 219, 1985.
75. Awrowa N. P. — *Prikl. Bioch. Microbiol.* 9: 735, 1975.

EDWARD GALAS

CELINA KUBIK

BARBARA SIKORA

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

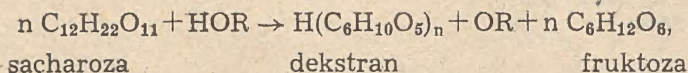
ENZYMATYCZNA DEGRADACJA DEKSTRANÓW W SOKACH CUKROWNICZYCH

Dekstrany są wielkocząsteczkowymi rozgałęzionymi polimerami glukozy pochodzenia bakteryjnego, zawierającymi głównie wiązania 1,6- α -glikozydowe, a obok nich wiązania typu 1,2- α , 1,3- α i 1,4- α . Biochemia dekstranów jest przedmiotem licznych badań, ponieważ wodne roztwory tych polisacharydów mają własności zbliżone do własności osocza krwi i mogą być wykorzystywane jako roztwory krwiozastępcze nie wywołujące aglutynacji krwinek czerwonych, a zwiększające objętość osocza. Oprócz tego, odpowiednio sporządzone preparaty dekstranu znajdują zastosowanie w chromatografii filtracyjnej.

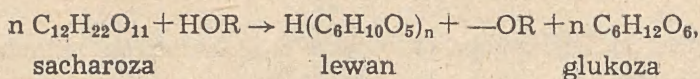
Otrzymywanie dekstranu nawet w dużych ilościach nie jest kosztowne. Jest on wytwarzany przez bakterie z rodziny *Streptococcaceae*, z rodzajów *Leuconostoc* [1, 2] i *Streptococcus* [3, 4] z disacharydu sacharozy. Bakterie *Streptococcus mutans*, wchodzące w skład normalnej flory jamy ustnej, wydzielają enzym dekstranosacharazę, przetwarzającą sacharozę w dekstran. Polisacharyd ten otacza zęby powłoką zabezpieczającą bakterie przed działaniem śliny (dekstran nie jest rozkładany przez amylazę śliny). Fruktaza jako substancja odżywcza dla bakterii, ulega przemianie do kwasu mlekowego, który szkodliwie oddziałując na szkliwo i zębiny powoduje niszczenie zębów. Poza tym powstawanie dekstranu może być przyczyną poważnych trudności technologicznych podczas otrzymywania sacharozy wówczas, gdy przerabiane są uszkodzone i zainfekowane surowce. W procesie otrzymywania cukru z trzciny cukrowej surowiec musi być szybko przetwarzany, gdyż w sprzyjających warunkach klimatycznych miejsca cięcia roślin łatwo ulegają zakażeniom, w tym również bakteriami dekstranotwórczymi. W cukrownictwie buraczanym dekstran pojawia się w takich okresach, w których po przejściowych falach mrozu, w ciągu dłuższego czasu utrzymują się dodatnie temperatury. W takich warunkach uszkodzone przez mróz buraki ulegają infekcjom. Bakterie z rodzaju *Leuconostoc* (*L. mesentero-*

ides, *L. dextranicum*) przetwarzają sacharozę w dekstran, a takie bakterie jak *Aerobacter laevanicum*, *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa* — w lewan.

Kondensację glukozowej części sacharozy do dekstranu powoduje enzym z grupy glikotransferaz — 2-glukozylotransferaza α -1,6-glukan:D-fruktoza (EC 2.4.1.5):



a fruktozowej części do lewanu — 6-fruktozylotransferaza β -2,6-fruktan:D-glukoza (EC 2.4.1.10):



gdzie: HOR — cukier (glukoza, fruktoza, sacharoza, maltoza itp.) Lewan jest również wysokocząsteczkowym polisacharydem, ale jego mocno rozgałęziona budowa sprawia, że cząsteczki lewanu są znacznie bardziej sferyczne niż dekstranu [5].

W zamrażniętych i odtajalych burakach szybko wzrasta zawartość dekstranu, lewanu i cukrów redukujących, przy jednoczesnym spadku zawartości sacharozy [6]. Wg Bergkvista [7] w odtajalych burakach, po 6-15 dobach ich przechowywania w 10-12°C, ilość dekstranu może dochodzić do 5000-32 000 mg/kg.

Zawarte w przerabianych surowcach polisacharydy przechodzą w procesie ekstrakcji do soku surowego (dyfuzyjnego). Badania nad wpływem występujących w sokach różnych ilości dekstranu, pektyn oraz lewanu [8, 9] na opory podczas filtracji osadów posaturacyjnych wykazały, że największy wpływ na ten proces wywiera dekstran. Hamowanie filtracji polega na adsorbowaniu się dekstranu na tkaninach filtracyjnych w postaci śluzowatego osadu oraz na tworzeniu się w jego obecności drobno-krystalicznego węglanu wapnia. Według Vukowa [9], dekstran zawarty w soku w ilości 800 ppm powoduje prawie całkowite zahamowanie procesu filtracji. Opory filtracji maleją z obniżeniem się masy cząsteczkowej polimeru i są minimalne, gdy jego m.c. wynosi 10^4 - 4×10^4 daltonów [8].

Inne ujemne strony obecności dekstranu w sokach cukrowniczych to obniżony stopień odzyskania sacharozy i powstawanie jej nietypowych, długich kryształów [10].

W ostatnich latach obserwuje się coraz większe zainteresowanie możliwością użycia dekstranaz do degradacji obecnych w sokach cukrowniczych glukanów. Nazwą dekstranaza (EC 3.2.1.11) są określane enzymy

hydrolizujące w dekstranie wiązania 1,6- α -glikozydowe. Właściwymi enzymami dla przemysłu cukrowniczego są endodekstranazy hydrolizujące wewnątrzłańcuchowe wiązania cząsteczki polimeru i powodujące szybki spadek lepkości roztworów. Enzymy takie są wytwarzane przez szereg bakterii zarówno tlenowych [11, 12], jak i beztlenowych [13, 14], a przede wszystkim przez grzyby nitkowate, głównie z rodzaju *Penicillium* [15, 17] i *Aspergillus* [18, 19]. Dekstranazy różnego pochodzenia charakteryzują się optymalnym pH mieszczącym się w przedziale 5-6 i optymalną temperaturą w granicach 50-60°. Ze względu na te właściwości dekstranazy mogą być zastosowane w produkcji cukru w czasie ekstrakcji, albo po uzyskaniu soku surowego, tzn. wtedy, gdy pH obrabianego materiału (5,8-6,6) jest odpowiednie dla działania tych enzymów. W niektórych krajach, np. w Danii i Japonii, podczas kampanii w 1985 r. degradowano dekstran występujący w burakach przez systematyczne dodawanie dekstranazy do ekstraktora [20] lub do soku surowego, przepływającego z ekstraktora do zbiornika nawapnienia wstępnego [8]. W cukrowniach duńskich wprowadzano 20-25 ppm dekstranazy firmy NOVO na 1/3 wysokości ekstraktora (licząc od miejsca wprowadzenia zimnej krajanki), gdzie temperatura wynosiła 65°C. Obserwowane wcześniej opory filtracji, powodujące obniżenie mocy przerobowej cukrowni do 2/3 szybkości maksymalnej, ustępowały po 2 godz. od momentu wprowadzenia enzymu. W cukrowni japońskiej enzym dodawano do soku surowego wypływającego z ekstraktora, a czas przebywania soku w rurach łączących ekstraktor ze zbiornikiem nawapniania wstępnego był wystarczający dla uzyskania odpowiedniego stopnia rozkładu dekstranu. Według obliczeń wykonanych na podstawie badań laboratoryjnych stwierdzono, że dekstran zawarty w soku w ilości 500 ppm ulega rozkładowi w ciągu 10 min. pod działaniem 10 ppm preparatu japońskiej dekstranazy w optymalnych warunkach temperatury (60°C) i pH (5,5).

Badania Łobanoka i in. [21] nad możliwością użycia dekstranaz z *Asp. insuetus*, *Asp. ustus*, *Pen. piscarium* i *Spic. violacea* do depolimeryzacji wysokomolekularnego dekstranu *L. mesenteroides*, dodanego do soku w ilości 10 000 ppm, lub dekstranu wytworzonego w zainfekowanym soku wykazały, że najlepszy jest enzym z *Asp. insuetus* i dodanie go w ilości 0,1 mg/l soku dyfuzyjnego powoduje znaczny spadek lepkości już w ciągu pierwszych dwóch minut działania enzymu.

Prowadzone w Instytucie Przemysłu Cukrowniczego [22] próby nad zastosowaniem japońskiej dekstranazy do degradacji dekstranu w soku dyfuzyjnym i wpływem dodawanego enzymu na proces oczyszczania soków wykazały zwiększenie ilości usuniętych niecukrów oraz 2-3-krotny wzrost współczynnika sedymentacji osadów posaturacyjnych.

W Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej od kilku lat prowadzone są badania nad biosyntezą endodekstranazy przez szczep *Penicillium funiculosum* 72. Optymalne pH działanie tego enzymu wynosi 5,4-5,5, temperatura — 50°C [23]. Te właściwości dekstranazy są korzystne z punktu widzenia jej przydatności w przemyśle cukrowniczym.

W naszych badaniach nad degradacją polisacharydów w sokach cukrowniczych stosowaliśmy preparaty otrzymywane w hodowli na pożywce mineralnej z sacharozą, zaszczerpionej mięszem zainfekowanego buraka oraz wysokocząsteczkowy dekstran z kultur *L. mesenteroides*. Stwierdziliśmy, że wprowadzenie 3j* dekstranazy do 100 ml soku zawierającego 10 000 ppm dekstranu powoduje w ciągu 30 min. obniżenie lepkości z 8-10 cP do około 2,3 cP. Dla porównania, lepkość roztworu dekstranu 40 000 rozpuszczonego w soku dyfuzyjnym, nie wywierającego już wpływu na proces filtracji, wynosi 2,1 cP [24].

Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadziliśmy wstępne wyliczenie zapotrzebowania na dekstranazę w przypadku przerobu buraków zawierających dekstran. Biorąc pod uwagę, że w ciągu 30 dni największego zagrożenia infekcjami przerabia się około 5400 t soku surowego, zastosowanie 3 j dekstranazy na 100 ml soku oznaczałoby konieczność użycia około 324 t surowego preparatu dekstranazy (śr. aktywność cieczy pohodowlanej wynosi 500 j). Dla uzyskania takiej ilości preparatu należałoby przeprowadzić około 80 cykli produkcyjnych 3-5-dobowych, w 5000 l fermentorze. Powyższe kalkulacje są bardzo przybliżone i w przypadku wystąpienia wczesnych fal mrozu (październik, listopad), okres dodawania enzymu, a tym samym jego ilość, musiałyby wzrosnąć. Należy wziąć również pod uwagę, że ilość stosowanego w doświadczeniach dekstranu była wysoka, prawdopodobnie wyższa od ilości najczęściej występującej w sokach dyfuzyjnych. W takich przypadkach potrzebna ilość enzymu ulegnie oczywiście odpowiedniemu zmniejszeniu.

*
* *

Doc. dr. E. Waleriańczykowi, dr. inż. J. Marczyńskiemu i mgr. inż. S. Zarzyckiemu serdecznie dziękujemy za udostępnianie materiałów dotyczących stosowania dekstranaz w przemyśle cukrowniczym.

* Za jednostkę aktywności dekstranazy przyjęto ilość enzymu, która z dekstranu 110 uwalnia cukry redukujące ekwiwalentne 1 μ molowi izomaltozy w ciągu 1 min., w temp. 45°C i w pH 5,4.

LITERATURA

1. Ebert K. H., Schenk G. — Adv. Enzymol. 30: 179, 1968.
2. Januszewicz I., Wojcieszczak P. — Pr. Gł. Inst. Przem. Roln.-Spoż. 4 (3), 1954.
3. Fitzgerald R. J., Spinel D. M. i in. — Arch. Oral Biol., 13: 125, 1968.
4. Gibbons R. J., Barghart S. — Arch. Oral Biol. 12: 11, 1967.
5. Lipinsky E. — W: *Biocatalysts in organic synthesis*, J. Tramper, H. C. von der Plas, P. Linco (red.), Noordwijkerhont, The Netherlands, str. 14-17, April 1985.
6. Sz wajcowska K. — Gaz. Cukrown. 12: 265, 1983.
7. Bergkvist R. — Socker Handlinger nr 1, 1975, cyt. wg Gaz. Cukrown. 81: 56, 1973.
8. Materiały z firmy Sumitomo Corporation (jap.).
9. Von K. Vukow — Zuckerindustrie 14, 1958.
10. Suherland D. N., Paton N. — Int. Sugar J. 70: 355, 1968.
11. Ingelman B. — Acta Chem. Scand. 2: 803, 1948.
12. Janson J. — J. Gen. Microbiol. 88 (2): 209, 1975.
13. Bailey R. W., Hutson D. H., Weigel H. — Bioch. J. 80: 514, 1961.
14. Hehre E. J., Sery T. — J. Bacteriol. 63: 424, 1952.
15. Brown R. G. — Pat. Brit. 1268016, 1972.
16. Fukumoto J., Tsuji H., Tsuru D. — J. Bioch. 69: 1113, 1971.
17. Hultin E., Nordstrom L. — Acta Chem. Scand. 3: 1405, 1949.
18. Novak L. J., Witt E. E. — Pat. USA 2972567, 1957.
19. Tsuru D., Hiroaka N., Fukumoto J. — J. Bioch. 71: 653, 1972.
20. Barfoed S., Mollgard A. — Zuckerindustrie 112 (5): 391, 1987.
21. Łobanok A. G., Zinczenko D. N. i in. — Biotechnologia 3: 89, 1986.
22. Zarzycki S., Oglaza J. — XVIII Secja Nauk. „Technologia Żywności” Gdańsk, 29-30.06.1987, str. 136.
23. Kubik C., Galas E. — Zesz. Nauk. PŁ., Technol. Chem. Spoż. 35: 229, 1980.
24. Galas E., Kubik C. — XVIII Sesja Nauk. „Technologia Żywności”, Gdańsk, 29-30.06.1987, str. 133.

EDWARD GALAS

EWA KWAPISZ

JACEK POLAK

Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka

ZASTOSOWANIE METOD GENETYCZNYCH W POSZUKIWANIU I KONSTRUKCJI BAKTERII WYDAJNIE WYTWARZAJĄCYCH α -AMYLAZY

WSTĘP

Doskonalenie szczepów produkcyjnych stanowi jeden z węzłowych problemów, warunkujących rozwój biotechnologii. Ostatnie lata to okres intensywnych poszukiwań nowych, bardziej efektywnych metod ulepszania szczepów. Do najnowszych i najbardziej znaczących zaliczyć należy: metody mutagenезy i (lub) racjonalnego skriningu (rational screening) oraz metody inżynierii genetycznej. Tradycyjna metoda mutagenезy i skriningu losowego (random screening), choć bardzo pracochłonna, uważana jest w dalszym ciągu za efektywną. Omówieniu tych metod w odniesieniu do bakterii rodzaju *Bacillus*, doskonalonych w kierunku poprawy ich uzdolnień do nadprodukcji α -amylazy, poświęcona będzie niniejsza praca.

α -Amylaza 4-glukanohydrolaza 1,4- α -glukanu (EC 3.2.1.1) jest enzymem szeroko wykorzystywanym w przemyśle. Hydrolizuje wiązania 1,4- α -glikozydowe amylozy, amylopektyny i glikogenu. Z jej użyciem nieodłącznie związane są technologie wytwarzania takich produktów jak glukoza, syropy fruktozowe, napoje alkoholowe, pieczywo, wyroby cukiernicze, koncentraty spożywcze, przetwory owocowe, tkaniny bawełniane, papier, leki i inne. Znaczenie przemysłowe tego enzymu ciągle rośnie.

Duże ilości α -amylazy wydzielają niektóre gatunki bakterii, grzybów nitkowatych i promieniowców. Obecnie do produkcji preparatów α -amylazy na skalę przemysłową najpowszechniej wykorzystywane są bakterie. Produkują one enzym o wysokiej termostabilności. Na użytek technologii wymagających zastosowania α -amylaz aktywnych w środowisku kwaśnym, produkowane są α -amylazy pleśniowe. Zakresy optymalnych temperatur i pH α -amylaz wytwarzanych przez wybrane gatunki bakterii i grzybów nitkowatych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Własności wybranych α -amylaz pochodzenia mikrobiologicznego

Mikroorganizm	Optymalna temperatura, °C	Optymalne pH	Źródło literatury
<i>Aspergillus niger</i>	50	4-5	Minoda i in. [1]
<i>B. subtilis</i> NA 64	55	5-7	Yamane i in. [2]
<i>B. subtilis</i> E 11	65	5,5-7	Galas i in. [3]
<i>B. amyloliquefaciens</i> F	65	5-9	Welker i in. [4]
<i>B. stearothermophilus</i> Donk, szczep. B.S. 1	65	5-6	Ogasahara i in. [5]
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	90	5-10	Morgan i in. [6]
<i>B. licheniformis</i> T 106	75	5,5-7,5	Galas i in. [7]

W ostatnich latach intensywnie poszukuje się drobnoustrojów wytwarzających α -amylazy o szczególnych właściwościach, tj. mających dużą termostabilność, działających w różnych zakresach pH, opornych na działanie detergentów, stabilnych w obecności niskich stężeń jonów wapnia.

Niewątpliwym osiągnięciem w dziedzinie poszukiwań źródeł termostabilnej α -amylazy było wyizolowanie przez Saito [8] szczepu *B. licheniformis* produkującego enzym o optymalnej temperaturze działania 90°C, tj. wyższej o około 20°C w porównaniu z wszystkimi wcześniej poznanymi α -amylazami bakteryjnymi. Właściwość ta ma istotne znaczenie praktyczne. Temperatura żelowania większości powszechnie stosowanych skrobi: kukurydzianej, pszennej, ziemniaczanej, wynosi około 80°C. Zachowanie pełnej aktywności preparatu powyżej tej temperatury znacznie usprawnia hydrolizę substratu. Enzym *B. licheniformis* jest stabilny przy bardzo małych stężeniach jonów wapnia, rzędu kilku mg/dm³. Czyni go to bardzo przydatnym do produkcji syropów fruktozowych, ponieważ w tych stężeniach jony wapnia nie zakłócają działania izomerazy glukozy. Jedną z mniej korzystnych właściwości tego enzymu jest jego wysokie optymalne pH działania 6,0-9,0. Komplikuje to proces produkcji glukozy, ponieważ glukoamylaza skutecznie działa przy pH 4,5.

W piśmiennictwie przedmiotu wymieniane są szczepy bakterii produkujące α -amylazy acidofilne. Opisane w pracach Buonacore i in. [9] i Uchino i in. [10] α -amylazy szczepów *B. acidocaldarius* najwyższą aktywność wykazują przy pH 4,5-6,5.

Efektem poszukiwań szczepów produkujących α -amylazy alkalofilne było, między innymi, wyizolowanie szczepów *Pseudomonas stutzeri* [11]

i *B. alcalophilic* subsp. *halodurans* [12] produkujących α -amylazy aktywne w pH odpowiednio 8 i 10.

Większość szczepów bakterii używanych obecnie do produkcji α -amylazy na skalę przemysłową uzyskana została na drodze mutagenizacji. Efekty mutagenizacji i skriningu losowego, bądź racjonalnego, szczepów rodzaju *Bacillus* opisane zostały między innymi w pracach Baileya i in. [13], Saito [14], Yoneda i in. [15], Sasakiego i in. [16], Hitotsuyanagiego i in. [17]. Uzyskane przez tych autorów mutanty produkowały α -amylazę z wydajnością 2-10-krotnie większą w porównaniu ze szczepami wyjściowymi. W części wymienionych prac [15, 17] mutanty wykorzystano jako materiał do transformacji. Yoneda i in. [15, 18] po przeprowadzeniu serii transformacji z użyciem mutantu *B. subtilis* uzyskali szczep wytwarzający α -amylazę w ilości 250-krotnie większej w stosunku do szczepu rodzicielskiego. Poddanie kolejnym cyklom mutagenizacji i transformacji mutantów *B. subtilis* pozwoliło Hitotsuyanagiemu i in. [17] uzyskać szczep wydzielający α -amylazę w ilości 1500-2000-krotnie większej w porównaniu ze szczepem wyjściowym.

Rozwój technik inżynierii genetycznej stworzył szerokie, nowe możliwości zarówno w dziedzinie badań poznawczych, jak i praktycznych zastosowań. Opracowanie metod syntezy, sekwencjonowania oraz klonowania fragmentów DNA pozwala wyjaśnić genetyczne czynniki odpowiedzialne za wydajną syntezę i technologicznie istotne właściwości enzymu. Świadomie wprowadzane zmiany w materiale genetycznym drobnoustrojów dają szansę dalszego zwiększenia wydajności biosyntezy w warunkach przemysłowych.

Historia poszukiwań metod ulepszania szczepów produkujących α -amylazę jest bardzo długa. W naszym artykule pragniemy pokazać to co w tej historii najnowsze i najciekawsze. Ograniczymy się więc do badań z lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych, dotyczących ulepszania szczepów *Bacillus* metodami mutagenizacji i racjonalnego skriningu oraz transformacji. Omówione zostaną najważniejsze zagadnienia związane z transformacją *Escherichia coli* i *B. subtilis*. Przedstawione zostaną również wyniki prac nad doskonaleniem bakterii metodami rekombinacji genetycznej.

DOSKONALENIE SZCZEPÓW METODAMI MUTAGENIZACJI I RACJONALNEGO SKRININGU

Opracowywanie nowych technologii biosyntezy mikrobiologicznej zmusza do prowadzenia intensywnych poszukiwań szczepów o szczególnych uzdolnieniach metabolicznych. W czołowych laboratoriach biotechnologicznych świata izoluje się ogromne ilości drobnoustrojów, również

z gatunków, które dotychczas pozostawały poza zainteresowaniem badaczy. Szczepy te poddaje się wielu próbom przy użyciu najnowocześniejszych, zautomatyzowanych aparatów, za pomocą których badana jest ich aktywność w wielu kierunkach. Szybkiej analizy danych i wyboru najwartościowszych izolatów dokonuje się przy użyciu technik komputerowych na podstawie odpowiednich banków danych. Wybrane szczepy kierowane są do dalszych badań i poddawane zabiegom mającym na celu ich udoskonalenie, tj. spowodowanie, aby stały się wydajnymi producentami pożądanego metabolitu, były stabilne, miały niewyszukane wymagania pokarmowe itp. Przez długie lata podstawową metodą ulepszania szczepów była mutagenizacja z zastosowaniem wybranych chemicznych lub (i) fizycznych mutagenów połączona z następującym po niej skринingiem losowym. W literaturze są przykłady, że ta pracochłonna metoda, określana często terminem „szukanie igły w stogu siana”, może dać dobre efekty. I tak, Baileyowi i in. [13] udało się uzyskać w wyniku cyklu mutagenizacji szczepu *B. subtilis* UV, etylenoimina, etylenoimina+UV, nitrozoguanidyna) mutantu produkującego dwukrotnie więcej α -amylazy w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Dodać przy tym należy, że szczep wyjściowy był dobrym producentem enzymu.

Mimo intensywnych badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmów mutagenезy, procesów reperacji DNA, mechanizmów kontroli ekspresji genów, biochemicznej regulacji dróg metabolicznych, przystępując do mutagenizacji często nie można przewidzieć, jakiego typu mutacja na poziomie molekularnym jest wymagana dla poprawy określonych właściwości danego szczepu. Ten w dużym stopniu przypadkowy dobór warunków mutagenizacji, czasochłonne selekcje zachęcają badaczy do poszukiwania nowych metod skринingu materiału poddanego mutagenizacji, zapewniających szybsze i łatwiejsze wyłonienie najwartościowszego mutantu. Postęp w tej dziedzinie uzależniony jest w dużym stopniu od rozwoju badań nad mechanizmem regulacji biosyntezy określonego produktu i od pomysłowości eksperymentatora. Chodzi o to, by wykorzystując wybrane zależności biochemiczne i genetyczne stworzyć takie warunki skринingu, w których wzrost niepożądanych kultur był ograniczony, a tym samym selekcja najlepszych — ułatwiona. Taką formę przesiewu określa się terminem racjonalnego skринingu (rational screening). Termin ten użyty był po raz pierwszy przez Elandera w 1979 r. [19]. Opracowane do chwili obecnej metody racjonalnego skринingu podzielono na bezpośrednie i pośrednie [20].

Metodyka bezpośredniego, racjonalnego skринingu, podobnie jak przesiewania losowego, polega na określeniu konkretnej interesującej nas aktywności metabolicznej szczepu, przy czym selekcji dokonuje się w

warunkach, w których aktywność ta jest sztucznie ograniczona. Metody pośrednie polegają na prowadzeniu przesiewów w tak dobranych warunkach by móc wyodrębnić szczepy np.: o obniżonej wrażliwości na duże stężenie gromadzonych produktów, o zwiększonej oporności w stosunku do wybranych związków toksycznych, nie podlegające katabolicznej represji, posiadające bardziej przepuszczalną ścianę komórkową. Z danych przytoczonych w artykułach przeglądowych Rowlandsa [20, 21] z 1984 r. wynika, że dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod selekcji mutantów, uzyskano wiele imponujących efektów, głównie dla szczepów produkujących antybiotyki. Mniej jest informacji dotyczących ulepszania szczepów wytwarzających enzymy pozakomórkowe. Są one jednak równie interesujące i reprezentatywne. Bardzo dobre efekty racjonalnego skринingu uzyskali Saito i in. [14], stosując do rozsiewu kultury *B. licheniformis* po mutagenizacji nitrozoguanidyną podłoże zawierające dodatek glukozy w stężeniach od 0,5 do 2%. Autorom udało się wyizolować kilka mutantów produkujących α -amylazę z wydajnością 2-10-krotnie większą w stosunku do szczepu wyjściowego. Mutanty te w mniejszym stopniu podlegały katabolicznej represji w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Wydajnie produkowały α -amylazę w obecności glukozy w podłożu fermentacyjnym w stężeniach nawet 2%, podczas gdy wyjściowy szczep *B. licheniformis* 584 tracił zdolność do syntezy enzymu już w obecności 0,5% dodatku tego cukru. Jest również interesujące, że faza intensywnej biosyntezy α -amylazy u części mutantów rozpoczynała się znacznie wcześniej, w porównaniu ze szczepem wyjściowym. W hodowli szczepu *B. licheniformis* 584 enzym był wydzielany głównie w późnej fazie stacjonarnej. Wybrane mutanty intensywnie produkowały enzym już w fazie wzrostu wykładniczego.

Znaczny postęp w opracowywaniu nowych metod skринingu dla ulepszania bakterii produkujących α -amylazę stanowiło wprowadzenie do podłoża selekcyjnych dodatku wybranych antybiotyków: tunikamycyny, ampicyliny, streptomycyny i cykloseryny. Stało się to możliwe dzięki postępowi w badaniach wyjaśniających mechanizmy regulacji biosyntezy enzymów pozakomórkowych. Wiadomo już, że produkcja pozakomórkowej α -amylazy u *B. subtilis* regulowana jest przez kilka genów: gen regulatorowy amyR [22], gen struktury amyE [23], gen amyS [24], papS [24], papM [25], tmrA [26]. Według Nomury i in. [26] biosynteza enzymu uzależniona jest od oporności komórek na tunikamycynę, tj. obecności genów tmrA i tmrB. Gen tmrA, ściśle związany z genem struktury α -amylazy, bezpośrednio odpowiada za jej produkcję. Gen tmrB, zlokalizowany w końcowej części genu α -amylazy, nie ma bezpośredniego wpływu na produkcję enzymu. Hitotsuyanagi i in. [17]

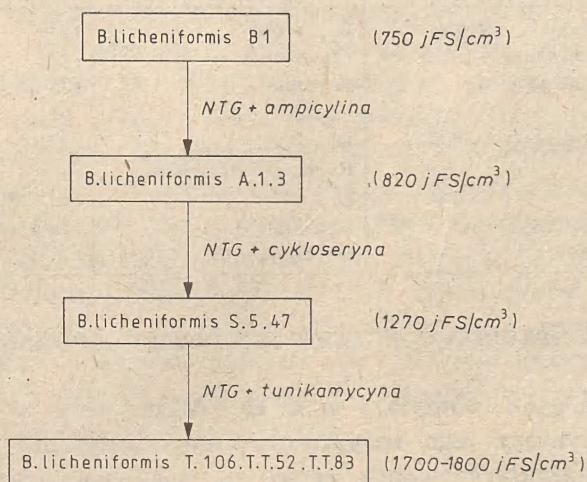
stwierdzili, że obecność dodatkowych genów: C-108, odpowiedzialnego za oporność w stosunku do cykloseryny i A-2, warunkującego oporność w stosunku do ampicyliny powodowała znaczne zwiększenie ilości wytwarzanej α -amylazy u szczepu wyposażonego we wcześniej wymienione geny. Dodatkowe geny C-108 i A-2 nie są bezpośrednio odpowiedzialne za produkcję α -amylazy, jakkolwiek ich obecność, na skutek efektu synergistycznego, znacznie wzmaga wydzielanie enzymu.

W 1976 r. Sasaki i in. [16], po mutagenizacji nitrozoguanidyną szczepu *B. subtilis* NA 64, selekcjonowali mutanty w pożywce z dodatkiem minimalnego, hamującego wzrost stężenia tunikamycyny, antybiotyku o działaniu antywirusowym, hamującego też wzrost bakterii gram-dodatnich, drożdży i grzybów. *B. subtilis* jest jednym z najbardziej wrażliwych gatunków na ten antybiotyk. Prawdopodobnie, nabycie oporności w stosunku do tunikamycyny związane jest z wytworzeniem takiej struktury ściany komórkowej, która umożliwia wydajniejsze wydzielanie α -amylazy. Użycie go w podłożu selekcyjnym pozwoliło autorom na uzyskanie mutantu B7, produkującego α -amylazę z wydajnością pięciokrotnie większą w porównaniu ze szczepem macierzystym.

Analogiczne próby prowadzone przez Hitotsuyanagiego i in. [17] w 1977 r. dla szczepu *B. subtilis* 6160 z zastosowaniem racjonalnych skriningów na pożywkach z cykloseryną i ampicyliną pozwoliły na uzyskanie mutantów produkujących α -amylazę w ilościach kilkakrotnie większych w stosunku do szczepu wyjściowego. Mutant oporny na cykloserynę produkował 5-krotnie więcej enzymu w porównaniu ze szczepem 6160, zaś oporny w stosunku do ampicyliny — sześciokrotnie więcej niż szczep wyjściowy. Mutanty te wykazywały również zwiększoną zdolność do produkcji proteinaz. Dzięki wprowadzeniu do szczepu *B. subtilis* 6160 (amyR3) następujących genów: amyS, papS, tmr7, N-26 i C-108, uzyskano szczep produkujący α -amylazę z wydajnością 1500-2000-krotnie większą w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Tak duży wzrost zdolności szczepu do produkcji α -amylazy w wyniku przeprowadzonych zabiegów autorzy tłumaczą występowaniem synergizmu w działaniu wprowadzonych genów.

W Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej przeprowadzono cykl mutagenizacji szczepu *B. licheniformis* produkującego α -amylazę o wysokiej termostabilności, stosując w podłożach selekcyjnych po mutagenizacjach dodatki następujących antybiotyków: ampicyliny, cykloseryny i tunikamycyny [7]. Wykonano łącznie piętnaście mutagenizacji przy użyciu nitrozoguanidyny. Po siedmiu z nich selekcję mutantów prowadzono w podłożu z ampicyliną, po sześciu — z cykloseryną, po dwóch — z tunikamycyną. Przebadano łącznie około 3000 klonów, wśród których znaleziono kilkadziesiąt produkujących α -amylazę

z wydajnością o 50-140% większą w stosunku do szczepu wyjściowego. Najlepsze spośród uzyskanych mutantów produkują α -amylazę o aktyw-



Rys. 1. Schemat zabiegów mutagenizacyjnych prowadzonych dla szczepu *B. licheniformis* B1 [7]

ności 1700-1800 j FS/cm³. Efekty uzyskane w poszczególnych etapach mutagenizacji i skринingach obrazuje rys. 1. Próby ulepszania szczepu *B. licheniformis* są kontynuowane.

KLONOWANIE GENÓW α -AMYLAZY

Bakterie rodzaju *Bacillus* wytwarzają pozakomórkowe amylazy różniące się między sobą właściwościami i specyficznością działania. Poszczególne szczepy mogą produkować kilka amylolitycznych enzymów. Izolacja szczepu produkującego jedną tylko amylazę o określonych właściwościach jest trudna do osiągnięcia metodami skринingu. W odróżnieniu od tego, klonowanie fragmentu DNA stanowiącego gen struktury takiego pojedynczego enzymu, o pożądanых cechach α -amylazy, w dobrze poznanym pod względem genetycznym organizmie-gospodarzu, jak np. *E. coli* czy *B. subtilis*, w dużym stopniu ułatwia charakterystykę nowych amylaz, a także pozwala na znaczne zwiększenie wydajności ich syntezy.

W ciągu ostatnich dziesięciu lat ukazało się wiele publikacji donoszących o klonowaniu genów α -amylazy wytwarzanej przez mezofilne i termofilne gatunki rodzaju *Bacillus* w *E. coli* i *B. subtilis* (tab. 2).

Tabela 2

Klonowanie genów α -amylazy

Organizm-dawca	Organizm-gospodarz	Literatura
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	[27]
<i>B. coagulans</i>	<i>E. coli</i>	[28]
<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	[29-31]
	<i>E. coli</i>	[31]
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. subtilis</i>	[32]
	<i>B. stearothermophilus</i>	[32]
	<i>E. coli</i>	[33, 34]
<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	[35-37]
	<i>E. coli</i>	[38]

ESCHERICHIA COLI JAKO ORGANIZM-GOSPODARZ

Klonowania genu α -amylazy w *E. coli* dokonywano w celu zbadania przebiegu biosyntezy tego enzymu w obcym organizmie, a także dla wstępnego scharakteryzowania genu. W większości przypadków nie obserwowano wzrostu wydajności biosyntezy enzymu u nowego gospodarza, jakkolwiek Tsukagoshi i in. [34] donieśli o trzykrotnym zwiększeniu aktywności amylolitycznej w wyniku wprowadzenia genu pochodzącego od *B. stearothermophilus*. We wszystkich cytowanych pracach, komórki *E. coli* wytwarzały białka enzymatyczne cechujące się takimi samymi właściwościami jak syntezowane przez organizmy rodzicielskie. Nie ulegały również zmianom optymalna temperatura działania i termostabilność enzymów, ani zależność aktywności od pH środowiska. W przypadku α -amylazy *B. licheniformis* [31] badania immunologiczne dały identyczny wynik dla białek wytwarzanych przez komórki dawcy jak i biorcy genu.

Próby lokalizacji syntezowanej α -amylazy wykazały, że większość białka gromadzona jest wewnątrz komórek *E. coli*, a dokładniej w przestrzeni peryplazmatycznej, niezależnie od stosowanego gatunku dawcy genu. Ilość enzymu, oznaczana po usunięciu ściany komórkowej, w stosunku do całkowitej aktywności sklonowanego genu, wynosiła 82-85% dla *B. coagulans* [28], ponad 96% dla *B. licheniformis* [31] i 80-82% w przypadku *B. stearothermophilus* [34]. Pozakomórkowa aktywność α -amylazy, oznaczona w płynie pohodowlanym, stanowiła 1-6% aktywności całkowitej. Wysoki poziom peryplazmatycznej aktywności enzymu wskazuje na podobieństwo informacji genetycznej warunkującej transport białek przez błonę cytoplazmatyczną u gramdodatnich bakterii rodzaju *Bacillus* i gramujemnych *E. coli* [39]. Niewielka ilość α -amylazy wydzielanej na zewnątrz praktycznie wyklucza możliwość użycia *E. coli* jako przemysłowego producenta enzymu.

W badaniach poznawczych organizm ten jest bardzo wygodny ze względu na dostępność wielu, dobrze scharakteryzowanych systemów wektorowych, stabilne utrzymywanie rekombinowanego DNA w komórkach oraz stosunkowo prostą metodę transformacji.

Yang i in. [38] używali *E. coli* jako gospodarza w procesie izolowania genu α -amylazy *B. subtilis*, a następnie po wydzieleniu odpowiedniego fragmentu DNA, określili jego pełną sekwencję nukleotydową. Natomiast Mielenz [33], klonując w *E. coli*, dowiódł, że w badanym przez niego szczepie *B. stearothermophilus*, w przeciwieństwie do innych organizmów-producentów, gen α -amylazy zlokalizowany jest w naturalnie występującym plazmidzie. Innych, interesujących informacji dostarczyły badania fizjologii komórek *E. coli* 188 zawierających gen α -amylazy pochodzącej od *B. coagulans* [40]. Otrzymane wyniki sugerują istnienie szkodliwego wpływu syntezy i wydzielania enzymu na wzrost tego szczepu bakteryjnego, szczególnie w podłożach zawierających maltozę lub glicerol jako jedyne źródło węgla.

BACILLUS SUBTILIS JAKO ORGANIZM-GOSPODARZ

Bakterie rodzaju *Bacillus* wzbudzają rosnące zainteresowanie ze względu na możliwości stworzone dzięki rozwojowi techniki rekombinacji DNA. Mogą się one przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmów genetycznych i biochemicznych biosyntezy i pozakomórkowego wydzielania substancji białkowych, w tym także białek enzymatycznych. Powinno to ułatwić osiągnięcie wyższego poziomu wytwarzania przez bakterie enzymów o odpowiednich właściwościach.

B. subtilis jest najlepiej genetycznie poznany gatunek wśród gramdodatnich bakterii [41]. Opracowane i sprawdzone są dla niego także metody klonowania DNA [42].

Najbardziej zaawansowane badania genetyczne dotyczące nadprodukcyjności α -amylazy u *B. subtilis* prowadzone są w pracowniach japońskich. Ich obiektem był wydajny pod tym względem szczep *B. subtilis* NA64, otrzymany metodami mutagenizacji i transformacji [17]. Geny tego szczepu, regulatorowy amyR2 i struktury amyE klonowano wektorem fagowym, a następnie reklonowano wektorem plazmidowym w *B. subtilis* [37]. Cykl transformacji doprowadził do wyizolowania i określenia sekwencji 2,3 kb (tysięcy par zasad) fragmentu DNA kierującego syntezą α -amylazy. Dalsze prace doprowadziły do ustalenia regionów tej sekwencji spełniających określone funkcje w procesie biosyntezy białka. Wyodrębniono między innymi region promotorowy oraz fragment kodujący peptyd sygnałowy [43]. Sekwencja ta składająca się z 41 aminokwasów umożliwia transport białka α -amylazy przez błonę cytoplaz-

matyczną. W celu porównania mechanizmów sekrecji białka w bakteriach gramdodatnich i gramujemnych, fragment promotorowy i sygnałowy połączono z genem struktury penicylinyazy, a następnie sprawdzono ekspresję takiego hybrydowego DNA w *E. coli* [39]. Podobne próby wykonywano również wykorzystując analogiczne sekwencje pochodzące od *B. amyloliquefaciens*, osiągając ekspresję genu penicylinyazy w *B. subtilis* [44]. Pozytywne wyniki obu eksperymentów wskazują na możliwość wykorzystania regulujących biosyntezę amylazy sekwencji do konstrukcji uniwersalnych wektorów sekrecyjnych, służących klonowaniu innych poszukiwanych białek i peptydów.

Duże zainteresowanie termostabilnymi enzymami bakterii z rodzaju *Bacillus*, a wśród nich α -amylazami, skłoniło do prób przenoszenia kodujących te białka genów do *B. subtilis* w celu zwiększenia wydajności ich biosyntezy [29-31, 45]. W Irlandii [29] dokonano przeniesienia genu wysokotermostabilnej α -amylazy z *B. licheniformis* FDO2 do *B. subtilis*, w wyniku czego nastąpił około 20-krotny wzrost wydajności biosyntezy tego enzymu u nowego gospodarza. Pomyślny rezultat zachęcił autorów do wykorzystania, jako dawcy genu, innego szczepu *B. licheniformis* RPO2, dzięki czemu osiągnęli oni wydajną biosyntezę enzymu o bardzo korzystnych właściwościach. Optymalna temperatura działania została podwyższona z 93°C do 100°C, i — co zaskakujące — aktywność α -amylazy po ogrzewaniu do 80°C w ciągu 10 minut wzrosła o 7%. Analiza restrykcyjna fragmentów DNA zawierających gen amylazy każdego ze szczepów *B. licheniformis*, dała identyczny obraz. Zróżnicowanie własności tych dwóch preparatów uwarunkowane jest najprawdopodobniej punktowymi zmianami w składzie aminokwasowym [30].

Należy również wspomnieć o mniej pomyślnych eksperymentach klonowania termostabilnych amylaz w *B. subtilis*. Rezultatem przeniesienia genu α -amylazy z *B. stearothermophilus* CU21 do *B. subtilis* było czterokrotne obniżenie jej aktywności, jakkolwiek jego wprowadzenie do innego szczepu tego samego gatunku co dawca DNA, spowodowało pięciokrotny wzrost wydajności biosyntezy enzymu w stosunku do osiągniętej przez organizm rodzicielski [32]. Uzasadnieniem takiego wyniku może być mała liczba kopii rekombinowanego plazmidu, niski poziom ekspresji, czy też ograniczona wydajność sekrecji białka u innego gatunku bakterii.

Innym poważnym problemem towarzyszącym klonowaniu jest stabilność hybrydowego, plazmidowego DNA w komórkach nowego gospodarza. Joy et al. [31], klonując gen α -amylazy *B. licheniformis*, zaobserwowali dużą stabilność plazmidu u *E. coli* wobec bardzo małej u *B. subtilis*. W hodowlach bez kanamycyny (czynnik selekcyjny transformanty), już po pięciu generacjach, jedynie 50% komórek zachowywało antybiotyczną oporność oraz zdolność do syntezy α -amylazy.

Równoczesna utrata wymienionych cech świadczy o „gubieniu” całych rekombinowanych plazmidów. Takie zjawisko określane jest jako niestabilność segregacyjna. Stosowany w tej pracy wahadłowy wektor klonujący, zdolny do replikacji w *E. coli* i *B. subtilis*, wyróżnia się znaczną wielkością — 12,1 kb, w czym można upatrywać jednej z przyczyn jego niewielkiej stabilności. Mała trwałość strukturalna plazmidowego DNA, obserwowana była też w przypadku klonowania genu α -amylazy *B. coagulans* [28].

Problem małej stabilności klonowanych genów może być rozwiązany, lub w dużym stopniu ograniczony, dzięki zastosowaniu integracyjnych systemów wektorowych. Umożliwiają one integrację genów do chromosomu gospodarza, a następnie ich amplifikację, w wyniku czego może być osiągany znaczny wzrost wydajności biosyntezy białek.

Jednym z pierwszych przykładów takiego rozwiązania jest klonowanie genu α -amylazy *B. amyloliquefaciens* H w nadprodukcyjnych szczepach *B. subtilis* [46]. Gen włączono do genomu bakteriofaga Φ 3T, w wyniku czego otrzymano bakteriofag zdolny do lizogenii i wydajnej replikacji w *B. subtilis*. Bakterie lizogenne nadprodukcyjnych szczepów *B. subtilis* wytwarzały bardzo dużą ilość α -amylazy obydwu typów *B. amyloliquefaciens* H i *B. subtilis*.

Określenie mechanizmu genetycznej amplifikacji regionu zawierającego geny AmyE i tmrB było przedmiotem badań w japońskich pracowniach [47-50]. Furusato i in. [48] włączali geny amylazowego regionu do lizogennego faga *B. subtilis* ϕ 11. W wyniku transdukcji rekombinowanego faga do *B. subtilis*, a następnie hodowli w podłożu z dodatkiem tunikamycyny, osiągano amplifikację klonowanego regionu do 10 kopii. Ilość α -amylazy wytwarzanej przez transduktanty wzrastała około 20-krotnie w stosunku do wydajności szczepu-gospodarza i ponad 2-krotnie w stosunku do dawcy genów. Szczegółowe badania doprowadziły do wniosku, że nadprodukcja α -amylazy i oporność na tunikamycynę u wcześniej otrzymywanych mutantów i transformantów tmrA7 mogłyby być wynikiem równoczesnej amplifikacji genu AmyE i genu tmrB [49]. W wyniku dalszych eksperymentów wykluczono obecność genu tmrA w chromosomie *B. subtilis*, a mutację tmrA7 uznano za specyficzne strukturalne zmiany DNA indukujące amplifikację genów [50].

Eksperyment przeprowadzony przez Albertini i in. [51] polegał na transformacji kompetentnych komórek *B. subtilis* plazmidem pRHA39 niezdolnych do replikacji w organizmie gospodarza i przenoszącym gen α -amylazy *B. subtilis*. Selekcja transformantów opornych na chloramfenikol doprowadziła do wyizolowania szczepów z plazmidem zintegrowanym z chromosomem w miejscu homologii. W wyniku hodowli bakterii na pożywkach zawierających wzrastające stężenie antybiotyku

(5-50 $\mu\text{g/ml}$) nastąpiła amplifikacja genu do około 10 kopii. Konsekwencją tego był znaczny wzrost wydajności syntezy α -amylazy, będący w korelacji z ilością kopii genu.

Ostatnim przykładem stosowania chromosomalnej integracji genu są wyniki fińskiej pracy [52] będącej kontynuacją badań omawianych w następnym rozdziale. Kompetentne komórki *B. subtilis* transformowane były pulą plazmidów niezdolnych do replikacji w tym organizmie, z których każdy zawierał: gen α -amylazy *B. amyloliquefaciens*, gen nadający oporność na chloramfenikol, jak również niewielkie fragmenty chromosomalnego DNA *B. subtilis*. W wyniku transformacji otrzymano kilka szczepów zawierających gen α -amylazy w dwóch kopiach, zintegrowanych z chromosomem w miejscach homologii. Szczepy te wytwarzały α -amylazę w ilościach porównywalnych z tymi, jakie otrzymano dla wielokopiowego plazmidu zawierającego ten sam gen. Chromosomalne kopie genu były zwielokrotnione do 8 kopii poprzez amplifikację rosnącym stężeniem antybiotyku lub w wyniku powtórnej transformacji. Osiągnięto 8-krotny wzrost wydajności syntezy enzymu w stosunku do szczepów rodzicielskich. Synteza α -amylazy u otrzymanych szczepów przebiegała wolniej, dłuższa była także faza produkcyjna w stosunku do szczepów zawierających wolne, wielokopiowe plazmidy. Stwierdzono jednak dobrą stabilność tych szczepów po 42 h wzrostu w podłożu bez dodatku antybiotyku.

STOSOWANIE REKOMBINOWANYCH SZCZEPÓW W SKALI PRZEMYSŁOWEJ

Inżynieria genetyczna stwarza obecnie możliwość zwiększania ilości kopii określonych genów na drodze klonowania ich w wielokopiowych plazmidach lub integracji chromosomalnej. Wprawdzie pojawiają się doniesienia o klonowaniu genów amylazy *E. coli* i *B. subtilis*, niemniej dotychczas istnieje bardzo niewiele informacji odnośnie przemysłowego zastosowania laboratoryjnych wyników takich eksperymentów. Przypuszczalnie większość z nich sprawdzana jest także w większej skali, być może nawet przemysłowej, jednakże dane na ten temat, prawdopodobnie ze względu na ich poufność, nie są publikowane. Technologiczne wykorzystywanie konstruowanych szczepów może być także utrudnione ze względu na istniejące w niektórych krajach surowe przepisy związane ze stosowaniem organizmów zawierających rekombinowany DNA. Także niestabilność rekombinowanych plazmidów może być prawdopodobnym czynnikiem zniechęcającym do przemysłowego stosowania szczepów genetycznie modyfikowanych.

W tym kontekście na omówienie zasługuje cykl fińskich badań rozpoczętych w uniwersyteckiej pracowni, a następnie kontynuowanych w laboratoriach przemysłowych i na linii produkcyjnej firmy Alko Ltd.

[27, 53-55]. Źródłem genu α -amylazy był w tych doświadczeniach przemysłowo wykorzystywany szczep *B. amyloliquefaciens*. Głównym celem pierwszego etapu badań było określenie struktury i sprawdzenie ekspresji tego genu w *B. subtilis*. W wyniku wklonowania go plazmidowym wektorem osiągnięto pięciokrotny wzrost wydajności biosyntezy enzymatycznego białka u nowego gospodarza, w stosunku do wydajności wykazywanej przez dawcę genu, oraz 2500-krotne zwiększenie aktywności szczepu biorcy. Właściwości syntetyzowanego białka były identyczne z produkowanym przez organizm rodzicielski [27].

Zrekombinowany szczep *B. subtilis* wydawał się odpowiadać wymogom przemysłowej produkcji α -amylazy, w związku z czym dalsze badania prowadzone były w Alko Ltd. W skali laboratoryjnej w reaktorze o pojemności 8 dm³ i półprzemysłowej (10 m³) sprawdzano różne warianty podłoża w poszukiwaniu jego najtańszej wersji [53]. Rekombinowany szczep przewyższał wydajnością biosyntezy α -amylazy *B. amyloliquefaciens*, dotychczasowego producenta enzymu, wówczas gdy podłoże hodowlane zawierało dużą ilość łatwo przyswajalnego źródła azotu. Zmiany wymagał również proces sterylizacji ze względu na rozkład termiczny niektórych składników podłoża. Poza tym, zasadniczym problemem, wymagającym rozwiązania, było opracowanie warunków zapewniających stabilne utrzymywanie plazmidów w komórkach bakteryjnych rekombinowanego szczepu *B. subtilis*. W większości fermentacji przemysłowych, podłoża hodowlane nie mogą zawierać antybiotyków, których obecność stabilizuje plazmidowy DNA w komórce. W przypadku wytwarzania α -amylazy rekombinowany szczep powinien utrzymywać plazmidy, przy braku antybiotycznej selekcji, przez 25-40 generacji do rozpoczęcia najintensywniejszej fazy produkcyjnej. W próbach laboratoryjnych po 50 generacjach stwierdzono mniej niż 1% komórek, które utraciły plazmidy [54]. Niektóre klony pobierane w końcowej fazie hodowli wykazywały również niestabilność strukturalną. Wprawdzie wykazywały one oporność w stosunku do kanamycyny, kodowaną w stosowanym wektorze klonującym, jednak wytwarzały śladowe tylko ilości enzymu. W wyniku analizy restrykcyjnej określono zakresy delecji uszkadzających amylazowy region w poszczególnych plazmidach.

Ostatnim etapem tego cyklu prac było zastosowanie rekombinowanego szczepu *B. subtilis* do przemysłowej produkcji α -amylazy [55]. Jako głównych składników podłoża produkcyjnego użyto namoku kukurydzianego i modyfikowanej skrobi. Możliwość utraty rekombinowanych plazmidów ograniczono stosując proces dwuetapowy. W pierwszym, obejmującym hodowlę w reaktorach o objętościach do 150 dm³, prowadzono je w obecności antybiotyku, a następnie otrzymaną kulturą szczepiono fermentor o pojemności 2,7 m³ i w końcu 60 m³ podłoża bez dodatku

kanamycyny. Tym sposobem ograniczono do 12 liczbę generacji hodowanych przy braku antybiotycznej selekcji.

Wydajność biosyntezy α -amylazy w skali przemysłowej była o ponad 60% większa w stosunku do poziomu osiągniętego przez dawcę genu. Według autorów opisanej technologii, jest to pierwsze doniesienie o pomyslnym wykorzystaniu rekombinowanego szczepu *Bacillus* do produkcji enzymu w skali przemysłowej.

LITERATURA

1. Minoda Y., Arai M., Torigoe Y., Yamada K. — *Agr. Biol. Chem.* 32: 110-118, 1968.
2. Yamane K. — *J. Bacteriol.* 120: 792-798, 1974.
3. Galas E. i in. — *Sposób otrzymywania ciepłostatej amylazy bakteryjnej*. Patent PRL 114551, 1984.
4. Welker N., Campbell L. L. — *Biochemistry* 6: 3681-3686, 1967.
5. Ogasahara K., Imanishi A., Isemura T. — *J. Biochem.* 87: 77-82, 1980.
6. Morgan F. J., Priest F. G. — *J. Appl. Bacteriol.* 50: 107-114, 1981.
7. Galas E. i in. — *Spr. z pracy „Otrzymywanie α -amylazy bakteryjnej z termofili oraz doskonalenie technologii produkcji α -amylazy z mezofili”*, Łódź, 1985.
8. Saito N. — *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 290-298, 19733.
9. Buonocore V., Caporale C., De Rosa M., Gambacorta A. — *J. Bacteriol.* 128: 515-521, 1976.
10. Uchino F. — *Agric. Biol. Chem.* 46: 7-11, 1982.
11. Roybt J., Ackerman R. J. — *Arch. Biochem. Biophys.* 145: 105-114, 1971.
12. Boyer E., Ingle M. — *J. Bacteriol.* 110: 992-1000, 1972.
13. Bailey M. J., Markkanen P. H. — *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 25: 73-79, 1975.
14. Saito N., Yamamoto K. — *J. Bacteriol.* 121: 848-856, 1975.
15. Yoneda Y., Maruo B. — *J. Bacteriol.* 124: 48-54, 1975.
16. Sasaki T., Yamasaki M., Maruo B., Yoneda Y., Yamane K., Takatsuki A., Tamura G. — *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 70: 125-131, 1976.
17. Hitotsuyanagi K., Yamane K., Maruo B. — *Agric. Biol. Chem.* 43: 2343-2349, 1979.
18. Yoneda Y. — *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 274-278, 1980.
19. Elander R. P. — *Proceedings of the Third International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms GIM 78 American Society for Microbiology*, Washington DC, str. 21-35, 1979.
20. Rowlands R. T. — *Enzyme Microb. Technol.* 6: 290-300, 1984.
21. Rowlands R. T. — *Enzyme Microb. Technol.* 6: 3-10, 1984.
22. Yamaguchi K., Matsuzuki H., Maruo B. — *J. Gen. Appl. Microbiol.* 15: 97-107, 1969.
23. Yuki S. — *Jpn. J. Genet.* 50: 155, 1975.
24. Yoneda Y. — *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 274-276, 1980.
25. Steinmetz M., Kunst F., Dedonder R. — *Molec. Gen. Genet.* 148: 281-285, 1976.

26. Nomura S. K., Yamane K., Sasaki T., Yamasaki M., Tamura G., Maruo B. — J. Bacteriol. 136: 818, 1978.
27. Palva I. — Gene 19: 81-87, 1982.
28. Cornelis P., Digneffe C., Willemot K. — Md. Gen. Genet. 186: 507-511, 1982.
29. Ortlepp S. A., Ollington J. F., McConnell D. J. — Gene 23: 267-276, 1983.
30. Piggott R. P., Rossiter A., Ortlepp S. A., Pembroke J. T., Ollington J. F. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 175-183, 1984.
31. Joyet P., Guerineau M., Heslot H. — FEMS Microbiol. Lett, 21: 353-358, 1984.
32. Aiba S., Kitai K., Imanaka T. — Appl. Environ. Microbiol. 46: 1059-1065, 1983.
33. Mielenz J. R. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5975-5979, 1983.
34. Tsukagoshi N., Ihara H., Yamagata H., Uda S. — Mol. Gen. Genet. 193: 58-63, 1984.
35. Nomura S., Yamane K., Masuda T., Kawamura F., Mizukami T., Saito H., Takatsuki A., Yamasaki M., Tamura G., Maruo B. — Agric. Biol. Chem. 43: 2637-2638, 1979.
36. Takeichi Y., Ohmura K., Nakayama A., Otozai K., Yamane K. — Agric. Biol. Chem. 47: 159-161, 1983.
37. Yamazaki H., Ohmura K., Nakayama A., Takeishi Y., Otozai K., Yamasaki M., Tamura G., Yamane K. — J. Bacteriol. 156: 327-337, 1983.
38. Yang M., Galizzi A., Henner D. — Nucl. Acids Res. 11: 237-249, 1983.
39. Nakazawa K., Takano T., Sohma A., Yamane K. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 134: 624-631, 1986.
40. Willemot K., Cornelis P. — J. Gen. Microbiol. 129: 311-319, 1983.
41. Henner D. J., Hoch J. A. — W: *The molecular biology of the Bacilli*. D. A. Dubnau (red.), Academic Press, New York, str. 1-33, 1982.
42. Gryczan T. J. — W: *The molecular biology of the Bacilli*. D. A. Dubnau (red.), Academic Press, New York, str. 307-329, 1982.
43. Ohmura K., Yamazaki H., Takeichi Y., Nakayama A., Otozai K., Yamane K., Yamasaki M., Tamura G. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 112: 678-683, 1983.
44. Palva J., Sarvas M., Lehtoväara P., Sibakow M., Kaariainen L. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582-5586, 1982.
45. Shinomiya S., Yamane K., Kawamura F., Yoshikawa H., Kazami J., Saito H. — Agric. Biol. Chem. 48: 1339-1341, 1984.
46. Yoneda Y., Graham S., Young F. E. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 91: 1556-1564, 1979.
47. Hashiguchi K., Tanimoto A., Nomura S., Yamane K., Yoda K., Harada S., Mori M., Furusato T., Takatsuki A., Yamasaki M., Tamura G. — Agric. Biol. Chem. 49: 545-550, 1985.
48. Furusato T., Takano J., Yamane K., Hashiguchi K., Tanimoto A., Mori M., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G. — J. Bacteriol. 165: 549-556, 1986.
49. Hashiguchi K., Tanimoto A., Nomura S., Yamane K., Yoda K., Harada S., Mori M., Furusato T., Takatsuki A., Yamasaki M., Tamura G. — Mol. Gen. Genet. 204: 36-43, 1986.

50. Mori M., Tanimoto A., Yoda K., Harada S., Koyama N., Hashiguchi K., Obinata M., Yamasaki M., Tamura G. — *J. Bacteriol.* 166: 787-794, 1986.
51. Albertini A. M., Galizzi A. — *J. Bacteriol.* 162: 1203-1211, 1985.
52. Kallio P., Palva A., Palva J. — *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 64-71, 1987.
53. Nybergh M. — *Third European Congress on Biotechnology*, Monachium, t. III, str. 409-413, 1984.
54. Vehmäänpera J. O., Korhola M. P. — *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 456-461, 1986.
55. Vehmäänpera J., Nybergh P. M. A., Tanner R., Pohjonen E., Bergelin R., Korhola M. — *Enzyme Microb. Technol.* 9: 546-549, 1987.

EDWARD GALAS

TERESA BOBOWICZ-LASSOCIŃSKA

Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka

MIKROBIOLOGICZNE ENZYMY HYDROLIZUJĄCE WIĄZANIA α -1,6 GLUKOZYDOWE. MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA

WSTĘP

Większość rodzajów skrobi mających znaczenie przemysłowe zawiera 4-5% wiązań α -1,6 glukozydowych. Wiązania te stanowią barierę lub znacznie opóźniają działanie enzymów hydrolizujących skrobię, takich jak: α -amylaza, β -amylaza czy glukoamylaza. Zastosowanie enzymów działających specyficznie na wiązania α -1,6 glukozydowe w skrobi, takich jak pululanaza czy izoamylaza łącznie z w/w enzymami prowadzi do całkowitej degradacji skrobi, a stosowanie odpowiednich kombinacji tych enzymów pozwala uzyskać żądany produkt: glukozę, maltozę lub fruktozę gdy zastosujemy dodatkowy enzym — izomerazę glukozową.

WYSTĘPOWANIE

Enzymy rozszczepiające wiązania α -1,6 glukozydowe w punktach rozgałęzień amylopektyny i glikogenu po raz pierwszy zostały wyizolowane z drożdży [1]. Do chwili obecnej podobne enzymy znaleziono u szeregu roślin wyższych [2, 3], ssaków [31] oraz u wielu mikroorganizmów (tab. 1).

KLASYFIKACJA

Grupę enzymów katalizujących hydrolizę wiązań α -1,6 glukozydowych w skrobi i glikogenie oraz produktach ich degradacji Norman i in. [30] podzielili zgodnie z ich specyficznością substratową na trzy grupy:

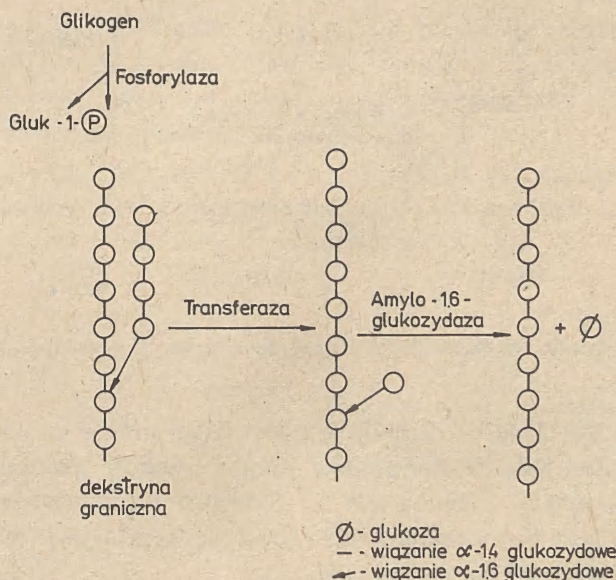
— Amylo-1,6-glukozydazy EC 3.2.1.33 (6- α -D-glukanohydrolazy dekstryny)* izolowane u organizmów wyższych, hydrolizujące wiązania α -1,6 w środku łańcucha, od którego uwalniają pojedyncze jednostki glukozowe. U ssaków po działaniu fosforylasy na glikogen powstają graniczne dekstryny zawierające 4 jednostki glukozowe. Dla dalszej

Tabela 1

Występowanie mikrobiologicznych enzymów hydrolizujących wiązania α -1,6
glukozydowe

Mikroorganizm	Rodzaj enzymu	Odnosnik do literatury
<i>Aerobacter aerogenes</i>	pululanaza	4, 6, 7, 8, 9
<i>Aspergillus niger</i>	izopululanaza	27
<i>Arthrobacter globiformis</i>	izopululanaza	28
<i>Klebsiella aerogenes</i> (NCIB 418, NCIB 5938, NCIB 8017)	pululanaza	10
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9633	pululanaza	10
<i>K. rhinoscleromatis</i> NCTC 5046	pululanaza	10
<i>K. ozaenae</i> NCTC 5050	pululanaza	10
<i>Bacillus alvei</i>	pululanaza	11
<i>B. amyloliquefaciens</i>	izomylaza	12
<i>B. cereus</i>	pululanaza	11
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	pululanaza	13
<i>B. circulans</i>	pululanaza	11
<i>B. firmus</i>	pululanaza	11
<i>B. macerans</i>	pululanaza	11, 14
<i>B. polymyxa</i>	pululanaza	11
<i>Bacillus</i> sp. No 202-1	pululanaza	15
<i>B. stearothermophilus</i>	pululanaza	11
<i>Cytophaga</i> sp.	izoamylaza	16
<i>Escherichia coli</i>	izomylaza	17
<i>E. intermedia</i>	izoamylaza	9
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	pululanaza	18
<i>Ps.</i> sp. SB 15	izoamylaza	19, 21
<i>Ps. amyloclavata</i> SB 15	izoamylaza	38
<i>Ps. deramasa</i> SB 15	izoamylaza	20
<i>Ps. stutzeri</i>	pululanaza	22
<i>Streptococcus mitis</i>	pululanaza	23
<i>Streptomyces</i> sp. No 28	izoamylaza	24
<i>Str.</i> sp. No 280	pululanaza	25
<i>Thermus aquaticus</i> YT 1	pululanaza	26

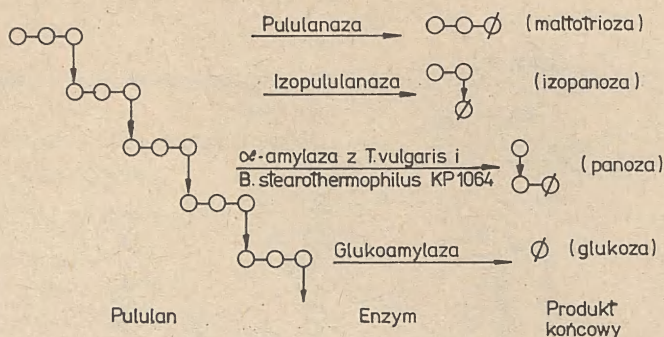
degradacji dekstryna musi zostać zmodyfikowana przez działanie 4- α -D-glukanotransferazy (enzymu przenoszącego reszty maltotriozy na pozycję 1,4- α innego łańcucha). W tak zmodyfikowanej dekstrynie zostają odsłonięte pojedyncze jednostki glukozydowe, na które może bez przeszkód działać amylo-1,6-glukozydaza (rys. 1). Podobny sposób działania amylo-1,6-glukozydazy izolowanej z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przedstawili Lee i Carther [4]. Najmniejszym substratem, który może hydrolizować amylo-1,6-glukozydaza jest rozgałęziony pentasacharyd 6^s- α -glukozylomaltotetraoza [32].



Rys. 1. Działanie amylo-1,6 glukozydazy na glikogen [30]

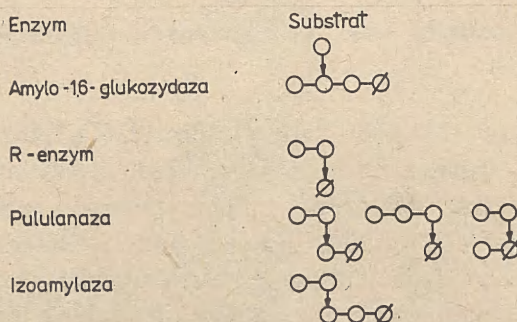
— Do drugiej grupy Norman zaliczył mikrobiologiczne i roślinne pululanazy (R — enzym izolowany ze słodu jęczmienia) EC 3.2.1.41 (6-glukanohydrolazy dekstryny)*. Specyficznym substratem dla tej grupy enzymów jest pululan: liniowy polimer składający się zasadniczo z maltotriozywych jednostek połączonych wiązaniem α -1,6, produkowany pozakomórkowo przez szczep *Pullularia pullulans* (*Aureobasidium pullulans*) (rys. 2). Dokładniejsze badania struktury pululanu przez Catleya i in. [36, 37] oraz Taguchi i in. [35] wykazały obecność jednostek maltotetraozowych w ilości nie większej jak 7%.

Bakteryjna i roślinna pululanaza hydrolizuje w pululanie wewnętrzne łańcuchowe wiązania α -1,6 uwalniając cząsteczki maltotriozy oraz serię maltotriozyłowych oligosacharydów, ale tylko w początkowym etapie reakcji. Końcowym produktem hydrolizy jest maltotrioza. Najmniejszym substratem hydrolizowanym przez pululanazę są tetrasacharydy (rys. 3). Aktywność enzymatyczna pululanazy uzależniona jest od obecności w substracie wiązań α -1,4, łączących co najmniej dwie jednostki glukozydowe [4, 38]. Do grupy tej zaliczono również izopululanazę EC 3.2.1.54 (pululan-4-glukanohydrolazę) hy-



Rys. 2. Działanie enzymów hydrolizujących pululan

drolizującą wiązania α -1,4 glukozydowe w pululanie w pobliżu wiązań α -1,6 i uwalniającą w końcowym etapie reakcji izopanozę. Należy tu także α -amylaza izolowana z *Thermoactinomyces vulgaris* [33] i *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 [42] atakująca wiązania α -1,4 i hydrolizująca pululan do panozy.

Rys. 3. Najmniejsze substraty hydrolizowane przez enzymy odcinające wiązania α -1,6 glukozydowe [30]

— Trzecią grupę stanowią izoamylazy EC 3.2.1.68 (6-glukanohydrolazy glikogenu)*. Ta grupa enzymów hydrolizuje wszystkie α -1,6-międzyłańcuchowe wiązania w glikogenie i amylopektynie, a nie działa [19, 21] lub działa tylko w ograniczonym stopniu [34] na pululan. Izoamylazy są bardziej aktywne w stosunku do glikogenu niż do amylopektyny, a więc są bardziej specyficzne do krótszych łańcuchów. Najmniejszym substratem degradowanym przez izoamylazy jest penta-sacharyd 6³-O- α -maltozylomaltoza. Obecność co najmniej trzech reszt α -D-glukozy w łańcuchu B lub C substratu jest konieczna do ujawnienia aktywności tego enzymu [7].

WŁAŚCIWOŚCI

Manners i in. [39] zwracają uwagę na to, że właściwe umiejscowienie wiązań α -1,6 w substracie jest ważnym czynnikiem wpływającym na aktywność enzymatyczną wszystkich enzymów hydrolizujących wiązania α -1,6 glukozydowe.

Nelson i in. [40] oraz Kainuma i in. [7] porównywali działanie pululanazy z *Klebsiella pneumoniae* i izoamylazy z *Pseudomonas amyloclavata* na różne rodzaje substratów (tab. 2).

Tabela 2
Działanie pululanazy i izoamylazy na różne rodzaje substratów

Substrat	Względny stopień hydrolizy, %	
	izoamylaza	pululanaza
Pululan	b. niski	100,00
Amylopektyna	100,00	15,00
β Graniczne dekstryny amylopektyny	80,30	56,90
Glikogen z ostryg	124,00	1,00
β Graniczne dekstryny glikogenu z ostryg	214,00	10,20
6 ³ -O- α -Maltozylomaltotrioza	2,80	22,00
6 ³ -O- α -Maltotriczylomaltotrioza	9,70	162,00
6 ³ -O- α -Maltotriczylomaltotetraza	33,00	146,00
6 ³ -O- α -Maltozylomaltotrioza lub		
6 ² -O- α -Maltotriczylomaltoza	0	8,60
6 ³ -O- α -Maltozylomaltotetraza	6,90	43,00

Pululanaza z *K. pneumoniae* wykazuje dużą aktywność w stosunku do: pululanu, 6³-O- α -maltotriczylomaltotriozy i 6³-O- α -maltotriczylomaltotetraozy, a nieznaczną w stosunku do glikogenu. Natomiast izoamylaza z *Ps. amyloclavata* największą aktywność wykazuje w stosunku do amylopektyny i glikogenu. Jest regułą, że pululanazy izolowane z różnych mikroorganizmów, np. z *Aerobacter aerogenes* [41], *B. macerans* [14], *B. cereus* var. *mycoides* [13], *Streptomyces* sp. No 280 [25] itp. (z wyjątkiem pululanazy izolowanej z *B. polymyxa* i *B. sp.* 202-1 [15]) wykazują słabe powinowactwo do glikogenu, a dużą aktywność w stosunku do pululanu. Amylopektyna jest hydrolizowana przez ten enzym z różną intensywnością w zależności od mikroorganizmu, z którego enzym izolowano. Adams i Priest [14] zaobserwowali, że pululanaza izolowana z *B. macerans* tylko w niewielkim stopniu degradowała amylopektynę i glikogen, natomiast β -graniczne dekstryny glikogenu i amylo-

pektyny hydrolizowane są przez ten enzym prawie całkowicie. Autorzy sugerują, że większe rozgałęzienia ograniczają dostęp enzymu do substratu. Natomiast izoamylaza z *Pseudomonas* sp. SB 15 [21], *Cytophaga* sp. [16], *B. amyloliquefaciens* [12] itp. hydrolizuje wiązania α -1,6-glukozydowe w glikogenie i amylopektynie, a nie działa na pululan. β -graniczne dekstryny glikogenu i amylopektyny hydrolizowane są przez ten enzym tylko w nieznacznym stopniu.

Niektóre właściwości enzymów hydrolizujących wiązania α -1,6-glukozydowe przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Niektóre właściwości enzymów hydrolizujących wiązania α -1,6 glukozydowe

Mikroorganizm	Optimum		pH stabilność	Ciężar cząstecz- kowy kDa	Oдноśnik do literatury
	pH	temp. [°C]			
Pululanaza:					
<i>Aerobacter aerogenes</i>	5,0-6,0	47,5-55,0	5,0-11,5	56-145	8, 43, 44, 45
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	6,0-6,5	50	7,0-8,7	110	13
	4,5-5,0	60	4,5-6,0	—	46
<i>B. polymyxa</i>	6,0-7,0	45	5,5-7,0	48	
<i>B. sp.</i> 202-1	8,5-9,0	55	6,5-11,0	92	15
<i>Esterichia intermedia</i>	5,5	45	—	—	43
<i>Streptomyces</i> sp. No 280	5,0-6,0	50	—	—	25
<i>Streptococcus mitis</i>	5,5-5,8	30	—	—	23
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	6,4	80-100	6,2-6,7	80-83	26
Izoamylaza					
<i>Cytophaga</i> sp.	5,5	40	—	120	16
<i>E. coli</i>	5,6-6,4	45-50	—	—	17
<i>E. intermedia</i>	6,0	47	—	—	9
<i>Pseudomonas</i> sp. SB 15	3,0-4,0	52	3,5-5,5	94	19, 21, 43
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,0	25	—	—	47
<i>Streptomyces</i> sp. No 28	5,0	60	5,5-7,5	—	24

Optimum pH dla działania pululanaz mieści się w granicach 4,5-7,0 z wyjątkiem pululanazy produkowanej przez *Bacillus* sp. 202-1, której optimum pH zawarte jest między 8,5 a 9,0 [15].

Oprócz *S. mitis* [23] i *Thermus aquaticus* YT-1 [26] pululanazy mają optimum temperatury w granicach 45-55°C. Pululanaza *S. mitis* ma optimum temp. 30°C, natomiast dla pululanazy izolowanej z *Thermus aquaticus* YT-1 zawarte jest między 80-100°C [26]. Ciężar cząsteczkowy badanych pululanaz szacowano, w zależności od stosowanej metody i rodzaju enzymu (pozakomórkowy, wewnątrzkomórkowy), od 48 do 145 kDa.

Optimum pH izoamylaz mieści się w granicach 5,0-6,4, z wyjątkiem izoamylazy *Pseudomonas* sp. SB-15, która wykazuje najwyższą aktywność enzymatyczną w pH pomiędzy 3,0 a 4,0 [19, 21, 43]. Optimum temp. izoamylaz zawarte jest między 40 i 52°C, z wyjątkiem izoamylazy *Saccharomyces cerevisiae*, która wykazuje maksymalną aktywność w temp. 25°C i izoamylazy *Streptomyces* sp. No 28, której opt. temp. wynosi 60°C. Izoamylazy są stabilne w zakresie pH 3,5-7,5.

GLUKOAMYLAZA

Omawiając grupę enzymów hydrolizujących wiązania α -1,6 glukozydowe nie sposób ominąć glukoamylazy EC 3.2.1.3 (1-4- α -D-glukohydrolazy glukanu)* enzymu rozcinającego wiązania α -1,4 od nieredukującego końca łańcucha w: amylozie, amylopektynie, pululanie i glikogenie. Glukoamylazy mogą katalizować także rozkład wiązań α -1,6, oraz wiązań α -1,3 [57]. W efekcie działania tego enzymu na w/w substraty powstają cząsteczki glukozy. Glukoamylaza hydrolizuje wielocukrowce z większą szybkością gdy ostatnia reszta glukozaowa połączona jest z pozostałą częścią wielocukrowca wiązaniem α -1,4. I tak wiązanie α -1,4 w maltozie ulega hydrolizie ok. 15 razy szybciej niż wiązanie α -1,3 nigerozy i 28 razy szybciej niż wiązanie α -1,6 izomaltozy. Ponieważ glukoamylaza odszczepia stopniowo od łańcuchów wielocukrowca po jednej cząsteczce glukozy, zatem długość łańcuchów maleje powoli i duża lepkość roztworu utrzymuje się przez długi czas. Glukoamylaza działa szybciej na skrobię rozpuszczoną i częściowo zdegradowaną do dekstryn i oligosacharydów o przeciętnej redukcijności 8-12 DE (DE — równoważnik glukozy), a jeszcze lepiej gdy redukcyjność wynosi ok. 25 DE.

Fleming [58] podzielił glukoamylazy na 2 grupy:

- Do pierwszej grupy zaliczył enzymy hydrolizujące całkowicie skrobię i β -graniczne dekstryny do glukozy.
- Do drugiej grupy te enzymy, które hydrolizują skrobię tylko w 80%, a β -graniczne dekstryny w 40%.

Panoza i α -graniczne dekstryny są całkowicie rozkładane przez obie grupy enzymów. Fleming zwraca uwagę, że efektywność hydrolizy wielocukrów przy udziale glukoamylazy jest zależna od ciężaru cząsteczkowego i struktury substratu. I tak szybkość hydrolizy uzależniona jest od pozycji wiązań α -1,6 w substracie, np. początkowa szybkość hydrolizy maltotriozy, 6- α -maltozyloglukozy i 3- α -maltozyloglukozy wynosi odpowiednio 360, 260 i 140 [59].

Glukoamylazy są enzymami spotykanymi głównie u grzybów (tab. 4). Enzymy te występują również w organizmach zwierzęcych: w wątrobie, w mięśniach, w sercu itp.

Tabela 4

Niektóre właściwości glukoamylaz

Mikroorganizm	Optimum pH	Optimum temp. [°C]	pH stabilność	Stabilność temp. [°C]	Ciężar cząsteczkowy, kDa	Hydrolyza skrobi, %	Odnosnik do literatury
<i>Aspergillus awamori</i>	4,5	60	5,0-9,0	< 50	83,7-88,0	90	64
<i>A. awamori</i> var. <i>kawachi</i> : I, II	—	—	3,5-7,0	< 60	90	85-100	65, 62
<i>A. niger</i> I	4,5-5,0	—	—	< 60	99	95	66
II	4,5-5,0	—	—	< 60	112	—	67
<i>A. oryzae</i> I	4,5	60	4,0-7,0	< 40	76	—	—
II	4,5	50	4,0-7,0	< 40	38	—	—
III	4,5	40	4,0-7,0	< 40	38	—	—
<i>Cephalosporium charticola</i> Lindau	5,4	60	—	—	69	—	68
<i>Endomycopsis capsularis</i>	4,5	40-50	4,2-8,0	—	—	—	69
<i>Humicola lanuginosa</i> I	4,9	—	—	—	—	—	70
II	6,6	65-70	5,0-10,0	< 50	—	100	71
<i>Mucor rouxianus</i> I	4,6	55	4,0-8,0	< 50	59	100	72
II	5,0	55	4,0-7,5	< 50	49	100	73
<i>Penicillium oxalicum</i> I	5,0	55-60	3,0-6,5	< 55	84	88,5	74
II	4,5	60	3,0-6,5	< 55	86	91,6	75
<i>Piricularia oryzae</i>	6,5	50-55	5,5-7,0	< 40	94	99,0	76
<i>Rhizopus delemar</i>	4,5	40	4,5-6,3	—	100	95,0	77, 78

W warunkach naturalnych glukoamylaza działa na skrobię w sposób ograniczony [60]. Zaobserwowano [61, 62], że amyloza jest czynnikiem ograniczającym hydrolizę skrobi przez glukoamylazę. Sposób degradacji ziaren zbożowej i kukurydzianej skrobi przy użyciu glukoamylazy I i II z *A. niger* oraz enzymu izolowanego z *R. niveus* przedstawili w swojej pracy Smith i Lineback [63]. Niektóre właściwości glukoamylaz izolowanych z różnych rodzajów grzybów przedstawiono w tabeli 4.

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA ENZYMÓW HYDROLIZUJĄCYCH WIĄZANIA α -1,6 GLUKOZYDOWE

Zainteresowanie grupą enzymów rozkładających wiązania α -1,6 glukozydowe wzrosło w momencie zastosowania pululanazy w badaniach struktury amylopektyny i glikogenu [55, 56]. Obecnie enzymy znoszące rozgałęzienia w skrobi takie jak: pululanaza, izoamylaza i glukoamylaza znalazły zastosowanie w przemysłowej produkcji syropów o dużym stężeniu glukozy i maltozy [30, 46, 48, 49, 50, 51] oraz w produkcji krystalicznej glukozy, maltozy i maltotriozy ze skrobi [43, 52, 53]. W przyszłości znajdują one zastosowanie w produkcji małokalorycznego piwa (piwa o małej zawartości niefermentowalnych cukrów) [54].

Większość skrobi o znaczeniu przemysłowym zawiera 14-25% amylozy i 75-80% amylopektyny [49] (tabela 5). Amylopektyny są rozgałęzionymi polisacharydami zawierającymi liniowy łańcuch zbudowany z członów α -1,4 D-glukozy połączony z α -1,6 glukozydowymi wiązaniami. Rozgałęzione końce zawierają 20-25% D-glukozowych jednostek, tak więc amylopektyny zawierają 4-5% wiązań α -1,6 glukozydowych [46]. W przemyśle skrobiowym skrobia przetwarzana jest do cukrów (glukozy, maltozy), dekstryn lub syropów (glukozowych, maltozowych) na drodze hydrolizy: kwasowej, kwasowo-enzymatycznej lub enzymatycznej. Uzyskiwane hydrolizaty są wykorzystywane jako źródło węgla w procesach fermentacyjnych lub, ze względu na swe właściwości fizyczne, są stosowane jako środek słodzący w wielu produktach spożywczych i piwowskich.

Enzymatyczna degradacja skrobi dzięki swym zaletom (duża specyficzność i wydajność oraz mniejsza zawartość produktów ubocznych) coraz skuteczniej wypiera hydrolizę kwasową. Gdy na skrobię działamy α -amylazą, frakcja amylopektyn jest degradowana tylko częściowo. Punkty rozgałęzione zawierające wiązania α -1,6 glukozydowe są odporne na działanie α -amylazy, a ich obecność uniemożliwia hydrolizę sąsiednich wiązań α -1,4. Przedłużone działanie α -amylozy na amylopektynę

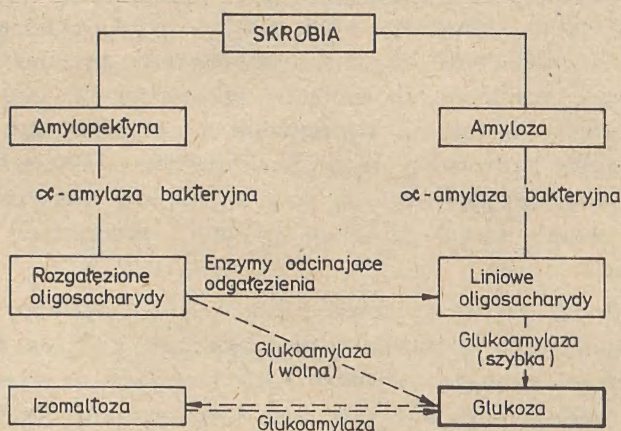
Tabela 5

Zawartość amylozy i amylopektyny w różnych rodzajach skrobi

Surowiec	% Zawartość	
	amylopektyny	amylozy
Kukurydza	79-72	21-28
Woskowa kukurydza	99	1
Ziemiak	82-77	18-23
Pszenica	81-75	19-25
Jęczmień	81-78	19-22
Ryż	86-81	14-19
Tapioka	83-81	17-19

powoduje powstawanie α -granicznych dekstryn, które nie ulegają dalszej degradacji. Natomiast gdy na amylopektynę działamy β -amylazą hydroliza całkowicie ustaje, gdy zostanie osiągnięty punkt rozgałęziony powstają β -graniczne dekstryny. Glukoamylazy mogą hydrolizować wiązania α -1,6 glukozydowe w amylopektynie, ale czas reakcji jest bardzo długi [79].

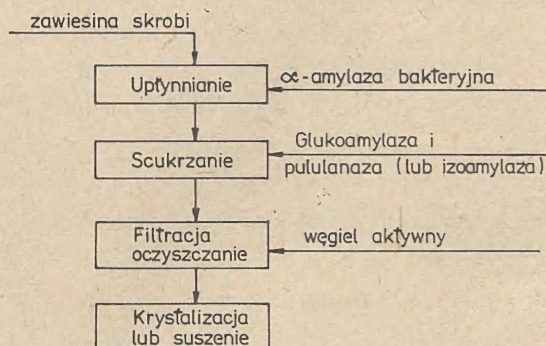
Łączne zastosowanie dwóch enzymów: glukoamylazy i pululanazy (albo izoamylazy) lub β -amylazy i enzymu odcinającego odgałęzienia zwiększa wydajność hydrolizy i znacznie skraca jej czas. Stosowanie różnych kombinacji enzymatycznych pozwala uzyskiwać szereg dokładnie zdefiniowanych chemicznie produktów o określonych właściwościach fizycznych. Pululanaza i izoamylaza zostały wykorzystane w przemysłowej produkcji glukozy (rys. 4) [30] i maltozy ze skrobi.



Rys. 4. Enzymatyczna konwersja skrobi do glukozy

PRODUKCJA SYRÓPÓW O DUŻYM STĘŻENIU GLUKOZY
I KRYSTALICZNEJ D-GLUKOZY

W procesie produkcji krystalicznej D-glukozy ze skrobi (rys. 5) stosuje się bakteryjną α -amylazę do otrzymywania zmodyfikowanej skrobi o małej wartości DE oraz do produkcji szeregu maltodekstryn o określonej redukcji.



Rys. 5. Schemat produkcji krystalicznej D-glukozy ze skrobi

Łączne zastosowanie dwu enzymów: glukoamylazy i pululanazy (lub izoamylazy) w procesie scukrzania skrobi do glukozy skraca czas hydrolyzy z 72-96 do 30-40 godzin, co czyni proces bardziej ekonomicznym i zmniejsza ryzyko niepożądanych infekcji. Stężenie substratu może zostać zwiększone z 32 do 40% s.m., co daje oszczędności energetyczne w procesie zatężania. Łączne zastosowanie glukoamylazy i enzymów odcinających odgałęzienia pozwala też zmniejszyć ilość użytej glukoamylazy o ok. 50%, co zapobiega niepożądanym polimeryzacji D-glukozy do izomaltozy i w efekcie końcowym daje wzrost poziomu D-glukozy o 0,5-2,0%. Syropy o dużym stężeniu glukozy są produktem wyjściowym do otrzymywania krystalicznej D-glukozy, jak również do produkcji syropów o dużej zawartości fruktozy HFCS (high-fructose corn syrups) lub krystalicznej fruktozy, która jest ok. 40% słodszy cukrem od sacharozy. W celu uzyskania syropów fruktozowych syropy o dużym stężeniu glukozy poddaje się działaniu izomerazy glukozy. Enzym ten o nazwie handlowej Sweetzyme produkowany jest w skali przemysłowej przez duńską firmę NOVO Industri A/S. W Stanach Zjednoczonych w ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się ciągły wzrost produkcji syropów o dużym stężeniu fruktozy, podczas gdy produkcja glukozy i syropów o dużym stężeniu glukozy utrzymywana jest na prawie stałym poziomie.

PRODUKCJA SYROPÓW O DUŻYM STĘŻENIU MALTOZY
I KRYSTALICZNEJ MALTOZY

Obecnie obserwujemy na świecie, a w szczególności w Japonii, zwiększone zainteresowanie otrzymywaniem maltozy i syropów o dużym stężeniu maltozy [52]. W 1978 roku wielkość produkcji maltozy i syropów o dużym stężeniu maltozy w Japonii wynosiła około 20 tysięcy ton, a w Stanach Zjednoczonych w 1985 roku produkcja tych syropów wynosiła 4 miliony ton [81]. Maltoza dzięki zaletom smakowym, małej higroskopijności, ciepłostabilności i małej lepkości w roztworze coraz częściej wypiera stosowaną dotychczas w wielu gałęziach przemysłu glukozę i sacharozę.

Produkcją maltozy zainteresowany jest:

- przemysł farmaceutyczny (maltoza może być użyta do iniekcji dożylnych u diabetyków, ...),
- przemysł cukierniczy (maltozę stosuje się do wyrobu cukierków, ciast itp.),
- przemysł piwowski (w produkcji małokalorycznego piwa),
- przemysł owocowo-warzywny (syropy o wysokim stężeniu maltozy są szczególnie przydatne w produkcji kandyzowanych owoców, galaretek, dżemów, ...).

Syropy o dużym stężeniu maltozy w sposób konwencjonalny otrzymuje się z upłynnionej skrobi przez działanie β -amylazy (pochodzenia roślinnego — z soi, lub mikrobiologicznego, np. z *B. cereus* var. *mycoides*). Jednostki maltozowe uwalniane są stopniowo z zewnętrznej gałęzi łańcucha do momentu osiągnięcia punktu rozgałęzionego (wiązania α -1,6 glukozydowego), po czym hydroliza enzymatyczna ustaje i powstają β -graniczne dekstryny. Maksymalna ilość maltozy, którą można uzyskać ze skrobi tą metodą, wynosi 60% [46].

Jednoczesne zastosowanie dwu enzymów: β -amylazy i pululanazy (lub izoamylazy) zwiększa wydajność do 80-88% [43]. Obecnie w skali przemysłowej enzymy odcinające odgałęzienia w skrobi (hydrolizujące wiązania α -1,6 glukozydowe) produkują na świecie takie firmy, jak NOVO Industri A/S (Promozyme, DBG, AMG), ABM Chemicals Ltd. i inne.

W Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej opracowano technologię produkcji ciepłostajłej α -amylazy („Amylogalu”) i wdrożono w ZPOW „Pektowin” w Jaśle. Obecnie w tymże Instytucie prowadzi się badania nad otrzymywaniem enzymów hydrolizujących wiązania rozgałęziające w skrobi. Wyodrębniono szczep *Aerobacter aerogenes* G nagromadzający pozakomórkowo duże ilości pululanazy [82]. Enzym ten jest wytwarzany w skali wielkolaboratoryjnej; określa się

jego właściwości katalityczne i przydatność w transformacjach skrobi, pululanu i innych polisacharydów. Przewiduje się jego zastosowanie w przemyśle skrobiowym zwłaszcza w tych procesach, w których zachodzi konieczność znoszenia rozgałęzień w amylopektynie i pokrewnych oligo- i polisacharydach.

LITERATURA

1. Marno B., Kobayashi T. — *Nature* 167: 606, 1951.
2. Hobson P. N., Whelan W. J., Peat S. — *J. Chem. Soc.* 1451, 1951.
3. Manners D. J., Rowe K. L. — *Arch. Biochem. Biophys.* 119: 585, 1967.
4. Lee E. Y. C., Carther J. H. i in. — *Biochemistry* 9: 2347-55, 1970.
5. Abdullah M., Catley B. J., Lee E. Y., Robyt J., Wallenfels K., Whelan W. J. — *Cereal Chemistry* 43: 111, 1966.
6. Bender H., Wallenfels K. — *Biochemische Zeitschrift* 334: 79, 1961.
7. Kainuma K., Kobayashi S., Harada T. — *Carbohydrate Research* 61: 345, 1978.
8. Ohba R., Ueda S. — *Agr. Biol. Chem.* 37: 2821, 1973.
9. Ueda S., Nauri N. — *Appl. Microbiol.* 15: 492, 1967.
10. Wöber G. — *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3: 71, 1967.
11. Morgan F. J., Adams K. R., Priest F. G. — *J. Appl. Bacteriol.* 46: 291, 1979.
12. Urlaub H., Wöber G. — *FEBS Lett.* 51: 1, 1975.
13. Takasaki Y. — *Agr. Biol. Chem.* 40: 1523, 1976.
14. Adams K. R., Priest F. G. — *FEMS Microbiol. Lett.* 1: 269, 1977.
15. Nakamura N., Watanabe K., Morikoshi K. — *Biochim. Biophys. Acta* 398: 188, 1975.
16. Gunja-Smith Z., Marshall J. J., Smith E. E., Whelan W. J. — *FEBS Lett.* 12: 96, 1970.
17. Jeanningros R., Creuzet-Sigal N., Frixon C., Cattaneo J. — *Biochim. Biophys. Acta* 483: 186, 1976.
18. Norman J., Wöber G. — *Arch. Microbiol.* 12: 253, 1975.
19. Harada T., Yokobayashi K., Misaki A. — *Appl. Microbiol.* 16: 1439, 1968.
20. Kuswanto K. P., Kato K., Amemura A., Harada T. — *J. Ferment. Technol.* 54: 192, 1976.
21. Yokobayashi K., Misaki A., Harada T. — *Biochem. Biophys. Acta* 212: 458, 1970.
22. Wöber G. — *Hoppe Seyler's Zeit. Physiol. Chem.* 345: 75, 1973.
23. Walker G. T. — *Biochem. J.* 108: 33, 1968.
24. Ueda S., Jagisawa M., Sato Y. — *J. Ferment. Technol.* 49, 6: 552, 1971.
25. Yogisawa M., Kato K., Koba Y., Ueda S. — *J. Ferment. Technol.* 50: 572, 1972.
26. Plant A. R., Morgan H. W., Daniel R. M. — *Enzyme Microb. Technol.* t. 8, Listopad: 668, 1986.
27. Sakano Y., Higuchi M., Kobayashi T. — *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 180, 1972.
28. Tago M., Aoji M. i in. — *Agric. Biol. Chem.* 41: 909, 1977.

29. Allen W. G., Dawson H. G. — *Food Technology* 5: 70, 1975.
30. Norman B. E. — W: *Enzymes and food processing*. G. G. Birch, N. Blakenbrough i K. J. Parker (red.), Appl. Sci. London, 1981.
31. Brown D., Brown B. I. — W: *Methods in enzymology*. t. 8, E. F. Neufield, V. Ginsburg (red.), Academic Press, New York, 1966.
32. Uingworth B. I., Brown D. H. — *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48: 1619, 1962.
33. Shimizu M., Kanno M. in. — *Agric. Biol. Chem.* 41: 909, 1978.
34. Yokobayashi K., Akai M., Sugimoto T., Hairao M., Sugimoto K., Harada T. — *Biochim. Biophys. Acta* 293: 197, 1973.
35. Taguchi R., Kikuchi Y., Sakano Y., Kobayashi T. — *Agr. Biol. Chem.* 37,7: 1583, 1973.
36. Catley B. J., Whelan W. J. — *Arch. Biochem. Biophys.* 143: 138, 1971.
38. Abdullah M., French D. — *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 483, 1970.
39. Manners D. J. — *Nature New. Biol.* 234: 150, 1971.
40. Nelson T. E. — *Chem. Eng. News*, Wrzesień, 12: 1977.
41. Lee E. Y. C., Whelan W. J., Boyer P. D. (red.) — *The enzymes*. Wyd. 3, t. 5, Academic Press, New York, 1971.
42. Suzuki Y., Imai T. — *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 20, 1985.
43. Takasaki Y., Yamanobe Y. — W: *Enzymes and food processing*. G. G. Birch, N. Blakenbrough i K. J. Parker (red.), Appl. Sci. London, 1981.
44. Marcier C., Frantz B. M., Whelan W. J. — *Eur. J. Biochem.* 26: 1, 1972.
45. Ueda S., Ohba R. — *Agr. Biol. Chem.* 36: 2381, 1972.
46. Jensen B. F., Norman B. — *Process Biochemistry*, Sierpień: 129, 1984.
47. Gunja Z. H., Manners D. J., Maung K. — *Biochem. J.* 81: 392, 1961.
48. Whelan W. J. — *Biochem. J.* 122: 609, 1971.
49. Howling D. — W: *Sugar science and technology*. G. G. Birch i K. J. Parker (red.), Appl. Sci. 262, 1978.
50. Tegge G., Richter G. — *Starch/Stärke* 38,2: 61, 1986.
51. Słonimska L., Maczyński M. — *Starch/Stärke* 11, 8: 386, 1985.
52. Maeda H., Tsao G. T. — *Process Biochemistry*, Lipiec, 2, 1979.
53. Ohba R., Ueda S. — *Biotechnology Bioengin.* t. XXII, str. 2137, 1980.
54. Pommer K. — *Inst. of Browing, Australia Proceedings*, 85, 1982.
55. Marshal J. J. — *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 257, 1974.
56. Enevoldsen B. S. — *J. Inst. Brew.* 76: 546, 1970.
57. Pazur J. H., Kleppe K. — *J. Biol. Chem.* 237: 1002, 1962.
58. Fleming I. D., Radley J. A. — *Starch and its derivatives*. Wyd. 4, Chapman and Hall Ltd., London 16: 498, 1968.
59. Abdullah M., Fleming I. D., Taylor P. M., Whelan W. J. — *Biochem. J.* 89: 359, 1963.
60. Manners D. J. — *Biochem. J.* 123: 1P, 1971.
61. Ueda S., Kano S. — *Die Stärke* 27: 123, 1975.
62. Ueda S., Ohba R., Kano S. — *Die Stärke* 26: 374, 1974.
63. Smith J. S., Lineback D. R. — *Die Stärke* 28: 243, 1976.
64. Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 41: 2149, 1977.
65. Hayashida S., Nomura T., Yoshino E., Hongo M. — *Agr. Biol. Chem.* 40: 141, 1976.
66. Lineback D. R., Russell I. J., Rasmussen C. — *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 539, 1969.
67. Pazur J. H., Ando T. — *J. Biol. Chem.* 234: 1966, 1959.

68. Miah M. N. N., Ueda S. — *Die Stärke* 29, 191: 235, 1977.
69. Krzechowski M., Urbanek M. — *Appl. Microbiol.* 30: 163, 1975.
70. Ebertova H. — *Folia Microbiol.* 11: 422, 1966.
71. Taylor P. M., Napier E. J., Fleming I. D. — *Carbohydr. Res.* 61: 301, 1978.
72. Tsuboi A., Yamasaki Y., Suzuki Y. — *Agr. Biol. Chem.* 38: 543, 1974.
73. Yamasaki Y., Tsuboi A., Suzuki Y. — *Agr. Biol. Chem.* 41: 2139, 1977.
74. Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 41: 755, 1977.
75. Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. — *Agr. Biol. Chem.* 41: 1443, 1977.
76. Yuhki A., Watanabe T., Matsuda K. — *Die Stärke* 29: 265, 1977.
77. Pazur J. H., Okada S. — *Carbohydr. Res.* 4: 371, 1967.
78. Philips L. L., Cadwell M. L. — *J. Amer. Chem. Soc.* 73: 3559, 3563, 1951.
79. Pazur J. H., Ando T. — *J. Biol. Chem.* 235: 297, 1960.
80. Zittan L., Ponlsen P. B., Hemmirigsen S. H. — *Die Stärke* 27: 236, 1975.
81. *Novo's handbook of practical biotechnology*. C. O. L. Boyce, Ph. D. (red.), Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark, 1986.
82. Galas E., Bobowicz-Lassocińska T. — IXth International Symposium on Continuous Culture in Biotechnology, Lipiec 19-24, Hradec Kralove, Czechoslovakia, 1987.
83. Martensson K., Mosbach K. — *Biotechnol. Bioengin. t. XIV*, str. 715, 1972.
84. Ohba R., Ueda S. — *Biotechnol. Bioengin. t. XXII*, str. 2137, 1980.
85. Ohba R., Chean H., Hayashi S., Ueda S. — *Biotechnol. Bioengin. t. XX*, str. 665, 1978.

TADEUSZ ANT CZAK

ALINA KRYSTYNOWICZ

EDWARD GALAS

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

BIOSYNTETA I ZASTOSOWANIE LIPAZ I ESTERAZ W SYNTETYZIE ESTRÓW I TRANSFORMACJI ACYLOGLICEROLI

Jak wiadomo, enzymy przejawiają swoją aktywność w środowisku wodnym. Jednak udowodniono, że można przeprowadzić wydajnie reakcję enzymatyczną w środowisku zawierającym mniej niż 1% wody. Metoda polega na immobilizacji enzymu na nośniku utrzymującym wodę na swej powierzchni w stanie ciekłym, tak, że enzym reaguje w warunkach stosunkowo dużej aktywności wody. Badania te oprócz dużych walorów poznawczych mają również znaczenie dla zastosowania praktycznego lipaz i esteraz jako katalizatorów reakcji estryfikacji. Metodę tę można stosować do otrzymywania różnorodnych estrów kwasów karboksylowych, jak również interestryfikacji tłuszczów w układach, w których składniki są rozpuszczone w rozpuszczalnikach organicznych lub bezpośrednio w stopionych substratach. Nie ma w tym nic zaskakującego, gdy rozpatrzmy potencjalne korzyści, jakie daje przeprowadzenie reakcji biokatalitycznych w mieszaninach rozpuszczalników wodno-organicznych, czysto-organicznych lub bez udziału rozpuszczalników. Należą do nich:

- stosunkowo duża rozpuszczalność wielu związków w rozpuszczalnikach organicznych;
- zdolność odwracania reakcji hydrolitycznych w reakcje syntezy;
- duża specyficzność działania;
- możliwość uniknięcia udziału niepożądanych reakcji ubocznych, jak również hamowania przebiegu reakcji przez substrat lub produkt;
- stosunkowa łatwość odzyskiwania produktu i biokatalizatora z systemów zawierających fazę organiczną;
- mała, w porównaniu z metodami tradycyjnymi, energochłonność procesu.

Z drugiej strony, zastosowanie rozpuszczalników organicznych do syntezy bioorganicznej jest poważnie ograniczone, ponieważ wiele z nich powoduje obniżenie aktywności lub nieodwracalną denaturację enzymów.

BIOSYNTETA LIPAZ I ESTERAZ

Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej z 1961 r. lipazy zdefiniowano jako hydrolazy estrów glicerolowych [1]. Różnią się one od innych enzymów właściwością działania na substraty nierozpuszczalne w wodzie, co decyduje o przebiegu reakcji na powierzchni rozdziału faz z szybkością zależną od wielkości tej powierzchni [2, 3]. Enzymy hydrolizujące estry innych niż glicerol alkoholi zaliczono do esteraz [4]. W świetle aktualnych badań, lipazy oprócz zdolności hydrolizy acylogliceroli mogą wykazywać aktywność w reakcji syntezy różnorodnych estrów kwasów karboksylowych, nie koniecznie glicerydów.

Enzymy lipolityczne nie są poznane w takim stopniu, jak niektóre enzymy przemiany białek i węglowodanów. Dane odnośnie lipaz drobnoustrojowych są często wyrywkowe i przeciwstawne, ponieważ uzyskano je stosując różne substraty o niejednakowym stopniu dyspersji, wykorzystując drobnoustroje rosnące na różnych podłożach hodowlanych, z różnych stadiów wzrostu lub stosując preparaty różniące się stopniem czystości. Charakteryzując więc lipazy drobnoustrojowe, należy mówić o każdej z nich z osobna, w zależności od jej pochodzenia. Większość drobnoustrojowych producentów lipaz należy do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida*. Całokształt badań obejmuje: selekcję wysokoaktywnych szczepów, optymalizację podłoża hodowlanego i warunków hodowli, otrzymanie preparatów enzymatycznych o wymaganym stopniu czystości i określenie ich właściwości. Istotnym warunkiem decydującym o wyizolowaniu szczepów o dużej wydajności jest określenie zależności aktywności od rodzaju substratu i emulgatora. Okazało się bowiem, że np. rozpowszechniona metoda oznaczania aktywności z wykorzystaniem emulsji oleju oliwkowego w alkoholu poliwinylowym nie zawsze pozwala na ujawnienie aktywności szczepów [5, 6]. Zdolność mikroorganizmów do produkcji lipazy, jak i właściwości enzymu zależą w dużym stopniu od składu podłoża hodowlanego. W wielu pracach podkreśla się istotny wpływ tłuszczowców na poziom aktywności lipazy, np.: mąki sojowej, ekstraktu sojowego i innych [5, 7, 8, 9, 10]. Stwierdzono, że te same lipidy dodane do podłoża hodowlanego mogą być inhibitorami lub aktywatorami biosyntezy lipazy w zależności od rodzaju drobnoustroju wytwarzającego enzym. I tak np.: aktywność lipolityczna *Candida parapolitytica*, *Torulopsis ernobu*, *Geotrichum candidum*, *G. asteroides* wzrastała po dodaniu olejów do podłoża hodowlanego. Te same lipidy hamowały produkcję lipazy w hodowli szczepów *Penicillium roqueforti*, *Pseudomonas fragi*. Stwierdzono również, że zdolność do indukowania biosyntezy lipazy zależała nie tylko od rodzaju drobnoustroju i budowy chemicznej samego induk-

tora, ale i od składu podłoża hodowlanego stosowanego do wzrostu szczepów.

O biosyntezie lipaz decydują również warunki aeracji, temperatura i pH podłoża hodowlanego. Lipazy i esterazy w zależności od miejsca nagromadzenia w podłożu hodowlanym możemy podzielić na pozakomórkowe [5, 11, 12, 13] i wewnątrzkomórkowe [2, 3, 5]. W porównaniu z lipazami pozakomórkowymi, lipazy wewnątrzkomórkowe drobnoustrojów poznane są w znacznie mniejszym stopniu ze względu na trudności związane z ich wydzieleniem z komórki.

Dawranow i in. [14, 15, 16] wykazali, że szczep *Ooaspora lactis* jest wysokoaktywnym producentem lipazy oraz, że biosyntezę tego enzymu indukują tłuszcze roślinne i kwasy tłuszczowe. Nagromadzenie lipazy wewnątrz- i pozakomórkowej następuje wraz ze wzrostem i rozwojem grzyba, osiągając maksimum w początkowej fazie wzrostu stacjonarnego. Stwierdzono, iż badany szczep wydziela lipazy o różnych molekularnych formach, z których jedna odpowiada lipazie pozakomórkowej oraz wewnątrzkomórkowej, zlokalizowanej w przestrzeni peryplazmatycznej, druga — lipazie silnie związanej z błoną cytoplazmatyczną.

Wysokowydajny producent lipazy *Rhizopus microsporus* charakteryzuje się również zdolnością biosyntezy kilku molekularnych form tego enzymu [17, 18]. W wyniku wydzielenia i oczyszczenia lipaz poza- i wewnątrzkomórkowych stwierdzono, że badane enzymy są izoenzymami złożonymi z podjednostek A (m.c. 12,5 kDa) i B (m. cz. 15 kDa) w różnym stosunku. Stwierdzono ponadto, że badany szczep wydziela do podłoża 3 lipazy o budowie glikoproteidowej z większą zawartością reszty cukrowej, w porównaniu z izoenzymami lipazy wewnątrzkomórkowej. Wydzielone enzymy różniły się optymalnymi wartościami pH i temperatury.

Lipazy o różnych molekularnych formach wydzielono również z hodowli szczepu *Rh. japonicus*. Miały one jednakową masę cząsteczkową, różne punkty izoelektryczne, zbliżone wartości optymalnego pH i temperatury oraz podobną specyficzność substratową [19]. Jak donoszą Iwai i in. [20, 23], szczep *Rh. delemar* wydziela podczas hodowli trzy formy lipaz: A, B i C. Udział tych form zależy od składu aminokwasowego białkowego surowca zawartego w podłożu. I tak np.: w obecności 7,5% ekstraktu mąki sojowej zwiększał się udział formy B, a zmniejszał formy C. Bardzo zbliżone właściwości oczyszczonych lipaz B i C w porównaniu z lipazą A sugerują, że szczep *Rh. delemar* produkuje tylko dwie lipazy — A i C. Forma B tworzy się z formy C związanej z fosfolipidem, który może być uwolniony w procesie oczyszczania lub uwalniania z komórki.

Szczep *Rh. arrhizus* wydziela do podłoża dwie formy lipaz, z których pierwsza może przekształcać się w drugą w czasie dłuższego przechowywania w temp. 20°C [21]. Zmiana ta spowodowana była odszczepieniem frakcji glikoproteidowej o m.c. 10 kDa. Zdolność do tworzenia kilku molekularnych form lipaz jest również własnością szczepu *Aspergillus niger* [22].

Interesujące wyniki badań lipaz *Penicillium cyclopium* przedstawili Iwai i in. [23]. Stwierdzili oni, że szczep ten wydziela do podłoża lipazy w dwóch formach — A i B. W końcowej fazie hodowli wraz ze wzrostem wartości pH do ok. 8,5 następuje inaktywacja lipazy B, stabilnej w zakresie pH 4,0-6,5. Wydzielone i oczyszczone do homogennej postaci formy A i B różniły się optymalną wartością pH, optymalną temperaturą, punktem izoelektrycznym i masą cząsteczkową. Wyniki badań specyficzności substratowej z wykorzystaniem monoestrów metylo- wych kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha sugerują, że lipaza B charakteryzuje się większą aktywnością esterazową w porównaniu z lipazą A.

Na temat lokalizacji lipaz w komórce opublikowano dotychczas niewiele prac. Wiąże się to między innymi z trudnością dobrania właściwej metody dezintegracji komórek, pozwalającej na uzyskanie informacji o rzeczywistej lokalizacji enzymu w strukturach komórkowych. Najkorzystniejsza do tych celów okazała się łagodna metoda lizy enzymatycznej, chociaż stosowano także mechaniczne metody dezintegracji i traktowanie komórek detergentami. W ten sposób zlokalizowano m.in. lipazę *O. lactis* [14, 15], *Pen. cyclopium* [24], *C. lipolytica* [25, 26], *S. cerevisiae* [27]. W badaniach nad lokalizacją lipazy *O. lactis* wykazano, że około 8% ogólnej aktywności homogenatu grzybni zawarte jest we frakcji membran cytoplazmatycznych, a znaczna część (85-90%) we frakcji peryplazmatycznej [15, 16]. Metodą różnicowego wirowania homogenatu grzybni *P. cyclopium* wykazano, że prawie cała aktywność lipazy zawarta jest w rozpuszczalnej frakcji komórek. Zakładając, że enzym jest związany ze strukturami subkomórkowymi, oddziaływanie to można łatwo naruszyć w czasie dezintegracji komórek i spowodować przejście do frakcji cytoplazmatycznej [24]. Wykazano również, że lipaza *C. lipolytica* związana jest ze ścianą komórkową, *S. cerevisiae* z błoną cytoplazmatyczną, a *C. utilis* głównie ze strukturami subkomórkowymi [25, 27, 28].

Lipazy grzybów nitkowatych pod pewnymi względami poznane zostały znacznie lepiej, niż lipazy bakterii, czy drożdży i znalazły już praktyczne zastosowanie [29]. W tabeli 1 umieszczono niektóre prepa-

Tabela 1

Niektóre lipazy produkowane na skalę przemysłową [29, 30]

Firma	Nazwa handlowa enzymu	Szczep	Aktywność J/g
Meito (Japonia)	Lipase MY	<i>Candida cylindracea</i>	24500
	Lipase OF	<i>C. cylindracea</i>	24200
Amano (Japonia)	Lipase M-AP	<i>Mucor</i> sp.	7300
	Lipase AP	<i>Aspergillus</i> var.	5700
	LP-Amano	<i>Pseudomonas</i>	29600
Novo (Dania)	Lipase Sp	<i>Mucor</i> sp.	3000
	Lipozyme	<i>M. miehei</i>	30000
	Palatase	<i>Rhizopus arrhizus</i>	—

raty lipaz drobnoustrojowych produkowane na skalę przemysłową. Preparaty te w zależności od środowiska reakcji mogą być stosowane do hydrolizy, syntezy lub modyfikacji estrów.

ZASTOSOWANIE LIPAZ DO SYNTEZY ESTRÓW

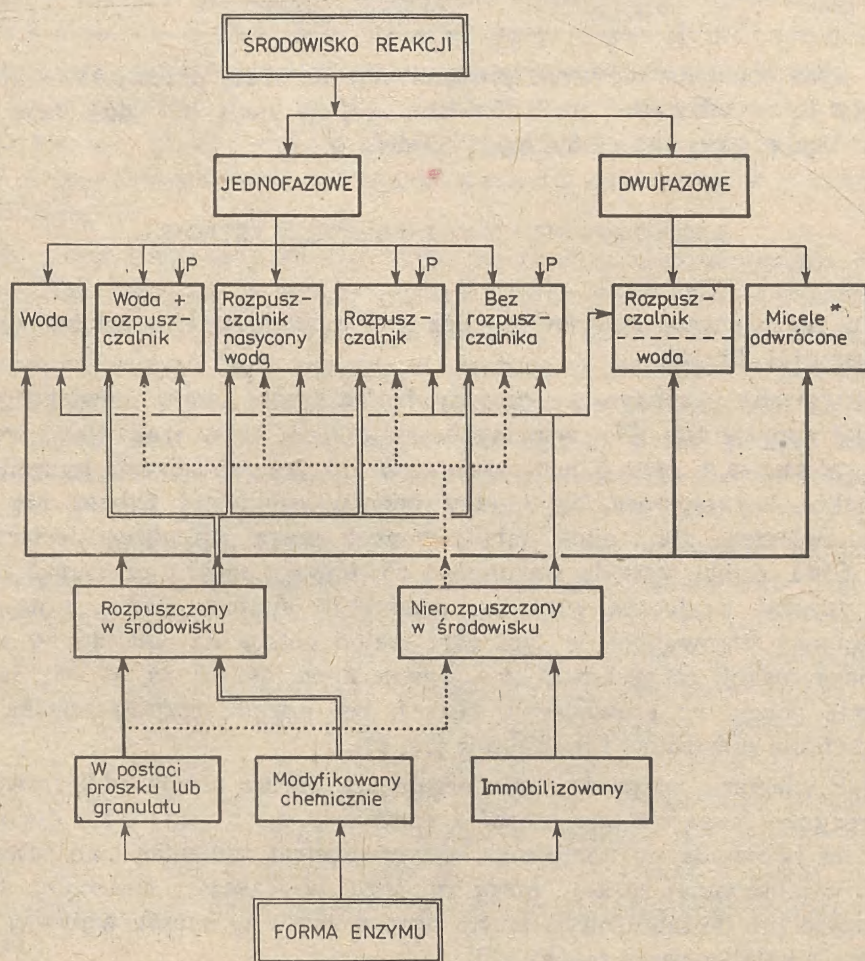
Po raz pierwszy zastosowano lipazy w reakcji syntezy estrów wiele lat temu [31, 32, 33].

Powszechnie uznano, że enzymy hydrolityczne mają niewielki potencjał syntetyczny. W normalnych warunkach, tj. w środowisku wodnym, równowaga reakcji jest przesunięta znacznie na korzyść hydrolizy. Jednakże towarzyszące im zmiany energii swobodnej Gibbsa nie są duże, zwłaszcza dla reakcji katalizowanych przez peptydazy i esterazy [31]. Stąd, dzięki zmianie warunków, równowagę można przesunąć tak, aby uzyskać użyteczną proporcję produktów syntezy. Jedną z najpowszechniej stosowanych w tym celu metod polega na dodaniu do środowiska reakcji rozpuszczalników organicznych [34, 35, 36, 37, 38]. Inna metoda polega na prowadzeniu reakcji bez udziału rozpuszczalnika w mieszaniu substratów i produktów [39, 40].

Jak wiadomo, rozpuszczalniki organiczne bardzo różnie oddziałują na enzymy. Mogą się one wiązać z enzymem specyficznie i nie dopuszczać do tworzenia się kompleksu enzym-substrat, zmieniać stan równowagi katalizowanej reakcji, mogą wchodzić w reakcję z enzymem, stabilizować lub destabilizować enzym oraz w rozmaity sposób wpływać na prędkość katalizowanej reakcji [35].

Powiązania występujące między formą enzymu a środowiskiem reakcji zamieszczono na rys. 1. Każdy z wymienionych systemów wykazuje określone zalety oraz z góry narzuca pewne ograniczenia w zastoso-

sowaniu. Niektóre z nich zostaną omówione w dalszej części artykułu. Metodą enzymatycznej estryfikacji można otrzymywać np.: różne acyloglicerole [39, 40, 42, 43, 44], estry kwasów tłuszczowych i różnych alkoholi [45, 46], estry alkoholi wielowodorotlenowych różnych od glicerolu [45, 47], estry alkoholi terpenowych [48], estry cukrowców [47], poliestry [49], laktony [50, 51, 52, 53]. Uwzględniając rodzaj estryfikacji za pomocą katalizatorów enzymatycznych można przeprowadzić: estryfikację prostą, transestryfikację, estryfikację stereospecyficzną, estryfikację enancjoselektywną, estryfikację wewnątrzcząsteczkową.



Rys. 1. Powiązania między formą enzymu a środowiskiem reakcji, w którym może działać enzym. Pm — możliwość stosowania pochłaniacza wody. * — micele odwrócone są szczególnym przypadkiem układu dwufazowego (objaśnienie w tekście)

W procesie enzymatycznej estryfikacji w środowisku rozpuszczalników organicznych woda spełnia wyjątkową rolę. Jest ona zarówno jednym z produktów reakcji, jak i niezbędnym składnikiem środowiska. W warunkach wodnych cząsteczki enzymu mogą być rozważane jako struktury zawierające powierzchniowe regiony o wysokiej polarności, pozostające w kontakcie z wodą, i wewnątrzcząsteczkowe regiony o stosunkowo małej polarności, odseparowane w dużym stopniu od środowiska wodnego. Gdy polarność rozpuszczalnika jest zmniejszona przez zastąpienie wody rozpuszczalnikiem organicznym, regiony białka o małej polarności wykazują tendencje do rozproszenia w wyniku destabilizacji i dezorganizacji struktury przestrzennej enzymu. Mogą także ulec rozerwaniu niepolarne asocjacje substratu z enzymem [35, 54].

Woda, jako niezbędny składnik środowiska reakcji, jest rozpatrywana jako bardzo cienka warstewka zewnętrzna, stabilizująca aktywność katalityczną enzymu i nazywana warstwą wody niezbędnej [55, 56]. Rozpuszczalniki organiczne odkształcając warstwę wody niezbędnej mogą doprowadzić do denaturacji enzymu.

Które rozpuszczalniki organiczne rzeczywiście hamują biokatalizę i dlaczego? Aby odpowiedzieć na to pytanie próbowano podzielić rozpuszczalniki organiczne na podstawie ich właściwości fizycznych i chemicznych, takich jak: gęstość, lepkość, stała dielektryczna, punkt krzepnięcia, aktywność protono-donorowa, moment dipolowy, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, polaryzowalność, rozpuszczalność w wodzie [35, 54, 56, 57], oraz próbowano znaleźć korelację między nimi a aktywnością enzymu. Próby te nie zakończyły się sukcesem.

Celja Laane i in. [56] przedstawili zasady optymalizacji biokatalizy w rozpuszczalnikach organicznych wykorzystując jako ilościowy miernik polarności rozpuszczalnika logarytm współczynnika polaryzowalności ($\log P$). W pracy swej zamieścili wartości $\log P$ dla 107 najczęściej stosowanych rozpuszczalników w syntezie bioorganicznej. Stwierdzili oni, że: biokataliza przebiega słabo w rozpuszczalnikach organicznych, dla których $\log P < 2$, średnio w rozpuszczalnikach o $\log P$ od 2 do 4 i z dużą wydajnością w rozpuszczalnikach apolarnych o $\log P > 4$. Współzależność między polarnością rozpuszczalnika i aktywnością enzymu wynika ze zdolności rozpuszczalników organicznych do odkształcania struktury warstwy wodnej, niezbędnej do stabilizacji katalizatora. Powyższe uwagi o charakterze ogólnym dotyczą również enzymatycznej reakcji estryfikacji w środowisku rozpuszczalników organicznych.

Laane i in. zrobili analizę wyników Zaksa i Kilibanowa [58], dotyczących reakcji trzech różnych lipaz w różnych, prawie bezwodnych rozpuszczalnikach organicznych. Odkładając na osi rzędnych aktywność enzymu, na osi odciętych wartość $\log P$ rozpuszczalnika, otrzy-

mali sigmoidalny charakter zależności dla reakcji transestryfikacji z udziałem trimaślanu gliceryny i alkoholu heptyłowego katalizowanej przez lipazę drożdżową i pleśniową. Podobna zależność okazała się również prawdziwa dla innych, różnych od lipaz i esteraż enzymów (dehydrogenazy 20 β -hydroksysterolu i oksydazy ksantynowej). Podobną zależność zaobserwowano również dla reakcji syntezy estrów wyższych kwasów tłuszczowych przez lipazy *Mucor javanicus* T45 i *M. racemosus* A37 [59] oraz estryfikacji wewnątrzcząsteczkowej ω -hydroksykwasów z wytworzeniem laktonów o zapachu piżma [60]. Jedynym wyjątkiem, jaki dotychczas znaleziono [56, 58], jest lipaza trzustkowa. Enzym ten zachowywał się zupełnie odmiennie w tym sensie, że funkcjonował w praktycznie wszystkich badanych rozpuszczalnikach ($\log P$ w zakresie $-0,5 - +10$). Autorzy sugerują, że stabilność lipazy trzustkowej we względnie hydrofilowych rozpuszczalnikach spowodowana jest niezdolnością rozpuszczalnika do usunięcia niezbędnej warstwy wodnej wokół enzymu. Widocznie w przypadku drożdżowej i pleśniowej lipazy warstwa niezbędnej wody jest luźniej związana z enzymem. Prawdopodobnie warstwa zewnętrzna lipazy trzustkowej jest bardziej hydrofobowa, niż w przypadku lipaz drożdżowej i pleśniowej i stąd inaczej wiąże warstwę niezbędnej wody. Znaczącą w tym względzie właściwością rozpuszczalników organicznych jest zdolność do modyfikacji wzajemnych oddziaływań, „witalnych lecz delikatnych”, między wodą a enzymem, poprzez przenikanie rozpuszczalnika organicznego do niezbędnej warstwy wody, stabilizującej biokatalizator lub przez usunięcie niezbędnej wody. Orientacyjnym wskaźnikiem aktywności polegającej na odkształcaniu warstwy niezbędnej wody może być maksymalna rozpuszczalność rozpuszczalników organicznych w wodzie.

Dla rozpuszczalników charakteryzujących się $\log P < 2$ rozpuszczalność w wodzie jest większa niż 0,4%. Rozpuszczalniki takie nie są odpowiednie dla układów biokatalitycznych, ponieważ silnie odkształcają oddziaływania warstwy niezbędnej wody z katalizatorem. W przypadku rozpuszczalników o $2 \leq \log P \leq 4$, rozpuszczalność w wodzie zawarta jest w przedziale 0,4-0,04%. Rozpuszczalniki te w małym stopniu zaburzają oddziaływania woda-enzym i mogą wywierać trudny do przewidzenia wpływ na aktywność enzymatyczną. Dla rozpuszczalników wysoce apolarnych ($\log P > 4$) praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie, rozpuszczalność jest mniejsza od 0,04%. Rozpuszczalniki te nie zaburzają warstwy wody niezbędnej, pozostawiając tym samym katalizator w stanie aktywnym.

Zgodnie z powyższym, bardzo ważna jest możliwość precyzyjnego określenia zawartości wody w środowisku reakcji. Ponieważ w środowisku rozpuszczalników organicznych nie zawsze można precyzyjnie wy-

znaczyć stężenie wody, Halling zaproponował zastąpienie stężenia wody łatwo wyznaczalną jej termodynamiczną aktywnością [34].

Wiele preparatów lipaz i esteraz produkowanych na skalę przemysłową, w postaci rozpuszczalnych w wodzie proszków lub granulatów, jak i w nierozpuszczalnej unieruchomionej postaci, znalazło zastosowanie w syntezie estrów.

Obecnie jednym z najczęściej stosowanych preparatów drobnoustrojowych jest lipaza *Candida cylindracea*. Kirchner i in. [61] zastosowali tę lipazę oraz lipazę trzustkową do otrzymywania na drodze estryfikacji i transestryfikacji estrów różnych optycznie czynnych alkoholi alifatycznych i R-chlorowcopochodnych kwasów karboksylowych. Reakcję prowadzono w skali preparatywnej, dodając bezpośrednio do roztworu substratów rozpuszczonych w heksanie preparaty enzymatyczne w postaci suchego pudru. Preparaty enzymatyczne nierozpuszczalne w zastosowanym środowisku miały wysoką wydajność i stereoselektywność reakcji. Użyte preparaty enzymatyczne były produkowane na skalę przemysłową przez firmę Sigma (USA). Ich stosunkowo niska cena oraz możliwość wielokrotnego stosowania umożliwiającą według autorów zastosowanie w skali przemysłowej.

Preparaty lipazy, lipase MY i lipase OF, zastosowano z dużą wydajnością (98%) i enancjoselektywnością do syntezy różnorodnych estrów, np. syntezy 2-metyłowalerianianu prenylu [39], mającego duże zastosowanie w przemyśle owocowo-warzywnym i perfumeryjnym. Preparaty te także zastosowano do enancjoselektywnej estryfikacji dl-mentolu [62, 63], estryfikacji pochodnych α -cykloheksanoli i estryfikacji geraniolu [64].

Innym enzymem produkowanym na skalę przemysłową z przeznaczeniem do transestryfikacji i syntezy estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych jest unieruchomiony na anionicie preparat lipazy *Mucor miehei* o firmowej nazwie Lipozyme IM-20. Lipaza *M. miehei* ma masę cząsteczkową 32 kDa, punkt izoelektryczny $pI = 4$, aktywność właściwą 8×10^6 J na gram białka i jest stabilna w zakresie temperatury 40–50°C i pH 6–8. Wykazuje specyficzność względem acylogliceroli w pozycji 1,3 oraz pierwszorzędowych alkoholi alifatycznych. Unieruchomiony preparat, w środowisku rozpuszczalników organicznych ma czas półtrwania $T_{1/2} = 66$ dni i może być stosowany w zakresie temperatur 60–80°C [65, 66, 67].

Inne ważne zastosowanie lipaz i esteraz produkowanych na skalę przemysłową, to modyfikacja acylogliceroli z wykorzystaniem reakcji transestryfikacji. Transestryfikacja jest wynikiem ciągłej hydrolizy i re-syntezy; w tym przypadku polega na wymianie reszt kwasu tłuszczo-

wego połączonego wiązaniami 1,3 z glicerolem [68, 69, 70, 71, 72]. Tłuszcze syntetyzowane w ten sposób mogą mieć określoną temperaturę topnienia, potrzebną przy produkcji margaryny, masła kakaowego czy tłuszczów do pieczenia. Przykłady modyfikacji glicerydów zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2

Przemysłowe zastosowanie lipaz do modyfikowania tłuszczowców naturalnych [39]

Firma	Surowce	Źródło lipazy	Warunki
Ajinomoto (1982) (Japonia)	olej z oliwek, lub olej palmowy, ester etylowy kw. stearynowego	<i>Rhizopus delemar</i>	reaktor okresowy, benzyna, 40°C
Fuji Oil (1983) (Japonia)	środkowa frakcja oleju palmowego, ester metylowy kw. stearynowego lub palmitynowego	<i>Rh. japonicus</i>	reaktor okresowy, 45°C
Asahi Denka (1983) (Japonia)	olej palmowy, kwas stearynowy	<i>Rh. delemar</i>	reaktor okresowy, n-heksan, 40°C
Unilever (1983) (USA)	olej palmowy, kwas mirystynowy	<i>Aspergillus niger</i>	ciągły reaktor kolumnowy, 40°C

Prowadzenie enzymatycznej estryfikacji w skali mikro nie wymaga unikalnych i drogich urządzeń. Dla prób prowadzonych sposobem periodycznym wystarcza termostatowane naczynie z mieszadłem. Preparat enzymatyczny, w postaci ciekłej lub stałej, dodawany jest bezpośrednio do środowiska reakcji, które zgodnie z rys. 1 może stanowić rozpuszczalnik, jego mieszanina z substratami, jak również mieszanina substratów bez rozpuszczalnika. W przypadku reakcji zachodzących w środowisku bez wyraźnie wydzielonej fazy wodnej lub w rozpuszczalnikach nienasyconych wodą, często korzystne jest stosowanie obojętnych chemicznie pochłaniaczy wody. Postęp reakcji zazwyczaj określa się na podstawie ilościowego pomiaru nieprzereagowanego kwasu metodą alkalimetryczną [45] lub kolorymetryczną [73, 74], albo poprzez pomiar stężenia substratów lub produktów metodami chromatografii gazowej [61] i HPLC [49].

Blain i in. [75] zastosowali zliofilizowaną, odtłuszczoną biomasę *Rhizopus arrhizus* i *M. javanicus*, jako źródło wewnątrzkomórkowej fosfolipazy A (3.1.1.32). W środowisku rozpuszczalników organicznych prowadzili hydrolizę i syntezę lecytyny z jaja kurzego. Późniejsze prace tych autorów dotyczyły sprawdzenia zdolności wielu szczepów grzybów nitkowatych do wytwarzania wewnątrzkomórkowych fosfolipaz i lipaz [76], oraz określenia specyficzności substratowej tych enzymów [77]. Zastosowali oni wewnątrzkomórkową lipazę *Rh. arrhizus* do syntezy

estrów gliceryny i wyższych kwasów tłuszczowych w środowisku eteru naftowego, eteru diizopropylowego i heptanu. Usuwając wodę ze środowiska reakcji przy użyciu sita molekularnego 4A, uzyskali znaczne przyspieszenie oraz podwyższenie wydajności procesu estryfikacji. Glicerol i kwas oleinowy reagowały z wydajnością 60%, dając głównie mono- i di-podstawione estry [42].

Reakcja estryfikacji może przebiegać także w sposób ciągły. Zazwyczaj do tego celu służą proste konstrukcyjnie reaktory przepływowe z mieszaniem (STR) lub przepływowe reaktory kolumnowe z wypełnieniem (PBR). Substraty przepływają w sposób ciągły przez reaktor z wytworzeniem estru i wody. Reaktory takie zastosowali Patterson i in. [78] do ciągłej syntezy estrów wyższych kwasów tłuszczowych, stosując jako katalizator odwodnioną biomasę *Rh. arrhizus*.

W przypadku reaktora kolumnowego z wypełnieniem duże nagromadzenie enzymu w jednostce objętości reaktora przy jednoczesnym, nieprzerwanym dopływie substratów stwarza niebezpieczeństwo, że wydzielona woda, jako słabo rozpuszczalna w środowisku organicznym, może hamować proces syntezy. Aby tego uniknąć, autorzy jako wypełnienie reaktora zastosowali katalizator enzymatyczny wymieszany z pochłaniaczem wody (sito molekularne 4A), uzyskując wydajność estryfikacji około 85%. Rozwiązanie zaproponowane przez Pattersona i in. wymaga okresowego wypakowania reaktora związanego z wysyceniem pochłaniacza wody, co może być kłopotliwe. Knox i in. [79] problem ten rozwiązyali inaczej. Syntetyzowali oni oleinian cetylu w przepływowym reaktorze kolumnowym wypełnionym odwodnioną biomasą *Rh. arrhizus*. Substraty rozpuszczone w n-heptanie były dozowane do reaktora, a mieszanina produktów i nieprzereagowanych substratów po wyjściu z reaktora przechodziła przez kolumnę odwadniającą wypełnioną sitem molekularnym 4A i była zwracana do rezerwuaru. Podczas czterech 24-godzinnych cykli uzyskano stopień estryfikacji 82-91%. Stosowanie pochłaniaczy wody jest metodą efektywną lecz podrażającą proces enzymatycznej estryfikacji. Nie zawsze jest ona konieczna. W pracy [39] zastosowano immobilizowaną na celicie lipazę *C. cylindracea* OF 360 do ciągłej syntezy 2-metylowalerianu prenylu. Reakcję prowadzono w przepływowym reaktorze kolumnowym, uzyskując 80% wydajność syntezy w czasie 650 godzin nieprzerwanej pracy.

Całkowicie nowe podejście do problemu ciągłej syntezy estrów zaprezentowali Hoq i in. [80]. Zastosowali oni lipazę *Chromobacterium viscosum* var. *paralipolyticum* produkowaną przez firmę Toyo Jozo, do ciągłej syntezy estrów glicerolu oraz kwasów oleinowego i linolenowego. Proces estryfikacji prowadzono w reaktorze typu membranowego zbudowanym z wielu warstw mikroporowatej, silnie hydrofobowej membra-

ny polipropylenowej. Z jednej strony membrany przepływał kwas o stężeniu 92-99%, z drugiej strony — roztwór glicerol-woda-lipaza. Reakcja syntezy zachodziła w porach hydrofobowej membrany na powierzchni zetknięcia obu cieczy. Powstałe estry dyfundowały do roztworu kwasu, natomiast woda dyfundowała do roztworu glicerol-woda-lipaza. W reaktorze tym uzyskano glicerydy z wydajnością 70-90%. Operacyjny czas półtrwania enzymu w takim reaktorze wynosił $T_{1/2} = 50$ dni. Autorzy ci stosowali także inne lipazy produkowane na skalę przemysłową [81].

Stosowanie modyfikowanych enzymów, rozpuszczalnych w środowisku organicznym, stanowi nowy sposób syntezy estrów. Modyfikacja chemiczna enzymów polega na wprowadzeniu do cząsteczki białka, za pomocą wiązań kowalencyjnych, związków o charakterze hydrofilowo-hydrofobowym. Modyfikant łączy się częścią hydrofilową z grupami czynnymi białka, zlokalizowanymi w strefie powierzchniowej, orientując na zewnątrz swoje rejony hydrofobowe. Y. I a n a d a i in. [82, 83] zastosowali jako odczynnik modyfikujący glikol monometoksypolietylenowy, który wiązali z grupami aminowymi białka za pomocą s-triazyny. Zmodyfikowana tym sposobem lipaza *Pseudomonas fluorescens* jest rozpuszczalna i aktywna w środowisku: benzenu, chloroformu, 1,1,1-trichloroetanu i toluenu. Lipaza ta funkcjonowała nadzwyczaj wydajnie także w niskich temperaturach (-3 i $+3^{\circ}\text{C}$).

Poszukiwanie nowych form katalizatorów enzymatycznych wynika z ograniczeń występujących w przypadku stosowania dotychczas omawianych systemów (rys. 1). Na przykład stosowanie systemów dwufazowych wymaga energicznego mieszania, aby zintensyfikować dyfuzję, co często prowadzi do gwałtownej utraty aktywności enzymu. Modyfikacja enzymu za pomocą glikolu polietylenowego daje katalizator, którego zastosowanie ogranicza się do niepolarnych substratów. Systemy monofazowe, w których wykorzystuje się rozpuszczalniki, nie pozwalają na dokonanie rozróżnienia między optymalnym środowiskiem enzymu i optymalnym składem systemu dla osiągnięcia równowagi reakcji. Ponadto, systemy monofazowe, złożone z rozpuszczalników nie mieszających się z wodą, mają zastosowanie głównie do substratów niepolarnych. Co najważniejsze, dla wszystkich tych systemów niemożliwe jest dokładne zdefiniowanie i kontrolowanie fazy wodnej, czy też mikrośrodowiska, w którym enzym jest zawarty.

Alternatywny sposób prowadzenia estryfikacji w środowisku organicznym polega na użyciu odwróconych miceli, nazywanych także mikroemulsjami odwracalnymi, zawierającymi zdyspergowaną fazę wodną. Faza polarna przybiera postać kropelek stabilizowanych przez międzyfazową warstwę związku czynnego powierzchniowo. Enzym w zależności

od charakteru oddziaływań ze środowiskiem miceli może być rozpuszczony w wodzie, która stanowi środowisko jego działania, może katalizować reakcję na powierzchni rozdziału faz lub funkcjonować w środowisku organicznym. System miceli odwróconych składa się głównie z ciągłej-blokowej fazy organicznej, ale część objętości, jaką zajmują micle, można zmieniać w sposób kontrolowany i może ona wynosić zaledwie 0,1% całkowitej objętości. Podobnie można kontrolować rozmiary miceli przez stosunek molowy wody do środka powierzchniowo czynnego, a także buforować środowisko enzymu. Micle odwrócone charakteryzują się dużą powierzchnią działania. Przenikanie substratów i produktów przez fazę organiczną nie ogranicza szybkości reakcji. Systemy te są odwracalne i mogą być w całości opisane w kategoriach fizyko-chemicznych. Tak więc mikroemulsje są termodynamicznie stabilne i nie wymagają mieszania: micle są tak małe (< 10 nm), że systemy te są optycznie przejrzyste i można je charakteryzować metodami fluorescencyjnymi i spektrofotometrycznymi.

Morita i in. [84] zastosował micle odwrócone, zbudowane z lipazy *R. delemar* i fosfatydocholiney w środowisku n-heksanu do syntezy triacylogliceroli. Przeglądową pracę dotyczącą działania enzymów w środowisku miceli odwróconych opublikował Martinek i in. [85].

ZAKOŃCZENIE

Biokataliza, prowadzona w ośrodkach organicznych, nadal jest słabo zbadana. Dotychczas pojawiło się ponad 200 doniesień z dziedziny biokatalizy w środowisku rozpuszczalników organicznych, w tym także doniesień dotyczących enzymatycznej estryfikacji [56, 86]. Większość z nich ma raczej opisowy charakter, nie są więc one ani rozstrzygające ani ostateczne, nawet jeżeli dotyczą praktycznych zastosowań [39] lub matematycznego modelowania procesu [34, 87, 88].

LITERATURA

1. Enzyme nomenclature, Academic Press, 1984.
2. Entressangles B., Desnuelle P. — *Biochim. Biophys. Acta* 159: 285, 1968.
3. Brockerhoff H., Jensen G. — *Lipolytic enzymes*. London, 1974.
4. Lestrowaia N. N. — *Usp. Mikrobiologii* 11: 21, 1976.
5. Ruban J. L. — *Mikrobnije lipidy i lipazy*. Moskwa, 1977.
6. Ota Y., Yamada J. — *Agric. Biol. Chem.* 30: 351, 1966.
7. Swiridenko J. J., Łobyriewa L. B., Marczenkowa A. J., Ruban J. L., Umanskij M. S. — *Prikl. Bioch. i Mikrob.* 14: 677, 1978.
8. Arends J. M., Dorochow W. W., Swierczkowa T. M., Gonczar-

- row J. I. — *Fierm. Spirt. Prom.* 8: 17, 1984.
9. Szełamowa S. A., Zerebcow N. A., Szczegolew W. W. — *Fierm. Spirt. Prom.* 4: 26, 1984.
10. Ruban J. Ł., Łobyriewa L. B., Swiridenko J. J., Marczenkova A. J., Umanskij M. S. — *Prikl. Bioch. Mikrob.* 14 (4): 499, 1978.
11. Chander M. S., Batish V. K., Sannabhadti S. S., Srinivasan R. A. — *J. Food Sci.* 45: 598, 1980.
12. Jonsson U., Snygg B. G. — *J. Appl. Bact.* 37: 571, 1974.
13. Ruban J. Ł., Ksandopulo G. B., Murzina L. P. — *Prikl. Bioch. Mikrob.* 14 (6): 849, 1978.
14. Siewierina L. O. — *DAN Ser. Biologiczeskaja* 4: 594, 1984.
15. Dawranow K., Achmiedowa Z. R., Rizajewa M. J., Rorchimow M., Biezborodow A. M. — *Prikl. Bioch. Mikrob.* 20: 166, 1984.
16. Dawranow K., Achmiedowa Z. R., Rizajewa M. J., Alimdżanowa M. J., Rachimow M. M. — *Biochimija* 48: 739, 1983.
17. Iwai M., Tsujisaka Y. — *Agr. Biol. Chem.* 10: 38, 1974.
18. Dawranow K. D., Rachimow M. M. — *Biochimija* 46: 250, 1981.
19. Aisaka K., Terada O. — *J. Biochem.* 89: 817, 1981.
20. Iwai M., Tsujisaka Y. — *Agr. Biol. Chem.* 38 (6): 1241, 1974.
21. Semeriva M., Benzonana G., Desnuelle P. — *Bioch. Biophys. Acta* 191: 598, 1969.
22. Hofelmann M., Hartmann J., Zinka A., Schreier P. — *J. Food Sci.* 50: 1721, 1985.
23. Iwai M., Okumura S., Tsujisaka Y. — *Agr. Biol. Chem.* 39: 1063, 1975.
24. Zwiagincewa J. S., Dymitrijew W. W., Melichowski W. A., Fichte B. A. — *Mikrobiologija* 52: 263, 1983.
25. Zwiagincewa I. S., Uszakow W. M. — *Mikrobiologija* 41: 713, 1972.
26. Zwiagincewa I. S., Ruban W. L. — *Mikrobiologija* 41: 973, 1972.
27. Nurminen T., Suomalainen H. — *Bioch. J.* 118: 759, 1970.
28. Biruizowa W. M., Łobyriewa L. B. — *Mikrobiologija* 44: 2, 1975.
29. Seitz E. W. — *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2: 12, 1974.
30. Boyce C. O. L. (ed.) — *Novo's handbook of practical biotechnology*. Novo Industri, 1986.
31. Kastie J. H., Loevenhart A. S. — *Amer. Chem. J.* 24: 491, 1900.
32. Rona F., Ammon R. — *Biochem.* 249: 446, 1932.
33. Velluz L. — *Bull. Soc. Chem. Biol.* 21: 814, 1939.
34. Halling P. J. — *Enzyme Microb. Technol.* 6: 513, 1984.
35. Butler L. G. — *Enzyme Microb. Technol.* 1: 252, 1979.
36. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V. — *Biochim. Biophys. Acta* 658: 76, 1981.
37. Martinek K., Semenov A. N. — *Biochim. Biophys. Acta* 658: 90, 1981.
38. Lilly M. D. — *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32: 162, 1982.
39. Lazar G., Henkel K. — *Fette Seifen Anstrichmittel* 10: 394, 1985.
40. Inada Y., Takahashi K., Yoshimoto T., Ajima A., Matsushima A., Saito Y. — *TIBITECH Juli*: 190, 1986.
41. Tsujisaka Y., Okumura S., Iwai M. — *Biochim. Biophys. Acta* 489: 415, 1977.
42. Bell G., Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E. L., Todd R. — *FEMS Microbiol. Lett.* 3: 223, 1978.
43. Tahoun M. K., Ali H. A. — *Enzyme Microb. Technol.* 8: 429, 1986.

44. Linfield W. M., Barauskas R. A., Sivieri L., Serota S., Stevenson sr, R. W. — *JAACS* 61: 191, 1984.
45. Okumura S., Iwai M., Tsujisaka Y. — *Biochim. Biophys. Acta* 575: 156, 1979.
46. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E. — XVII Sesja Naukowa „Doskonalenie procesów biotechnologicznych w przemyśle spożywczym”, Materiały Zjazdowe, Cz. 1: 170, Łódź, 1986.
47. Seino H., Uchibori T., Nishitani T., Inamasu S. — *JAACS* 61: 1761, 1984.
48. Iwai M., Okumura S., Tsujisaka Y. — *Agric. Biol. Chem.* 44: 2731, 1980.
49. Okamura S., Iwai M., Tominaga Y. — *Agric. Biol. Chem.* 48: 2805, 1984.
50. Gatfield I. L. — *Lebensm. Wiss. Technol.* 19: 87, 1986.
51. Gatfield I. L., Sand T. — Patent RFN: 3108927, 1981.
52. Antczak T., Antczak U., Galas E., Góra J. — Zgłoszenie patentowe: P 271947, 1988.
53. Antczak U., Antczak T., Góra J., Galas E., Fajfer A. — Zgłoszenie patentowe: P 271948, 1988.
54. Ray A. — *Nature* 231: 313, 1971.
55. Laane C. — *Biocatalysis* 1: 17, 1987.
56. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C. — *Biotechnol. Bioeng.* 30: 81, 1987.
57. Brink L. E. S., Tramper J. — *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1258, 1985.
58. Zaks A., Kilibanov A. M. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3192, 1985.
59. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E. — Sprawozdanie w CPBP 04-11. 1987.
60. Antczak U., Antczak T., Galas E., Góra J. — Sprawozdanie w CPBP 04-11. 1987.
61. Kirchner G., Scollar M. P., Kilibanov A. M. — *J. Amer. Chem. Soc.* 107: 7072, 1985.
62. Koshiro S., Sonomoto K., Tanaka A., Fukui S. — *J. Biotechnol.* 2: 47, 1985.
63. Langrand G., Baratti J., Buono G., Trinataphylides Ch. — *Tetrahedron Letters* 27: 29, 1986.
64. Langrand G., Seechi M., Buono G., Barratti J., Trinataphylides Ch. — *Tetrahedron Letters* 26: 1858, 1985.
65. Eigtved P., Hansen T. T., Høge-Jensen B. — *Novo Industry A/S*, A-05924 a, 1985.
66. Hansen T. T., Eigtvet P. — *Novo Industry A/S*, A-05930 a, 1985.
67. Eigtvet P., Hansen T. T., Sakaguchi H. — *Novo Industry A/S*, A-05948, 1986.
68. Tanaka T., Ono E., Ishihara M., Yamanaka S., Takinami K. — *Agric. Biol. Chem.* 45: 2387, 1981.
69. Yokozeki K., Yamanaka S., Takinami K., Hirose Y., Tanaka A., Sonomoto K., Fukui S. — *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 1, 1982.
70. Wisdom R. A., Dunnill P., Lilly M. D. — *Biotechnol. Bioeng.* 29: 1081, 1987.
71. Stevenson R. W., Luddy F. E., Rothbart H. L. — *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 56: 676, 1979.

72. Macrae A. R. — J. Amer. Oil Chem. Soc. 60: 29, 1983.
73. Lowry R. R., Tinsley I. J. — J. Amer. Oil Chem. Soc. 53: 470, 1976.
74. Kwon D. Y., Rhee J. S. — JAOCS 63: 89, 1986.
75. Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E., Akhtar M. W. — Lipids 11: 553, 1976.
76. Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E. — FEMS Microbiol. Lett. 3: 85, 1978.
77. Bell G., Blain J. A., Patterson J. D. E. — FEMS Microbiol. Lett. 5: 399, 1979.
78. Patterson J. D. E., Blain J. A., Shaw C. E. L., Todd R., Bell G. — Biotechnol. Lett. 1: 211, 1979.
79. Knox T., Cliffe K. R. — Proces Biochemistry October: 188, 1984.
80. Hoq M. M., Yamane T., Shimizu S. — Enzyme Microb. Technol. 8: 236, 1986.
81. Hoq M. M., Tagami H., Yamane T., Shimizu S. — Agric. Biol. Chem. 49: 335, 1985.
82. Takahashi K., Ajima A., Yoshimoto T., Okada M., Matsushima A., Tamura Y., Inada Y. — J. Org. Chem. 50: 3414, 1985.
83. Inada Y., Takahashi K., Yoshimoto T., Ajima A., Matsushima A., Saito Y. — TIBTECH July: 190, 1986.
84. Morita S., Narita H., Matoba T., Kito M. — JAOCS 61: 1571, 1984.
85. Martinek K., Berezin I. V., Khmelnitski Yu. L., Klyachko N. L., Levashov A. A. — Biocatalysis 1: 9, 1987.
86. Khmielnicki Yu. L., Levashov A. A., Klyachko N. L., Martinek K. — Biotechnologia 4: 292, 1988.
87. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V. — Biochim. Biophys. Acta 658: 76, 1981.
88. Semenov A. N., Khmelnicki Yu. L., Berezin I. V., Martinek K. — Biocatalysis 1: 3, 1987.

STANISŁAW BIELECKI

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

DROBNOUSTROJOWE ENZYMY LITYCZNE

1. WSTĘP

Istnieje szereg metod, zarówno fizycznych jak i chemicznych, służących do rozrywania lub lizy ścian komórkowych mikroorganizmów. Skuteczność tych metod zależy od rodzaju mikroorganizmu, na który działamy, a wybór metody — od celu w jakim ma być usunięta ściana komórkowa.

Jednym z nowych sposobów rozkładu ścian komórkowych oraz natiwnych komórek drobnoustrojów jest tak zwana zymoliza, czyli hydroliza enzymatyczna wywołana działaniem kompleksu enzymów litycznych.

Enzymy lityczne lub lizoenzymy to ogólna nazwa kompleksu enzymów mających zdolność hydrolizy ścian komórkowych drobnoustrojów. Enzymy lityczne mogą być pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i drobnoustrojowego. Enzymy te odgrywają ważną rolę w przyrodzie. U roślin i zwierząt pełnią funkcje obronne przed zakażeniami drobnoustrojami i warunkują odporność tych organizmów na infekcje. W świecie drobnoustrojów lizoenzymy mogą mieć pewne znaczenie w utrzymywaniu równowagi biologicznej, umożliwiając rozwój mikroorganizmów wytwarzających te enzymy wśród innych takiej zdolności nie posiadających, a także uczestnicząc w rozkładzie martwych komórek drobnoustrojów w glebie, wodach stojących itp.

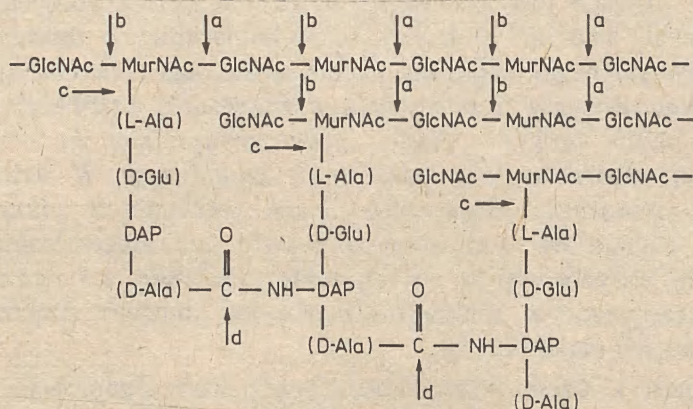
Skuteczność rozkładu ściany komórkowej mikroorganizmów jest uzależniona od stopnia depolimeryzacji tych składników ścian, które są odpowiedzialne za kształt, sztywność i odporność komórek na szereg czynników chemicznych i fizycznych.

Wiele drobnoustrojów wytwarza enzymy pozakomórkowe wykazujące zdolność degradacji ścian komórkowych, jednakże tylko niektóre wytwarzają kompleksy enzymów litycznych aktywne w stosunku do żywych komórek drobnoustrojów. Heterogeniczność substratu jakim jest ściana komórkowa, różnice w jej składzie chemicznym i strukturze, zależne nie tylko od gatunku ale i od wieku kultury powodują, że drobnoustroje wykazują różną wrażliwość na działanie enzymów litycznych.

Dla pełniejszego przedstawienia drobnoustrojowych enzymów litycznych celowe jest krótkie omówienie najważniejszych biopolimerów występujących w ścianach komórkowych niektórych drobnoustrojów.

2. PEPTYDOGLIKAN ŚCIANY KOMÓRKOWEJ BAKTERII

Czynnikiem określającym kształt i sztywność komórek bakterii jest peptydoglikan. Związek ten zbudowany jest z nierozgałęzionych łańcuchów polisacharydowych złożonych z naprzemiennie połączonych wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi jednostek cukrowych: N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego. W zależności od rodzaju bakterii wszystkie lub część reszt mleczanowych kwasu N-acetylmuraminowego połączona jest z tetrapeptydami złożonymi z L i D aminokwasów. W skład tego tetrapeptydu prawie zawsze wchodzi L i D-alanina, kwas D-glutaminowy oraz L-lizyna lub jeden z izomerów kwasu diaminopimelinowego (DAP). Między D-Ala tetrapeptydów przyłączonych do jednego łańcucha polisacharydowego a L-Liz lub DAP tetrapeptydów, przyłączonych do sąsiedniego łańcucha polisacharydowego, występują mostki peptydowe tworząc usieciowaną strukturę peptydoglikanu (rys. 1).



Rys. 1. Sieć bakteryjnego peptydoglikanu i miejsca działania różnych enzymów litycznych. a — endo-N-acetylmuramidaza, b — endo-N-acetyloglukozaminidaza, c — N-acetylmuramylo-L-alanyloamidaza, d — endopeptydaza, Glc NAc — N-acetyloglukozamina, Mur NAc — kwas N-acetylmuraminowy, DAP — kwas diaminopimelinowy

Długość i skład chemiczny mostków peptydowych jest różny i zależy od rodzaju bakterii, i tak np. u *Staphylococcus aureus* Copenhagen mostek ten zbudowany jest z pięciu reszt glicynowych, u *Micrococcus*

reseus z trzech reszt L-alaninowych i L-treoniny, a u *Arthrobacter crystallopoietes* z jednej reszty L-alaniny. W mostkach peptydowych niektórych bakterii występuje L-ornityna. Bakterie Gram-dodatnie mają znacznie grubsza warstwę peptydoglikanu (ok. 25 nm) aniżeli bakterie Gram-ujemne (ok. 3 nm). Te ostatnie mają jeszcze dodatkowo zewnętrzną otoczkę-błone o grubości około 8 nm zbudowaną z różnych białek, lipidów i lipopolisacharydów [1, 2].

3. ENZYMY BAKTERIOLITYCZNE

Rozkład siatki peptydoglikanu następuje pod wpływem działania trzech typów enzymów:

1. katalizujących hydrolizę łańcuchów polisacharydowych,
2. rozczepiających mostki peptydowe oraz
3. rozrywających wiązania między łańcuchami polisacharydowymi a tetrapeptydami (rys. 1).

Jednym z najważniejszych enzymów bakteriolytycznych jest lizozym — glukanohydrolaza N-acetylomuramidu (EC 3.2.1.17), katalizujący hydrolizę wiązań glikozydowych między kwasem N-acetylomuraminowym i N-acetyloglukozaminą. Lizozym z białka jaja kurzego jest najintensywniej badanym enzymem litycznym. Ten typ enzymu występuje również w kompleksie enzymów litycznych wytwarzanych przez *Streptomyces albus* G, *Str. erythreus*, *Chalaropsis* sp., Faga T4 i rodzaj *Bacillus* [3-7]. W zależności od źródła pochodzenia enzym ten charakteryzuje się różnymi właściwościami fizykochemicznymi i specyficznością działania [8] (tab. 1). Harada i in. [6], analizując trójwymiarową strukturę N-acetylomuramidazy ze *Str. erythreus* nie stwierdzili dużego podobieństwa między trzeciorzędową strukturą lizozymu pochodzenia drobnoustrojowego i lizozymu z białka jaja kurzego.

Tabela 1

Właściwości N-acetylomuramidazy z różnych źródeł [8]

Parametr	<i>Streptomyces rutgersensis</i>	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Fag T4	<i>Chalaropsis</i> sp.	Białko jaja kurzego
α -Heliks *	18%	(18%)	51% (60%)	—	29% (44%)
Masa cząsteczkowa	21000	20600	17740	22400	14600
Punkt izoelektryczny	9.19	9.5	—	7.53	11.1
Hydroliza chityny	—	—	—	—	+
Hydroliza <i>Staphylococcus aureus</i>	—	+	—	+	—

* Zawartość α -heliksu określano na podstawie badań dichroizmu kołowego. Wartości w nawiasach otrzymano na podstawie dyfrakcyjnej analizy rentgenograficznej.

Innym enzymem działającym na łańcuch polisacharydowy peptydoglikanu jest endoacetyloglukozaminidaza uwalniająca fragmenty oligosacharydowe z N-acetyloglukozaminą na końcu redukującym. Enzym ten znajduje się w kompleksie litycznym szczepów z rodzaju *Streptococcus*, zwanym muralizyną [9], w lizostafinie [10] i kompleksie enzymów litycznych wytwarzanym przez *Staphylococcus aureus* [1].

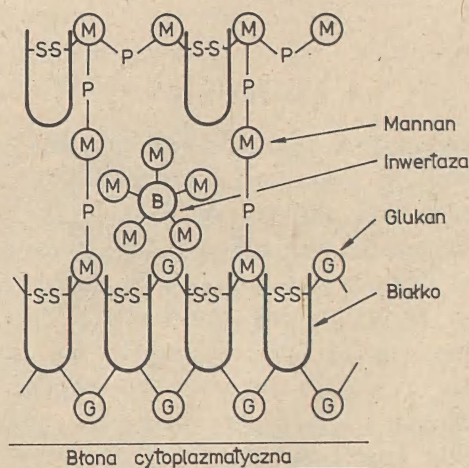
Łańcuch tetrapeptydowy jest odszczepiany od łańcucha polisacharydowego przez N-acetylomuramyl-L-alanyloamidazę, enzym wytwarzany m.in. przez *E. coli* [12], *B. subtilis* [13], *Stre. albus* [3]. Enzym ten działa na peptydoglikan wówczas, gdy łańcuchy polisacharydowe uległy wcześniejszej degradacji. Stąd nie wykazuje on silnego działania bakteriolitycznego.

Następną grupą enzymów degradujących ścianę komórkową bakterii są hydrolazy peptydylo-peptydowe, rozrywające mostki peptydowe w peptydoglikanie. Endopeptydaza KM wytwarzana przez *Str. sp.* hydrolizuje wiązania między D-Ala i DAP w ścianie komórkowej *E. coli*, *B. megaterium* i *B. subtilis*. Endopeptydazy o podobnych własnościach katalitycznych występują w kompleksie autolitycznym *E. coli* [12]. Endopeptydaza SA, wytwarzana przez *Str. sp.*, hydrolizuje wiązania między N-końcowym aminowkwasem mostka peptydowego a C-końcowym aminokwasem tetrapeptydu [14]. W przeciwieństwie do wspomnianych endopeptydaz KM i SA o dość wysokiej specyficzności, peptydaza z *Myxobacterium* działa w wielu miejscach na peptydy ściany komórkowej bakterii, hydrolizując zarówno wewnętrzne wiązania w mostku peptydowym, jak i jego połączeniu z D-Ala z tetrapeptydu oraz wiązania między kwasem N-acetylomuraminowym i L-Ala [15].

Większość enzymów bakteriolitycznych degraduje głównie ściany komórkowe bakterii Gram-dodatnich. Wspomniana powyżej, zewnętrzna wielowarstwowa otoczka bakterii Gram-ujemnych działa jako bariera uniemożliwiająca przedostanie się większości enzymów litycznych do warstwy peptydoglikanu [1]. Aktywność lityczną w stosunku do bakterii Gram-ujemnych wykazują m.in. enzymy wytwarzane przez *Clostridium perfringens* [16], *B. subtilis* YT-25 [17], *Str. griseus* P-51 [18]. Są to głównie glukozaminidazy lub muramidazy. Suzuki i in. [19] wyizolowali z gleby szczep *Streptomyces sp.* No 177, który wytwarza enzym lityczny będący typem proteiny serynowej. Enzym ten, nazwany przez autorów „177 enzyme”, powoduje degradację ścian komórkowych *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeroginoza*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* i *B. subtilis*. Szczepy *Staph. aureus* były odporne na działanie tego enzymu. Enzymy lityczne, wykazujące tylko aktywność proteolityczną i degradujące ściany komórkowe różnych bakterii, otrzymano z cieczy pochodzącej z *Micromonospora sp.* No 152 [20] oraz *Bacillus sp.* 88 [21].

4. POLISACHARYDOWE SKŁADNIKI ŚCIANY KOMÓRKOWEJ DROŻDŻY

Do rozkładu ściany komórkowej drożdży i pleśni wymagany jest inny skład kompleksu lizoenzymów. Jest to oczywiście związane z inną budową ściany komórkowej tych mikroorganizmów.



Rys. 2. Model ściany komórkowej drożdży, wg Kidby i Daviesa [23]

Ściana komórkowa drożdży stanowi od 15 do 20% suchej masy komórki. Składa się głównie z polisacharydów, takich jak glukany, mannany i chityna, stanowiących 80-90% jej suchej masy oraz z niewielkiej ilości białek i lipidów [22] (rys. 2).

4.1. GLUKANY

Glukany, stanowiące około 30% s.m. ściany komórkowej, są jednym ze składników odpowiedzialnych za kształt i sztywność komórki. Obecnie uważa się, że w ścianie komórkowej drożdży występują przynajmniej trzy molekularnie odmienne rodzaje glukanów, różniące się typem wiązań i stopniem rozgałęzienia cząsteczki. Głównym rodzajem jest wysokocząsteczkowy 1,3- β -glukan o ciężarze cząsteczkowym około 240 kDa, stanowiący około 85% glukanów ściany komórkowej drożdży [24, 25].

Drugim rodzajem glukanu występującym w ścianie komórkowej drożdży jest nierozpuszczalny w alkaliach, ale rozpuszczalny w kwasie octowym, 1,6- β -glukan o stopniu polimeryzacji 130-140. Glukan ten ma rozgałęzioną strukturę i zawiera około 19% wiązań 1,3- β -glikozydowych [26, 27].

Trzecim rodzajem glukanu jest rozpuszczalny w alkaliach 1,3- β -glukan z niewielką liczbą wiązań 1,6- β -glikozydowych. W łańcuchach bocznych tego glukanu znajduje się od 15 do 20 reszt mannozy. Uważa się, że ten rodzaj glukanu sąsiaduje bezpośrednio z mannanami ściany, łącząc je z nierozpuszczalnym w alkaliach 1,3- β -glukanem [28, 29].

W zależności od rodzaju drożdży skład glukanów ściany komórkowej jest różny.

4.2. CHITYNA

Chityna 1,4-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukan jest homoglukanem zbudowanym z acetylowanej 2-amino-D-glukopiranozy. Jednostką strukturalną liniowych cząsteczek chityny są dwie reszty N-acetylo-2-amino-D-glukopiranozy połączone wiązaniem 1,4- β -glikozydowym. Ściany komórkowe większości drożdży zawierają 1-2% chityny; ściany niektórych drożdży, takich jak *Endomycopsis capsularis* i *Eremascus fertilis*, zawierają jej znacznie więcej [30], natomiast nie stwierdzono chityny u niektórych drożdży z rodzaju *Schizosaccharomyces* [31]. Na podstawie badań mikrochemicznych i analizy enzymatycznej przy użyciu chitynazy [32] oraz przy użyciu enzymów litycznych z *Arthrobacter* GJM-1 [33] stwierdzono, że chityna występuje głównie w miejscach oddzielenia się pączków.

4.3. MANNAN

W ścianie komórkowej grzybów występują polisacharydy związane kowalencyjnie z białkami. Ich przedstawicielem w drożdżach jest mannan, którego zawartość w ścianie komórkowej wynosi około 30% s.m. [22]. Część polisacharydowa kompleksu mannano-białkowego, jego biosynteza i struktura są znacznie lepiej poznane, niż w przypadku innych polisacharydów ściany komórkowej [34-37]. Część ta zbudowana jest z głównego łańcucha, składającego się z reszt mannozy połączonych wiązaniem 1,6- α - do którego przyłączone są krótkie łańcuchy boczne mające wiązania 1,2- α - i 1,3- α - oraz w niektórych przypadkach grupy fosforanowe. Ta główna część mannoproteiny jest związana poprzez diacetylochitobiozę wiązaniem N-glikozydowym z resztami asparaginy. Druga, mniejsza część polisacharydowa mannoproteiny zawiera krótkie mannooligosacharydy o wiązaniach 1,2- α - i 1,3- α -, które są połączone z białkiem wiązaniem O-glikozydowym przez reszty treoniny lub seryny.

Wszystkie wiązania między cząsteczkami mannozy mają konfigurację α . Wiązania między cząsteczkami acetyloglukozaminy oraz między N,N-diacetylochitobiozą i pierwszą resztą mannozy znajdują się w konfiguracji β [38].

5. ŹRÓDŁA ENZYMÓW HYDROLIZUJĄCYCH ŚCIANĘ KOMÓRKOWĄ DROŻDŻY

Do hydrolizy tak heterogenicznego substratu jakim jest ściana komórkowa drożdży wymagany jest aktywny kompleks enzymów litycznych. Zdolność wytwarzania pozakomórkowych enzymów litycznych w stosunku do drożdży ma wiele drobnoustrojów [39], izolowanych głównie z gleby, wód stojących, ścieków przemysłowych itp. Salton [40] wyizolował szczepy drobnoustrojów wytwarzające enzymy lityczne, rozkładające ścianę komórkową drożdży *Candida pullcherrima*. Z cieczy po hodowlanej *Micromonospora* AS Gascon i in [41] otrzymali kompleks enzymów litycznych nazwany Strepzyme M, katalizujący lizę ścian komórkowych drożdży *Cand. utilis* i wielu innych gatunków. Horikoshi i Sakaguchi [42] wyizolowali z gleby szczep *B. circulans*, który wykazywał aktywność lityczną w stosunku do ściany komórkowej *Aspergillus oryzae* i *Saccharomyces sake*. Tanaka i Phaff [43] wyizolowali z gleby szereg drobnoustrojów zdolnych do wytwarzania lizoenzymów, hydrolizujących ściany komórkowe drożdży piekarskich. Najbardziej aktywnym w tworzeniu enzymów litycznych był szczep *B. circulans* WL-12. Yamamoto i Nagasaki [44] wyizolowali kilka szczepów bakterii, z których największą zdolność wytwarzania lizoenzymów miał szczep *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticacae*. Ponadto, zdolność wytwarzania enzymów litycznych stwierdzono u *Cytophaga johnsoni* [45], *Achromobacter lunatus* [46], *Arthrobacter* [47-54], *Oerskovia* [55]. Spośród grzybów zdolnością do biosyntezy enzymów litycznych charakteryzują się pleśnie z rodzaju *Rhizopus* [56, 57], *Trichoderma* [48-60], *Penicillium* [61]. Yamamoto i Nagasaki [62, 63] otrzymali lizoenzym w postaci krystalicznej z *Pellicularia* sp., należącego do *Fungi imperfecti*. Nagasaki i in. [64] opracowali również sposób otrzymywania preparatu enzymów litycznych pod nazwą „Kitalase” z *Rhizoctonia solani*.

Z handlowych preparatów enzymów litycznych pochodzenia drobnoustrojowego pojawiły się w ostatnich latach: „Zymolyase” — preparat otrzymywany z hodowli *Arthrobacter* (Kirin Brewery, Japonia), „Teichozyme Y” wytwarzany przez *Oerskovia xanthineolytica* (Worthington Biochemical Corp. USA), „Novozym 234” — preparat enzymów litycznych wytwarzanych przez *Trichoderma harzianum* (NOVO, Dania), „Lytic enzyme L₁” — preparat lityczny z *Cytophaga* sp. (British Drug House Ltd.).

6. ENZYMATYCZNA HYDROLIZA ŚCIANY KOMÓRKOWEJ DROŻDŻY

Skuteczność biodegradacji ściany komórkowej drożdży zależy od stopnia hydrolizy jej głównych składników, a w szczególności 1,3-β-glukanów odpowiedzialnych za kształt i sztywność komórki [65]. Miejsce roz-

poczęcia działalności enzymów litycznych na ścianę komórkową uzależnione jest od rodzaju drożdży, właściwości morfologicznych ściany komórkowej, a także od właściwości samych enzymów. Zymoliza może występować jednocześnie na całej powierzchni komórki, np. u *Saccharomyces cerevisiae* lub tylko w niektórych miejscach ściany komórkowej, np. u *Sacch. fragilis* [66].

Rola poszczególnych enzymów w lizie ścian komórkowych drożdży nie jest jeszcze dokładnie wyjaśniona. Tanaka i Phaff [43], jako jedni z pierwszych udowodnili, że 1,3- β -glukanazy otrzymane z *B. circulans* zdolne są do rozkładu ścian komórkowych drożdży bez udziału innych enzymów, Mc Lellan i in. [67, 68] uważali, że pierwszoplanową rolę, przynajmniej w zapoczątkowaniu lizy komórek drożdży, odgrywają fosfomannanaza, odsłaniając warstwę glukanu na działanie glukanaz. Jednakże usunięcie mannoprotein może nastąpić również przez działanie 1,6- β -glukanazy z *Cytophaga* [45] lub 1,3- β -glukanazy z Zymolyase [69], czy też enzymów proteolitycznych lub związków tiolowych.

Skuteczne działanie 1,3- β -glukanazy preparatu „Lyticase” z *Oersk. xanthineolytica* jak i enzymu pochodzącego z *Arthrobacter* GJM uwarunkowane jest obecnością alkalicznej proteinazy [51, 52]. Kitamura [70] stwierdził, że Zymolyase B z *Arthr. luteus* łącząc się z mannanami ściany komórkowej drożdży zmienia konformację części białkowej mannoproteiny, czyniąc ją bardziej podatną na proteolizę. Modyfikacja tryptofanu w cząsteczce Zymolyase B zmniejszyła wrażliwość tego enzymu na inhibicję mannanem. Obecnie zdaje się przeważać pogląd, że usunięcie warstwy mannoproteiny w celu stymulowania lizy komórek drożdży przez glukanazy nie jest konieczne. Wystarczy zwiększenie porowatości ściany komórkowej lub jej „rozluźnienie” przez dodanie związków rozrywających wiązania disiarczkowe lub tioestrowe w mannoproteinie, czy oddziaływujących na hydrofobowe regiony mannanu, albo też na drodze zwiększenia siły jonowej [71]. Takie zmiany w strukturze powierzchniowych warstw ściany umożliwiają dostęp β -glukanaz do glukanów i ich depolimeryzację, a w konsekwencji lizę ściany komórkowej. Rola lipazy i chitynazy w degradacji ściany komórkowej drożdży również nie jest jeszcze wyjaśniona. Wysoka aktywność preparatu enzymów litycznych ze *Sclerotina* zawierającego glukanazy, lipazy i fosfolipazy nie musi być spowodowana obecnością tych ostatnich. Sądzi się, że są one niezbędne do pełnej lizy ściany komórkowej, co na pewno jest prawdą w przypadku drożdży *Trigonopsis variabilis*, które mają w ścianie stosunkowo dużo tłuszczów, a mało glukanów. Chitynazy i mannazy powodują niewielki wzrost aktywności kompleksu enzymów litycznych w stosunku do niektórych drożdży. Rola chitynazy ograniczona

była do hydrolizy blizn po oddzieleniu pączka [32]. Enzym ten jest przydatny zatem przy rozpuszczaniu ścian starszych komórek drożdży.

W preparatach enzymów litycznych stwierdzono występowanie szeregu czynników wspomagających działalność tych enzymów. Takahaara i in. [72] wykazali, że *B. subtilis* YT-25 wytwarza peptyd, który wzmacnia aktywność lizoenzymów w stosunku do *Ps. aeruginosa*. Bielecki i Galas [60] w handlowym preparacie celulazy „Onozuka” SS stwierdzili obecność czynnika litycznego synergicznie działającego z 1,3- β -glukanazą w lizie wysuszonych acetonem komórek drożdży *Sacch. cerevisiae*. Przypuszcza się, że czynniki te zwiększają wrażliwość struktur ścian komórkowych drożdży na działanie enzymów litycznych.

7. β -GLUKANAZY

Dominujący udział β -glukanaz w hydrolizie ściany komórkowej drożdży, jak również ich udział w degradacji powszechnie występujących naturalnych β -glukanów różnych od celulozy, skłaniają do krótkiego omówienia tej grupy enzymów.

Drobnoustrojowe 1,3- β -glukanazy dzieli się w zależności od sposobu ich działania na egzoenzymy [73-75] i endoenzymy [42, 65]. Endoglukanazy dzieli się dodatkowo na enzymy wytwarzające wyższe oligosacharydy i na enzymy wytwarzające niższe oligosacharydy [75, 76]. Fleet i in. [77] stwierdzili, że 1,3- β -glukanaza *Schizosaccharomyces* sp. hydrolizuje w sposób przypadkowy 1,3- β -glukan do oligosacharydów, wytwarzając w konsekwencji laminarabiozę i glukozę. Podobną 1,3- β -glukanazę wyizolowano z cieczy pohodowlanej *B. circulans* [78]. 1,3- β -glukanaza z *C. utilis* [79] hydrolizuje laminaran głównie do laminaratetraozy, laminaratRIOZY i laminarabiozy. Laminarapentaoza jest jedynym lub głównym produktem hydrolizy laminaranu przez 1,3- β -glukanazę z *Arthrobacter* [54, 80] i przez 1,3- β -glukanazę z *B. circulans* [81]. Oprócz hydrolizy wiązań 1,3- β -glikozydowych, niektóre 1,3- β -glukanazy wykazują zdolność hydrolizy innych wiązań glikozydowych. W ścianie komórkowej *Cryptococcus albidus* stwierdzono obecność egzoenzymu wykazującego zdolność hydrolizy wiązań 1,3- β - i 1,6- β -glikozydowych [82]. Fleet i Phaff [83] informują o obecności takiego enzymu również w ekstraktach bezkomórkowych i w cieczy pohodowlanej drożdży *Schizosaccharomyces* sp. Enzym ten nie wykazywał zdolności hydrolizy wyizolowanych ścian komórkowych drożdży piekarskich. Podobną glukanazę wykryto również w ekstraktach bezkomórkowych drożdży *C. utilis*. Enzym ten oprócz wiązań 1,3- β - i 1,6- β -glikozydowych hydrolizował również p-nitrofenyloglukopiranozyd [84, 85]. Endo 1,6- β -glukanaza z *B. circulans* wykazywała aktywność w stosunku do wiązań 1,3- β -glikozydowych, wystę-

pujących w pobliżu wiązań 1,6- β - w strukturze glukanu. Rombouts i in. [81, 86] wiążą ten fakt z niezwykle silną aktywnością lityczną tej glukanazy. W handlowym preparacie enzymów litycznych „Lytic enzyme L₁” znajduje się oprócz endo-1,3- β -glukanazy, specyficznej w stosunku do laminaranu, również inny, niespecyficzny enzym degradujący wiązania 1,3- β - i 1,4- β -glikozydowe [87]. Wiele bakterii z rodzaju *Bacillus* produkuje enzymy hydrolizujące glukany zawierające wiązania 1,3- β - i 1,4- β -glikozydowe [88, 89].

Optymalne warunki działania większości glukanaz są w środowisku o odczynie kwaśnym lub zbliżonym do obojętnego. Jednakże alkalofilny szczep *Bacillus* sp. 221 wytwarza pozakomórkową endo-1,3- β -glukanazę działającą w pH 8,5 i wykazującą dość wysoką termostabilność, co jest cechą również rzadko spotykaną u tych enzymów [90].

Intensywnie badaną grupą enzymów są β -glukanazy drożdży. Rozwój technik izolacji i oczyszczania enzymów umożliwił wyodrębnienie z drożdży *Sacch. cerevisiae* sześciu różnych 1,3- β -glukanaz [91]. Dwie z nich wykazywały właściwości egzoglukanaz, natomiast pozostałe to endoglukanazy. β -Glukanazy drożdży odgrywają istotną rolę w procesach morfogenezy. Poziom poszczególnych glukanaz jest różny podczas wzrostu wegetatywnego, koniugacji i sporulacji [92].

β -Glukanazy wytwarzane przez grzyby nitkowate, czy promieniowce są słabiej scharakteryzowane w porównaniu z glukanazami drożdży i bakterii. *Penicillium italicum* wytwarza wraz z trzema, różniącymi się sposobem działania, 1,3- β -glukanazami także 1,6- β -glukanazę [93-96]. U *Asp. niger* stwierdzono znaczny udział 1,3- β -glukanazy w procesie autolizy. W ostatnich latach opublikowano kilka informacji o β -glukanazach wytwarzanych przez promieniowce. Kasuma i in. [97] wyizolował z cieczy pohodowlanej *Streptomyces* sp. 1,3- β -glukanazę degradującą wyższe oligosacharydy, a w ograniczonym zakresie także i laminaradekstryny. Bielecki i in. [98, 99] otrzymali lityczną 1,3- β -glukanazę hydrolizującą laminaraoligosacharydy o stopniu polimeryzacji 4 i wyższym. Beyer i in. [100] rozfrakcjonowali trzy glukanazy wytwarzane przez *Streptomyces* sp. ATCC 11238.

Różnorodność glukanaz wśród drobnoustrojów dotyczy nie tylko ich właściwości i sposobu atakowania substratów, ale także zróżnicowanej regulacji ich wytwarzania. Biosynteza 1,3- β -glukanaz u *Pen. italicum* podlega katabolicznej represji glukozowej [93, 94]. Synteza glukanaz *Neurospora crassa* [101] oraz niektórych *Basidiomycetes* [102] jest również objęta represją katabolityczną. Natomiast synteza β -glukanaz wytwarzanych przez *Sacch. cerevisiae* i *Trich. viride* wydaje się nie podlegać represji glukozowej [101]. Obecność glukozy nie obniża zdolności

biosyntezy 1,3- β -glukanazy przez mutantu *Arthr. luteus* M12-203. Efektywność biosyntezy tego enzymu wzrastała w obecności 1,3- β -glukanu i ketoheksozy [51].

8. MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA DROBNOUSTROJOWYCH ENZYMÓW LITYCZNYCH

Wzrastające zainteresowanie enzymami litycznymi jest związane z wielostronnymi możliwościami ich praktycznego wykorzystania. Można je stosować jako swoiste narzędzia ułatwiające poznanie biologii molekularnej drobnoustrojów, a w szczególności poznanie struktury i funkcji biopolimerów ściany komórkowej. Już obecnie w większości laboratoriów badawczych do otrzymywania protoplastów z bakterii, drożdży czy grzybów mikroskopowych stosuje się drobnoustrojowe enzymy lityczne. W większej skali ten typ enzymów umożliwia izolację wewnątrzkomórkowych składników mikroorganizmów. Szczególnie duże znaczenie przypisuje się enzymom powodującym zymolizę komórek drożdży.

Ściana komórkowa drożdży uniemożliwia właściwe wykorzystanie wysokowartościowego białka wewnątrzkomórkowego. Nienaruszone polisacharydowe kompleksy ściany komórkowej znacznie obniżają strawność drożdży, gdyż uniemożliwiają penetrację enzymów proteolitycznych z przewodu pokarmowego zwierząt do wnętrza komórki drożdży [103]. Ponadto ściana komórkowa może zawierać substancje alergogenne, jak również czynniki wywołujące nudności i zaburzenia żołądkowo-jelitowe [104]. Z wymienionych powodów, jak również ze względu na potencjalne możliwości zastosowania białek drożdży, wynika konieczność oddzielenia lub destrukcji składników ściany komórkowej drożdży.

Wewnątrzkomórkowe składniki drożdży można uwalniać przez autolizę, plazmolizę, obróbkę mechaniczną lub chemiczną [105, 106]. Ujemną cechą autolizy jest jej długi czas trwania, niska wydajność odzysku białka i wysoki koszt procesu. Podstawowymi problemami związanymi z obróbką chemiczną przy pomocy mocznika czy butanolu jest odzysk stosowanych chemikaliów oraz potencjalna toksyczność otrzymanych preparatów białkowych, a także koszt procesu. Traktowanie drożdży alkalicznymi, mimo iż osłabia ścianę komórkową i zwiększa rozpuszczalność białek, powoduje jednocześnie ich hydrolizę, depolimeryzację, recemizację, reakcje β -eliminacji, denaturację, a także utratę pożądanych właściwości fizykochemicznych [104, 107]. Obróbka mechaniczna przy pomocy ultradźwięków, rozbijanie komórek pod działaniem wysokich ciśnień, czy rozcieranie w obecności kuleczek szklanych mają ograniczone stosowanie tylko do skali laboratoryjnej ze względu na niedostępność i cenę urządzeń, jak również występującą denaturację białka [108, 109].

Odzysk wewnątrzkomórkowych składników ma duże znaczenie w nowoczesnych procesach biotechnologicznych. Niektóre białka czy peptydy o istotnym znaczeniu w lecznictwie, czy różnych dziedzinach gospodarki, uzyskuje się lub próbuje się uzyskiwać, przez skonstruowanie specjalnych szczepów drożdży technikami rekombinacji DNA. Sekrecja tych obcych dla drożdży białek z komórki drożdżowej najczęściej jest bardzo ograniczona lub niemożliwa [110]. Dobór odpowiedniego kompleksu enzymów litycznych może zapewnić izolację z wnętrza komórki drożdży zarówno białek naturalnie syntetyzowanych, jak i tych, których synteza kierowana jest przez klonowane geny. Enzymy lityczne z powodzeniem zastosowano do izolacji polisacharydów i glikoprotein ze ściany komórkowej drożdży, a także do izolacji inwertazy i pigmentów drobnoustrojów [111]. Hayashi i in. [5] sugerują zastosowanie enzymów litycznych jako środka konserwującego żywność. Wyizolowany przez nich szczep *Str. rutgersensis* H-46 wytwarza pozakomórkowy kompleks enzymów litycznych nazwany SR-1, aktywny w stosunku do *Str. faecalis*, *Lactobacillus* sp. i *Pediococcus* sp. Valisena i in. [11] przypisują enzymom litycznym, wytwarzanym przez rodzaj *Staphylococcus*, wpływ na patogenność tych bakterii. Poszczególne gatunki *Staphylococcus* wytwarzają różne kompleksy enzymów litycznych. Dokładna analiza tych kompleksów może być użyteczna przy diagnostyce tych patogennych organizmów.

Interesujący jest fakt synergicznego działania kompleksu enzymów litycznych i antybiotyków. Macmillan [112] otrzymał z *Oerskovia xanthineolytica* kompleks enzymów litycznych składający się z mannanazy, dwóch 1,3- β -glukanaz, proteinazy, niewielkiej ilości chitynazy, 1,6- β -glukanazy i β -glukozydazy. Kompleks ten wraz z amfoterycyną B skutecznie działał na *Candida albicans*. Aktywność lityczna tej mieszaniny była 6-krotnie większa niż samej amfoterycyny B. Stwarza to możliwości stosowania odpowiedniego kompleksu lizoenzymów w chemoterapii przy zakażeniach drożdżakami.

Dokładniejsze poznanie roli enzymów litycznych w cyklu rozwojowym drobnoustrojów, w antagonizmie między różnymi organizmami, jak również określenie ich specyficzności i mechanizmów działania w procesach zymolizy oraz opracowanie tanich technologii ich biosyntezy i oczyszczania, umożliwi szersze zastosowanie drobnoustrojowych enzymów litycznych w nowoczesnych procesach biotechnologicznych.

LITERATURA

1. Ghuyssen J. M. — Bacteriol. Rev. 32: 425, 1968.
2. Stryer L. — Biochemistry s. 774, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1981.
3. Salton M. R. J. — Bacteriol. Rev. 21: 82, 1957.

4. Ghuysen J. M., Strominger J. L. — *Biochemistry* 2: 1110, 1963.
5. Hayashi K., Kasumi T., Kubo N., Tsumara N. — *Agric. Biol. Chem.* 48: 465, 1984.
6. Harada S., Sarma R., Kakudo M., Hara S., Ikenaka T. — *J. Biol. Chem.* 256: 11600, 1981.
7. Grutter M. G., Weaver L. M., Matthews B. — *Nature* 303: 828, 1983.
8. Hayashi K., Kasumi T., Kubo N., Tsumara N. — *Agric. Biol. Chem.* 47: 2645, 1983.
9. Barkulius S. S., Smith C., Boltralik J., Heyman J. — *J. Biol. Chem.* 239: 4027, 1964.
10. Shindler C. A., Schuhardt V. T. — *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51: 414, 1964.
11. Valisena S., Varaldo P. E., Satta G. — *J. Bacteriol.* 151: 636, 1982.
12. Pelzer H. — *Z. Naturforsch.* 186: 950, 1963.
13. Young F. E., Tripper D. J., Strominger J. L. — *J. Biol. Chem.* 239: 3600, 1964.
14. Ghuysen J. M., Tipper D. J., Birge C., Strominger J. L. — *Biochemistry* 4: 2245, 1965.
15. Ensign J. C., Wolfe R. S. — *J. Bacteriol.* 91: 524, 1966.
16. Martin H. H., Kemper S. — *J. Bacteriol.* 102: 347, 1970.
17. Murao S., Takahara Y. — *Agric. Biol. Chem.* 38: 2305, 1974.
18. Yoshimoto T., Hayashida S., Yamasaki H., Tsura D. — *J. Ferm. Technol.* 53: 703, 1975.
19. Suzuki K., Uyeda M., Shibata M. — *Agric. Biol. Chem.* 49 (10): 3049, 1985.
20. Suzuki K., Uyeda M., Shibata M. — *Agric. Biol. Chem.* 49 (6): 1719, 1985.
21. Pawłowa I. N., Zholner L. G. — *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* 21 (5): 649, 1985.
22. Fieofilowa E. P. — *Kletocznaja stienka gribow.* Nauka, Moskwa, 1983.
23. Kidby D. K., Davies R. — *J. Gen. Microbiol.* 61: 327, 1970.
24. Misaki A., Johanson Jr. J., Kirkwood S., Saaletti J. V., Smith F. — *Carbohydr. Res.* 6: 150, 1968.
25. Manners D. J., Masson A. J., Patterson J. C. — *Biochem. J.* 135: 19, 1973.
26. Manner D. J., Masson A. J., Patterson J. C. — *Biochem. J.* 135: 31, 1973.
27. Bacon J. S. D., Farmer V. C., Jones D., Taylor I. F. — *Biochem. J.* 114: 557, 1969.
28. Fleet G. M., Manners D. J. *J. Gen. Microbiol.* 98: 315, 1977.
29. Fleet G. H., Manners D. J. — *J. Gen. Microbiol.* 97: 180, 1976.
30. Kreger D. R., Kopecka M. — *J. Gen. Microbiol.* 108: 269, 1978.
31. Kreger D. R. — *Biochem. Biophys. Acta* 13: 1, 1954.
32. Hayasibe M., Kathoda S. — *J. Gen. Microbiol.* 19: 23, 1973.
33. Vrsanska M., Krakty Z., Biely P., Machala J. — *Z. Allg. Microbiol.* 19 (5): 357, 1979.
34. Stewart T. S., Ballou C. E. — *Biochemistry* 7: 1855, 1968.
35. Cabilo E. — *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 191, 1975.
36. Harada T. C., Nakajima T., Izake K., Matsuda K. — *Eur. J. Biochem.* 365: 1192, 1981.
37. Peberdy I. F. — *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21, 1979.

38. Parodi A. J. — J. Biol. Chem. 254: 8343, 1979.
39. Phaff H. J. — Adv. Chem. Ser. 160: 244, 1977.
40. Salton M. R. J. — J. Gen. Microbiol. 12: 25, 1955.
41. Gascon S., Ochoa A. G., Novaes M., Aïllanueva J. R. — Arch. Microbiol. 51: 156, 1965.
42. Horikoshi K., Sakaguchi K. — J. Gen. Appl. Microbiol. 4: 1, 1958.
43. Tanaka H., Phaff H. J. — J. Bacteriol. 89: 1570, 1965.
44. Yamamoto S., Nagasaki S. — J. Ferm. Technol. 50: 127, 1972.
45. Bacon J. S. O., Gordon A. H., Jones D., Taylor I. F. — Biochem. J. 120: 67, 1970.
46. Yanai S., Ishikawa M., Tsumura N. — J. Ferment. Technol. 51: 209, 1973.
47. Kitamura K., Kaneko T., Yamamoto Y. — Arch. Biochem. Biophys. 145: 402, 1971.
48. Doi K., Doi A., Fukui T. — J. Biochem. 70: 711, 1971.
49. Muellner J., Rohr M. — Proceedings of the Fourth International Symposium on Yeast, s. 119, Wiedeń, 1974.
50. Blechschmidt D., Gohr C., Troeger R. — Z. Allg. Mikrobiol. 22: 443, 1982.
51. Kitamura K. — J. Ferm. Technol. 60 (3): 253, 1982.
52. Kitamura K. — J. Ferm. Technol. 60 (3): 257, 1982.
53. Vrsanska M., Biely P., Kratky Z. — Z. Allg. Mikrobiol. 17: 465, 1977.
54. Vrsanska M., Kratky Z., Biely P. — Z. Allg. Mikrobiol. 17: 391, 1977.
55. Obata T., Iwata H., Namba Y. — Agric. Biol. Chem. 41: 2387, 1977.
56. Yamamoto S., Shiraishi T., Nagasaki S. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 1802, 1972.
57. Yamamoto S., Kobayashi R., Nagasaki S. — Agr. Biol. Chem. 38: 1493, 1974.
58. Yokotsuka K., Goto S., Yokotsuka J., Kushida T. — J. Ferm. Technol. 52: 701, 1974.
59. Tiunova N. A., Zloba N. M., Sidorova I. I. — Mikrobiologija 52: 723, 1983.
60. Bielecki A., Galas E. — W: *Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial protein*. s. 203, Ghose M. (red.) IIT, Delhi, 1977.
61. Yamamoto R., Arai M., Murao S. — Agric. Biol. Chem. 42: 1593, 1978.
62. Yamamoto S., Fukujama J., Nagasaki S. — Agr. Biol. Chem. 38: 329, 1974.
63. Nagasaki S., Fukujama I., Yamamoto S., Kobayashi K. — Agr. Biol. Chem. 38: 349, 1974.
64. Kobayashi R., Miwa T., Yamamoto S., Nagasaki S. — Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 14, 1982.
65. Villanueva J. R., Gacto M., Sierra S. M. — W: *Yeast mold and plant protoplasts*. s. 3, Villanueva J. R., Garcia-Acha I., Gascon S., Uruburu F. (red.) Academic Press Inc., N. York, 1973.
66. Jamroz J. — Enzymatyczna hydroliza ścian komórek drożdży. Przem. Spoż. 32 (7): 245, 1978.
67. McLellan W. L., Lampen J. O. — J. Bacteriol. 95: 967, 1968.
68. McLellan W. L., Mc Daniel L. E., Lampen J. O. — J. Bacteriol. 102: 261, 1970.

69. Shibata N., Mizugami K., Takano K., Suzuki S. — *J. Bacteriol.* 156: 552, 1983.
70. Kitamura K. — *Agric. Biol. Chem.* 46: 2093, 1982.
71. Zlotnik H., Fernandez M. P., Bowers B., Cabib E. — *J. Bacteriol.* 159: 1018, 1984.
72. Takahara Y., Machigaki E., Murao A. — *Agric. Biol. Chem.* 38: 2349, 1977.
73. Nagasaki S., Saito K., Yamamoto S. — *Agric. Biol. Chem.* 41: 493, 1977.
74. Abd-El-Al A. T., Phaff H. J. — *Biochem. J.* 109: 347, 1968.
75. Rey F. J., Villa T. G., Santos T., Garcia-Acha I., Nombela C. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 1347, 1982.
76. Mori H., Yamamoto S., Nagasaki S. — *Agr. Biol. Chem.* 41: 611, 1977.
77. Fleet G. H., Phaff H. J. — *J. Biol. Chem.* 1717: 249, 1974.
78. Kobayashi Y., Tanaka H., Ogasawara N. — *Agr. Biol. Chem.* 38: 959, 1974.
79. Villa T. G., Notario V., Villanueva I. R. — *Biochem. J.* 177: 107, 1979.
80. Kitamura K., Kaneko T., Yamamoto Y. — *J. Gen. Appl. Microbiol.* 20: 323, 1974.
81. Rombouts F. M., Phaff H. J. — *Eur. J. Biochem.* 63: 121, 1976.
82. Meyer M. T., Phaff H. J. — *J. Bacteriol.* 131: 702, 1977.
83. Fleet G. H., Phaff H. J. — *Biochem. Biophys. Acta* 401: 318, 1975.
84. Notario V., Villa T. G., Villanueva J. R. — *Biochem. J.* 159: 555, 1976.
85. Villa T. G., Notario T., Benitez T., Villanueva J. R. — *Can. J. Biochem.* 54: 927, 1976.
86. Rombouts F. M., Phaff J. H. — *Eur. J. Biochem.* 63: 121, 1976.
87. Marshall J. J. — *Anal. Biochem.* 53: 191, 1973.
88. Firantene R. K., Avizhenis V. J., Tinuova N. A. — *Biochimja* 46 (4): 603, 1980.
89. Borriss R., Noack D., Genther R. — *Z. Allg. Microbiol.* 22 (5): 293, 1982.
90. Horikoshi K., Koffler H., Arima K. — *Biochim. Biophys. Acta* 384: 477, 1975.
91. Hien N. H., Fleet G. H. — *J. Bacteriol.* 156: 1204, 1983.
92. Hien N. H., Fleet G. H. — *J. Bacteriol.* 156: 1214, 1983.
93. Santos T., Sanchez M., Villanueva J. R., Nombela C. — *J. Bacteriol.* 133: 465, 1978.
94. Santos T., Villanueva J. R., Nombela C. — *J. Bacteriol.* 133: 542, 1978.
95. Santos T., Nombela C., Villanueva J. R., Larriba G. — *Arch. Microbiol.* 121: 265, 1979.
96. Lahoz R., Fuensanta Reyes, Gomez P., Martinez M. J. — *Z. Allg. Mikrobiol.* 23: 17, 1983.
97. Kusama S., Kusakabe I., Murakami K. — *Agr. Biol. Chem.* 50: 1101, 1986.
98. Bielecki S., Antczak T., Galas E. — *Zeszyty Naukowe PŁ, Technologia i Chemia Spożywcza* 361: 211, 1980.
99. Bielecki S., Antczak T., Galas E. — *IIIrd Congress on Biotechnology. T. II, s. 489. Verlag Chemie Weinheim, 1984.*

100. Beyer M., Diekman H. — *Appl. Mikrobiol. Biotechnol.*, 1984.
101. Rey F. J., Garcia-Acha I., Nombela C. — *J. Gen. Microbiol.* 110: 83, 1979.
102. Friebe B., Halldorf W. W. — *J. Bacteriol.* 122: 81, 1975.
103. Omstedt P. T., A van der Decken, Henelskog G., Morgen H. — *J. Sci. Food Agric.* 24: 1103, 1974.
104. Shetty K. J., Knisella J. E. — *J. Food Sci.* 44: 633, 1979.
105. Morgen H., Indblom M. — *Biotechnol. Bioeng.* 16: 261, 1974.
106. Vananuvat P., Knisella J. E. — *J. Agric. Food Chem.* 23: 216, 1975.
107. Vananuvat P., Knisella J. E. — *Biotechnol. Bioeng.* 20: 1329, 1978.
108. Cunningham S. D., Cater C. M., Mattil K. E. — *J. Food Sci.* 40: 732, 1975.
109. Vananuvat P., Knisella J. E. — *J. Agric. Food Chem.* 23: 613, 1976.
110. Brake A. J., Merryweather J. P., Coit D., Heberlein U., Masiarz F. R., Mullenbach G. T., Valenzuela P., Barr P. J. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642, 1984.
111. Hunter J. B., Asenja J. A. — *Biotech. Bioeng.* 30: 481, 1987.
112. Macmillan I. D. — IV International Symposium on Yeast. Wiedeń, Austria, 1974.

PIOTR MOSZCZYŃSKI

Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka

BIOSYNTeza WITAMIN

Zwiększająca się produkcja witamin jest dobitnym potwierdzeniem ich znaczenia jako środków terapeutycznych i jako czynników wzrostowych. Znajdują one szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i paszowym. W tym ostatnim do wzbogacania pasz można wykorzystywać znacznie tańsze preparaty o niższym stopniu czystości, uzyskując znaczące efekty w produkcji mięsa, mleka i jaj.

Ekonomiczne znaczenie witamin najlepiej ilustrują dane dotyczące wielkości produkcji w świecie i ich średnich cen rynkowych (tab. 1).

Tabela 1

Światowa produkcja i ceny witamin [1]

Witamina	Produkcja (t/rok)	Średnia cena (\$/kg)
A	2500	70
Beta-karoten	100	450
D	25	350
E	6800	17
K	1,3	1500
Tiamina	1700	23
Ryboflawina	2000	27
Pirydoksyna	1600	25
B ₁₂	12	5000
Kwas pantotenowy	5000	4
Kwas nikotynowy i jego amid	8500	4
Kwas foliowy	100	65
Biotyna	2,7	5000
Kwas L-askorbinowy	40000	8

Jak widać z tej tabeli wartość rocznej światowej produkcji witamin wynosi około 1 miliarda dolarów, przy czym na kwas L-askorbinowy przypada trzecia część tej wartości.

Witaminy mogą być otrzymywane następującymi metodami:

— przez wyodrębnianie z produktów roślinnych i zwierzęcych, zawierających znaczne ilości witamin lub ich prekursorów;

- syntezy chemicznej;
- syntezy mikrobiologicznej;
- skojarzonej syntezy chemiczno-mikrobiologicznej.

Wszystkie znane witaminy mogą być wyodrębniane ze źródeł naturalnych, które niekiedy zawierają stosunkowo duże ich ilości. Na przykład można tu wymienić spośród produktów zwierzęcych — tłuszcz wątroby ryb i zwierząt morskich, wątrobę bydła rogatego oraz przetwory mleczne i jaja, a spośród produktów roślinnych — warzywa i owoce, olej z zarodków pszenicy lub kukurydzy, otręby pszenne i ryżowe, a także kapustę, szpinak, marchew i owoce cytrusowe. Bogatym źródłem witamin są również mikroorganizmy, a w szczególności drożdże piwne i piekarskie.

Z praktycznego punktu widzenia pierwszy z wymienionych wyżej sposobów jest mało racjonalny i obecnie nie ma już większego znaczenia, tym bardziej, że zasoby surowcowe są ograniczone, a w niektórych przypadkach wręcz wyczerpane, jak np. tłuszcz wątroby wielorybów, których połowy są zakazane ze względu na konieczność ochrony gatunku przed ostateczną zagładą.

Spółród pozostałych metod najszersze zastosowanie znalazła synteza chemiczna, ale biosynteza, a zwłaszcza skojarzone procesy chemiczno-biotechnologiczne mają niemałe znaczenie, które w miarę rozwoju inżynierii genetycznej i upowszechniania jej metod do ulepszania cech mikroorganizmów — producentów witamin — będzie wzrastało.

Obecnie mikrobiologiczna synteza może konkurować z chemiczną jedynie w odniesieniu do dwóch witamin, a mianowicie cyjanokobalaminy i ryboflawiny. Uwzględniając jednak intensywne badania w zakresie biosyntezy tych związków, szczególnie zaś niektórych prowitamin, np. beta-karotenu i ergosterolu, a także całego szeregu koenzymów, których istotnym elementem strukturalnym są właśnie witaminy, można mieć nadzieję na uzyskanie w niedalekiej przyszłości wyników, zapewniających metodom biotechnologicznym konkurencyjność w stosunku do syntezy chemicznej.

Duże perspektywy mają zwłaszcza skojarzone metody chemiczno-mikrobiologiczne. Doskonałym przykładem ich stosowania w praktyce jest otrzymywanie kwasu L-askorbinowego z glukozy.

WITAMINA B₁₂

Witamina ta należy do grupy związków zwanych ogólnie kobaltokorynoidami. W jej cząsteczce występuje układ tetrapiolowy bardzo zbliżony pod względem budowy do charakterystycznego elementu składo-

wego porfiryn, stanowiących trzon tak ważnych biologicznie substancji, jak hem i chlorofil.

Naturalne źródła tej witaminy są bardzo ograniczone, albowiem w świecie roślinnym jej nie znaleziono, a w tkankach zwierzęcych występuje ona w znikomych ilościach. Najlepszym przykładem ilustrującym ten fakt jest wątroba bydłęca, będąca najbogatszym źródłem witaminy B₁₂, aczkolwiek zawiera zaledwie 1 mg/kg tego cennego związku. Natura niejako rekompensuje nam tę szczupłość zasobów niezmiernie wysoką, rzadko spotykaną w przyrodzie aktywnością biologiczną witaminy B₁₂.

Dość powiedzieć, że dla całkowitego pokrycia zapotrzebowania ludności Polski na tę witaminę wystarczy jej około 15 kg rocznie.

W 1948 roku witaminę B₁₂ po raz pierwszy otrzymano w czystej, krystalicznej postaci, a surowcem była wątroba bydłęca. W kilka lat potem wyodrębniono ją ze źródeł bogatych w biomasę drobnoustrojową, takich jak: tzw. osad czynny zbiorników wód ściekowych, ciecz pofermentacyjna po produkcji antybiotyków przez *Streptomyces* itp. Później wyselekcjonowano szczepy o wysokiej aktywności kobalamidotwórczej przydatne do przemysłowej produkcji tej witaminy.

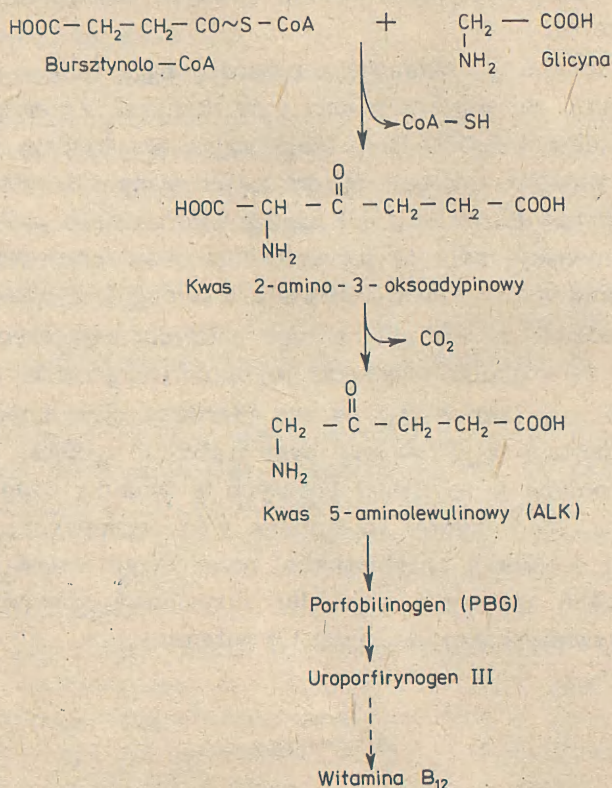
BIOSYNTeza

Na podstawie zgromadzonej dotychczas wiedzy można uznać, że wszystkie żywe organizmy wykorzystują do tworzenia porfiryn ten sam mechanizm, niezależnie od tego czy produktem finalnym jest chlorofil czy też hem. Najprawdopodobniej pierwsze stadia biosyntezy porfiryn i koryny (makropierścienia wchodzącego w skład witaminy B₁₂ i jej pochodnych) są identyczne i obejmują następujące etapy:

- biogenezę kwasu 5-aminolewulinowego (ALK);
- tworzenie monopirolowego prekursora, tj. porfobilinogenu (PBG) oraz
- powstawanie układu tetrapirolowego, czyli tzw. makropierścienia.

Dzięki licznym, pogłębionym badaniom [2-6] poznane zostały, aczkolwiek nie we wszystkich szczegółach, drogi biosyntezy witaminy B₁₂, które w zarysie ilustruje schemat (rys. 1).

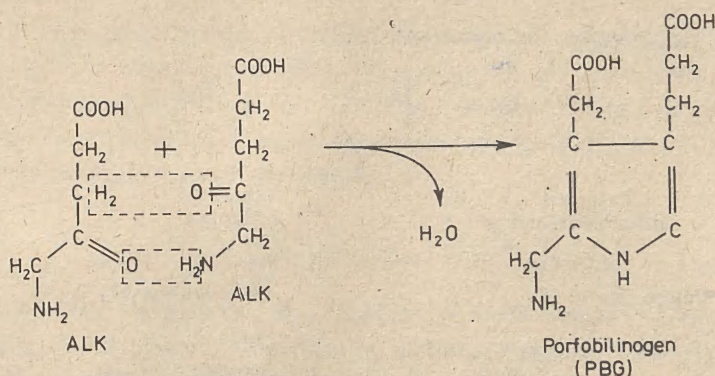
Kwas 5-aminolewulinowy może być syntezowany na dwóch różnych szlakach. Pierwszy — podstawowy szlak, charakterystyczny dla organizmów zwierzęcych, a być może również dla drobnoustrojów, oparty jest na działaniu enzymu zwanego syntazą 5-aminolewulinianową, który katalizuje tworzenie się ALK z bursztynylo-CoA i glicyny. Reakcja ta

Rys. 1. Uproszczony schemat biosyntezy witaminy B₁₂

zachodzi przy udziale fosforanu pirydoksału, przy czym powstaje związek pośredni o charakterze zasady Schiffa.

W przypadku wodorostów i roślin wyższych przeważająca część, jeżeli nie cała ilość, ALK tworzy się w wyniku transaminacji, w której uczestniczy kwas 4,5-dioksowalerianowy jako biorca grupy aminowej oraz odpowiedni aminokwas spełniający rolę dawcy tej grupy. Omawiana reakcja jest katalizowana przez aminotransferazę aminolewulinianową.

Następnie w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek ALK tworzy się pierścieniowy związek porfobilinogen. W procesie tym zachodzą następujące reakcje: kondensacja aldolowa, dehydratacja i tworzenie się przejściowej zasady Schiffa. Przemiany te są katalizowane przez dehydratazę aminolewulinianową zwaną również syntazą porfobilinogenową, a ich produktem końcowym jest porfobilinogen (rys. 2).



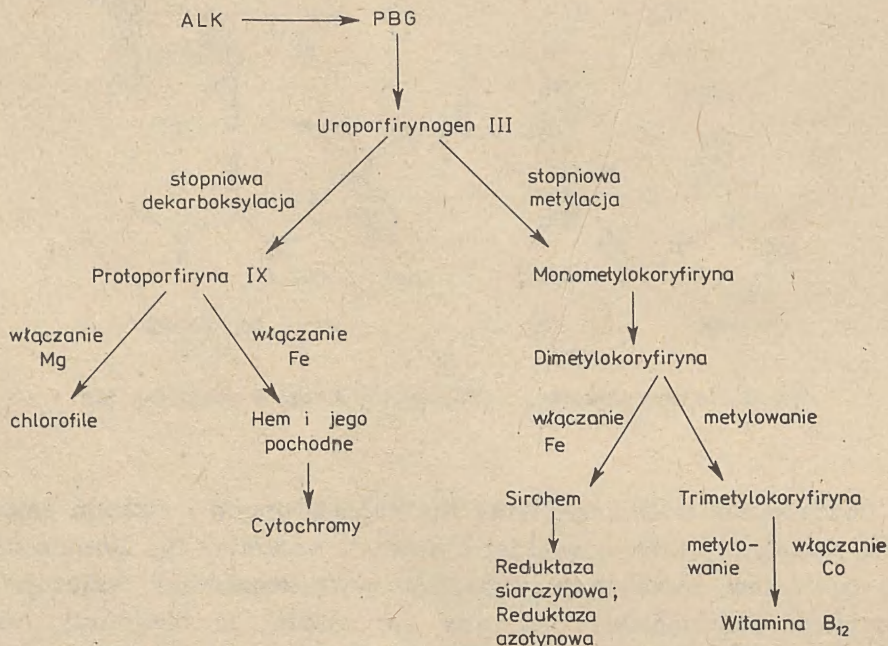
Rys. 2. Konwersja kwasu 5-aminolewulinowego w porfobilinogen

Powstawanie makropierścienia jest najciekawszym i zarazem najbardziej złożonym procesem w całej biosyntezie witaminy B₁₂. Rozmieszczenie łańcuchów bocznych w cząsteczce cyjanokobalaminy wskazuje na zasadnicze podobieństwo biogenezy korynoidów do biosyntezy hemu i chlorofilu. Korynowy makropierścień pochodzi od ALK i PBG, a zatem początkowe etapy tworzenia się koryn i porfiryn są identyczne. Rozgałęzienie szlaków biosyntetycznych następuje na etapie uroporfirynogenu III, z którego powstaje bądź to protoporfiryna IX, będąca prekursorem chlorofilów, hemu i jego pochodnych oraz cytochromów, bądź to monometylokoryfiryna — pierwszy produkt metylowania, leżący na szlaku prowadzącym do witaminy B₁₂ (rys. 3).

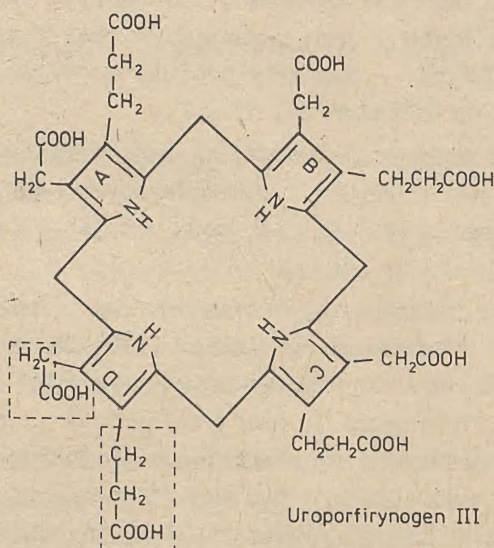
Jak już wspomniano, tworzenie się uroporfirynogenu III z czterech cząsteczek PBG jest procesem bardzo złożonym i do chwili obecnej jest przedmiotem intensywnych badań, podobnie jak i dalsze etapy biosyntezy witaminy B₁₂.

Tetrapirolowy makropierścień tworzy się z czterech identycznych monopirolowych fragmentów w formie PBG. Zwykła kondensacja wg zasady „głowa do ogona” czterech cząsteczek PBG doprowadziłaby do powstania uroporfirynogenu I, zazwyczaj jednak pierwszym cyklicznym tetrapirolem, wydzielanym w charakterze produktu pośredniego w procesie biosyntezy chlorofilu i hemu jest inny izomer, a mianowicie uroporfirynogen III, w którym rozmieszczenie łańcuchów bocznych w jednym z czterech pierścieni pirolowych jest formalnie odwrotne (rys. 4).

Wyniki badań układów enzymatycznych biosyntezy witaminy B₁₂ wskazują, że witamina ta, w odróżnieniu od hemu, nie wpływa na



Rys. 3. Biogeneza związków tetrapirolowych

Rys. 4. Budowa uroporfirynogenu III — prekursora witaminy B₁₂. W pierścieniu D łańcuchy boczne znajdują się w pozycji formalnie odwrotnej

aktywność enzymów biorących udział w tworzeniu pierścienia porfirynowego. W 1979 r. Bychowski [7] wykazał, że u *Propionibacterium shermanii* proces biosyntezy witaminy B₁₂ podlega regulacji poprzez oddziaływanie kobalaminy (i innych koryn) na etapie pierwszego metylowania i tworzenia się monometylokoryfiry.

BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA

Do produkcji witaminy B₁₂ można wykorzystywać wiele różnych mikroorganizmów [8-10]. Jednakże w praktyce przemysłowej stosowane są tylko nieliczne, wśród których w ostatnich latach największe znaczenie mają bakterie propionowe (*Propionibacterium shermanii* i *P. freudenreichii*) oraz *Pseudomonas denitrificans*. Rosną one na podłożach węglowodanowych i szybko się rozmnażają, przy czym wyselekcjonowane z nich mutanty wyróżniają się wysoką zdolnością kobalaminotwórczą. Jednocześnie z poszukiwaniem coraz bardziej produktywnych szczepów prowadzono prace zmierzające do zastąpienia węglowodanów tańszymi składnikami podłoża, a w szczególności odpadami z rolnictwa i z przemysłu spożywczego [11-13].

Wykorzystanie węglowodorów i alkoholi do produkcji witaminy B₁₂ jest przedmiotem szeroko zakrojonych badań, ale substraty te, jak dotąd, nie zapewniają tak dobrych rezultatów, jakie uzyskuje się w przypadku tradycyjnych metod.

Kilka gatunków z rodzaju *Pseudomonas* wykazuje zdolność gromadzenia witaminy B₁₂, jednakże tylko mutanty *P. denitrificans*, wyselekcjonowane przez Miller i Rosenblum [14] są wykorzystywane w przemyśle. Ich początkowa produktywność 0,6 mg/l była w ciągu wielu lat stopniowo zwiększana, aż do około 60 mg/l. Najlepszym źródłem węglowodanów jest dla tych szczepów melasa buraczana, a dodatek do podłoża soli kobaltu i 5,6-dimetylobenzimidazolu (DBI) w istotnej mierze korzystnie wpływa na nagromadzenie witaminy B₁₂.

Również kilka gatunków bakterii propionowych wykazuje zdolność wytwarzania kobaltokorynoidów, przy czym podłoże winno być wzbogacane w sole kobaltu. Produkcja kobalaminy jest w dużym stopniu uzależniona od obecności w podłożu wytworzonego przez te bakterie lub dodanego do pożywki DBI. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że *P. shermanii* i *P. freudenreichii* oraz ich mutanty, wykorzystywane do produkcji witaminy B₁₂, same syntetyzują DBI, aczkolwiek tylko w warunkach dobrego natlenienia. Z drugiej strony wiadomo, że dla uzyskania wysokiej wydajności określona faza procesu musi być prowadzona w warunkach beztlenowych, albowiem witamina B₁₂ powoduje represję na jednym z etapów biosyntezy [7]. Z tego to względu zaleca się prowa-

dzenie pierwszej fazy fermentacji bez aeracji do momentu wyczerpania cukru w podłożu, co sprzyja rozwojowi mikroorganizmu i tworzeniu się kobinamidu, który — w odróżnieniu od witaminy B₁₂ — nie powoduje represji. W następnej fazie procesu środowisko jest napowietrzane, a obecność tlenu indukuje powstawanie DBI i, co za tym idzie, konwersję kobinamidu w kobalaminę. W tych warunkach można uzyskać 30-40 mg witaminy B₁₂ w litrze w stacji pilotowej [14], ale jak niedawno podano w patencie Nippon Oil [15] możliwe jest uzyskanie nawet 65 mg/l.

Jak wynika z niedawno przeprowadzonych badań [16] immobilizowane w żelu alginianowym żywe komórki *Propionibacterium* sp. inkubowane w podłożu zawierającym obok źródeł węgla i azotu sole kobaltu, DBI i Tween 80 mogą produkować do 20 mg/l witaminy B₁₂ w ciągu 5 dni. Komórki takie mogą być kilkakrotnie stosowane i zachowują swoją zdolność do syntezy witaminy B₁₂ niemal przez dwa tygodnie.

W 1985 r. opatentowano [17] sposób otrzymywania szczepu *Pseudomonas ruber* IFO 3708 przez fuzję protoplastów *Protoaminobacter* i *Rhodopseudomonas*. Pierwszy z nich ma wszystkie enzymy niezbędne do syntezy witaminy B₁₂, aczkolwiek tworzenie się syntazy 5-aminolewulinianowej jest u tych bakterii kontrolowane przez pośredni metabolit — protoporfizynę IX i z tego powodu wytwarzają one tylko niewielkie ilości witaminy (0,2-1 mg/l). Drugi z wymienionych drobnoustrojów — *R. spheroides* IFO 12203 — wykazuje zdolność wytwarzania dużych ilości chlorofilu, przy czym synteza kwasu 5-aminolewulinowego z udziałem syntazy 5-aminolewulinianowej nie podlega represji ze strony pośrednich metabolitów. Uzyskany hybryd — *R. protamicus* FERM BP 180 — może rozwijać się na kompleksowym podłożu i wytwarzać 135 mg/l witaminy B₁₂ w ciągu 90 godzin, a dodawanie do podłoża DBI czy te betainy nie jest konieczne.

Wyodrębnianie witaminy B₁₂ z reguły prowadzi się po uprzedniej konwersji wszystkich kobalamin w cyjanokobalaminę pod działaniem cyjanku potasowego. Wszystkie opisane w literaturze metody wydzielania obejmują dwa główne etapy:

1. Rozpuszczanie kobalamin i przekształcanie ich w cyjanokobalaminę. Ciecz pofermentacyjną wraz z komórkami, bądź też zawiesinę wyodrębnionych uprzednio komórek ogrzewa się w temperaturze 80-120°C, przy pH 6,5-8,5 przez 10-30 minut, w wyniku czego komórki ulegają lizie i do roztworu przechodzą różne kobalaminy. Są one przekształcane w cyjanokobalaminę pod wpływem cyjanku potasowego w obecności azotynu sodowego jako czynnika stabilizującego. Następnie pod działaniem wodorotlenku cynkowego usuwa się substancje balastowe.

2. Ekstrakcja produktu o czystości około 80%, który może być z powodzeniem wykorzystany do celów paszowych, lub też poddany dalszemu oczyszczaniu w celu otrzymania preparatu farmaceutycznego o czystości 95-98%.

RYBOFLAWINA

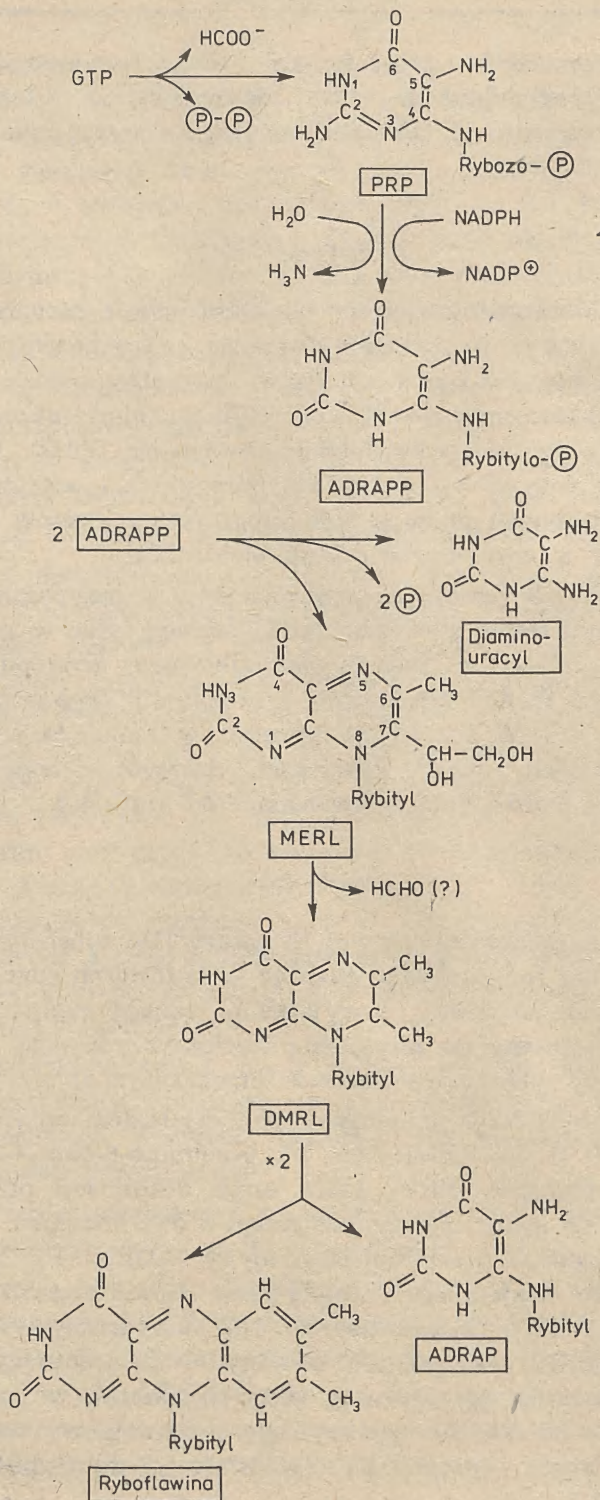
Ryboflawina stanowi połączenie izoaloksazyny, będącej flawiną, z alkoholem D-rybitolem — pochodną D-rybozy i stąd nazwa tej witaminy. W przyrodzie występuje ona zazwyczaj w postaci dwóch koenzymów, a mianowicie 5-fosforanu ryboflawiny czyli mononukleotydu flawinowego^o (FMN) oraz dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD). Wchodzą one w skład wielu enzymów z grupy oksydoreduktaz i odgrywają doniosłą rolę w oksydacyjnych przemianach pirogronianu, kwasów tłuszczowych i aminokwasów, a także w przenoszeniu elektronów.

Ryboflawina jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie, lecz w postaci wolnej znaleziono ją w znacznych ilościach tylko w siatkówce oka, w mleku i w moczu. W formie zestryfikowanej występuje w ziarnie zbóż, nasionach, tkance mięśniowej i niektórych organach, takich jak wątroba, nerki itp. W postaci flawoprotein witamina ta występuje niemal we wszystkich żywych komórkach. Szczególnie bogatym źródłem flawoprotein są drożdże piwne, zawierające 2-5 mg/100 g.

BIOSYNTeza

Zgodnie z najnowszymi danymi literatury [18] substratem w biosyntezie ryboflawiny jest pochodna guaniny — trifosforan guanozyny (GTP), którego pierścień purynowy, z wyjątkiem jednego atomu węgla w pozycji 8, jest włączany do pierścienia izoaloksyazynowego. Poszczególne etapy biosyntezy ryboflawiny ilustruje schemat (rys. 5).

Jak widać trifosforan guanozyny pod działaniem enzymu — cyklohydrolazy GTP II przekształca się w 2,5-diamino-6-okso-4-(5'-fosforybityloamino)-pirymidynę (PRP), która ulega deaminacji przy C-2 i redukcji w obrębie grupy rybozyloaminowej z wytworzeniem 5-amino-2,6-diokso-4-(5'-fosforybityloamino)-pirymidyny (ADRAP-P). W następnym etapie w wyniku wzajemnego oddziaływania dwóch cząsteczek ADRAP-P powstaje jedna cząsteczka 6-metylo-7-(1',2'-dihydroksyetylo)-8-rybitylo-lumazyny (MERL) oraz produkt uboczny — diaminouracyl, czemu towarzyszy odłączenie się pięciowęglowego fragmentu w postaci D-rybitolu. Następnie od MERL odszczepia się jednowęglowy związek (eliminacja atomu węgla z pozycji 2') i powstaje 6,7-dimetylo-8-rybitylo-lumazyna (DMRL).



Z dwóch cząsteczek tego związku, z których jedna oddaje drugiej czterowęglowy fragment, tworzy się ryboflawina i w charakterze produktu ubocznego ADRAP, który ponownie włącza się do kolejnego cyklu przemian. Konwersja DMRL w witaminę jest katalizowana przez syntazę ryboflawinową.

BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA

Ryboflawinę otrzymuje się na dużą skalę metodą syntezy chemicznej bądź mikrobiologicznej. Znana jest również i szeroko stosowana skojarzona metoda chemiczno-biotechnologiczna oparta na otrzymywaniu D-rybozy w procesie mikrobiologicznym i izoaloksazyny metodą chemiczną z następującym potem połączeniem obydwu tych fragmentów.

Tą ostatnią metodą wytwarza się ponad 50% ryboflawiny. W latach 1974-1975 w japońskiej firmie Takeda wykorzystano do produkcji D-rybozy mutanty szczepów *Bacillus subtilis* i *Bacillus pumilus*, w wyniku czego otrzymano produkt tańszy od uzyskiwanego metodą syntezy chemicznej. Na przykład można podać, że mutant *B. pumilus* IFO 13620 produkuje D-rybozę w ilości 72,3 g/l [19, 20].

Okolo 1/3 światowej produkcji ryboflawiny uzyskuje się w wyniku stosowania procesów biotechnologicznych opartych na wykorzystaniu odpowiednich mikroorganizmów zdolnych do supersyntezy tej witaminy. Do mikroorganizmów takich należą: beztlenowe bakterie rodzaju *Clostridium*, np. *C. acetobutylicum*, nagromadzające w ciągu 4 dni do 0,1 g/l ryboflawiny; drożdże, np. rodzaju *Candida*, nagromadzające w ciągu 6 dni 0,6 g/l witaminy (*C. flarerii*) oraz drobnoustroje zdolne do wytwarzania kilku gramów ryboflawiny w litrze, niekiedy nawet powyżej 10 g. Ta kategoria obejmuje głównie mutanty *Eremothecium ashbyii* i *Ashbya gossypii*, a także otrzymany w wyniku rekombinacji genetycznej szczep *Bacillus subtilis*, przy czym ważną cechą tych nadproducentów ryboflawiny jest ich mała wrażliwość na obecność jonów Fe^{2+} .

W odróżnieniu od *E. ashbyii*, wykazującego dużą skłonność do zmian genetycznych, *Ashbya gossypii* charakteryzuje się znacznie większą stabilnością genetyczną i z tego właśnie względu znajduje szersze zastosowanie, aczkolwiek w początkowym okresie jego zdolność nagromadzania ryboflawiny wynosiła zaledwie 0,3-0,5 g/l i była znacznie mniejsza od takowej u *E. ashbyii* (5,3 g/l) [21, 22]. W wyniku ulepszania przemysłowych szczepów *A. gossypii* i optymalizacji składu podłoża hodowlanego znacznie zwiększono wydajność ryboflawiny (do 10-15 g/l po dziesięciu dniach procesu) [23, 24].

Aktywne szczepy drobnoustrojów wyróżniające się dużą nadprodukcją ryboflawiny można otrzymać ze szczepów wyjściowych w wyniku ich mutagenizacji promieniami UV lub chemicznymi czynnikami mutagennymi, takimi jak: azotan uranylu, iperyt azotowy, etylenoimina, etylometanosulfonian i in., oraz selekcji [25].

Zagadnienia dotyczące optymalizacji składu podłoża zostały omówione w kilku publikacjach [26, 27]. Z prac tych wynika, że dobrym źródłem węgla są cukry, lecz jeszcze lepszym oleje roślinne, np. sojowy lub kukurydziany. Jako źródło azotu zalecane są enzymatyczne hydrolizaty białek, zwłaszcza kolagenopodobnych, a także namok kukurydziany, ekstrakt drożdżowy lub wywar gorzelniczny. Te trzy ostatnie substraty są szczególnie cenne, albowiem zawierają szereg czynników wzrostowych, w tym witamin. Wykazano również, że dodatek do podłoża 1-3 g/l glicyny, która jest znanym prekursorem guaniny, zwiększa ilość nagromadzonej ryboflawiny o 10-30%. Malzhahn i in. [28] podają, że w ciągu 5 dni hodowli na odpowiednim podłożu można uzyskać 4,2 g ryboflawiny w litrze.

Radzieccy badacze z WNII Genetika opatentowali niedawno [29] metodę otrzymywania ryboflawiny z zastosowaniem nowego szczepu *B. subtilis*, uzyskanego w wyniku rekombinacji genetycznej przez wprowadzenie do rodzicielskiego szczepu plazmidu zawierającego operon ryboflawinowy. W rezultacie ekspresji tego operonu omawiany szczep nagromadza 4-8 razy więcej witaminy. Rośnie on na prostym podłożu i w odpowiednich warunkach może nagromadzać 4,5 g ryboflawiny w litrze. Podobnie jak w przypadku witaminy B₁₂ metoda wyodrębniania ryboflawiny zależy od przeznaczenia produktu finalnego.

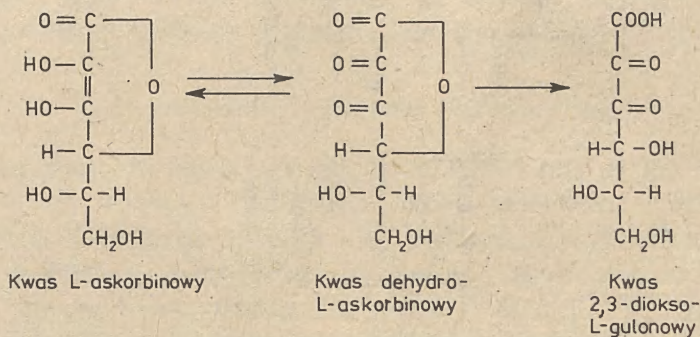
W celu otrzymywania preparatów przydatnych do wzbogacania pasz, ciecz pofermentacyjną po jej zakwaszeniu do pH 4,5 po prostu zagęszcza się i suszy.

Jeżeli produktem końcowym ma być oczyszczona witamina nadająca się do celów leczniczych i spożywczych, to płyn pofermentacyjny po zakwaszeniu do pH 4,5 ogrzewa się w temperaturze 121°C przez 1 godzinę, co powoduje rozpuszczenie ryboflawiny. Po oddzieleniu frakcji nierozpuszczalnej, do roztworu dodawany jest odpowiedni czynnik redukujący, np. chlorek tytanu, w wyniku czego trudniej rozpuszczalna, zredukowana forma ryboflawiny ulega wytrąceniu. Po utlenieniu powietrzem ryboflawinę rozpuszcza się w 10% kwasie solnym, roztwór schładza się i zobojętnia, po czym poddaje krystalizacji [30].

W literaturze naukowej i patentowej opisano wiele innych metod wyodrębniania ryboflawiny, ale wszystkie one oparte są na wykorzystaniu różnej rozpuszczalności utlenionej i zredukowanej formy tej witaminy [31, 32].

KWAS L-ASKORBINOWY

Pod względem swojej struktury kwas L-askorbinowy jest jedną z najprostszych witamin (rys. 6).



Rys. 6. Budowa kwasu L-askorbinowego i jego pochodnych

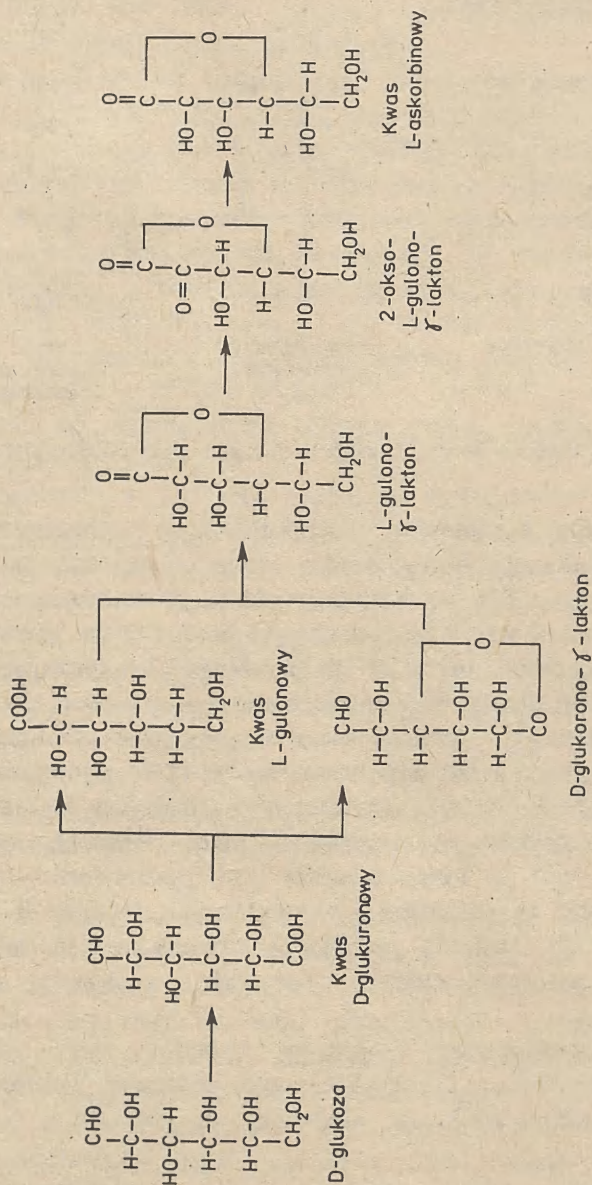
Obecność grupy endiolowej warunkuje silne własności redukujące kwasu L-askorbinowego, który bardzo łatwo utlenia się do kwasu dehydroaskorbinowego. Ten ostatni, szczególnie w roztworach, stopniowo ulega przemianie w kwas 2,3-dikso-L-gulonowy. O ile pierwsza z tych reakcji jest odwracalna, to ta druga przebiega jednokierunkowo i prowadzi do całkowitej utraty aktywności biologicznej witaminy C.

Większość zwierząt syntezuje kwas L-askorbinowy w ilościach całkowicie zaspokajających ich zapotrzebowanie na tę witaminę. Szczególnie obficie występuje ona w wątrobie i nerkach (do 40 mg/100 g). Organizm człowieka i niektórych kręgowców (małp. morskich świnek, pewnych gatunków ryb), a także owadów jest pozbawiony tej zdolności i musi otrzymywać tę witaminę z zewnętrznych źródeł. Są to głównie warzywa (ziemniaki, szpinak, pomidory), zawierające 30-150 mg/100 g oraz owoce (pomarańcze, cytryny, porzeczki, truskawki) zawierające 40-50 mg/100 g.

Niektóre mikroorganizmy — grzyby, drożdże i algi — wytwarzają bardzo małe ilości kwasu L-askorbinowego, natomiast bakterie nie wykazują w ogóle takiej zdolności, albowiem nie potrzebują go do swego rozwoju.

BIOSYNTeza

Mapson [33] i Chatterjee [34] wykazali, że u ssaków, z wyjątkiem naczelnych i niektórych innych, kwas L-askorbinowy tworzy się z glukozy w ciągu przemian przedstawionych na rys. 7.



Rys. 7. Szlak biosyntezy kwasu L-askorbinowego

Utlenianie gulonolaktonu w pozycji C-2 katalizowane jest przez oksydazę L-gulonolaktonową. Enzymu tego nie znaleziono u ludzi.

W roślinach kwas L-askorbinowy powstaje z D-glukozy lub D-galaktozy, być może analogicznie jak u zwierząt. Jeden z możliwych szlaków biosyntezy tej witaminy w roślinach charakteryzuje się tym, że sekwencja atomów węgla zostaje zachowana, tj. łańcuch węglowy nie ulega inwersji, jednakże produkty pośrednie tego procesu nie są znane [35, 36].

BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA

W klasycznej już dzisiaj, powszechnie stosowanej w przemyśle metodzie Reichsteina [37] jeden z etapów procesu to mikrobiologiczna konwersja D-sorbitolu w L-sorbozę, zachodząca przy udziale różnych szczepów z rodzaju *Acetobacter*. Na podłożu zawierającym D-sorbitol (200 g/l), namok kukurydziany (10 g/l) i CaCO_3 (0,5 g/l) *Acetobacter suboxydans* ATCC 621 w ciągu 24 godzin nagromadza około 180 g L-sorbozy w litrze [38]. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że stosowane bakterie są tolerancyjne w stosunku do niklu w stężeniu 10-20 mg/l, co jest bardzo istotne, albowiem D-sorbitol otrzymywany jest z D-glukozy w wyniku jej katalitycznego uwodornienia w obecności niklowego katalizatora i zawsze zawiera określone ilości tego metalu.

Dalsze etapy procesu otrzymywania kwasu L-askorbinowego prowadzone są metodami chemicznymi.

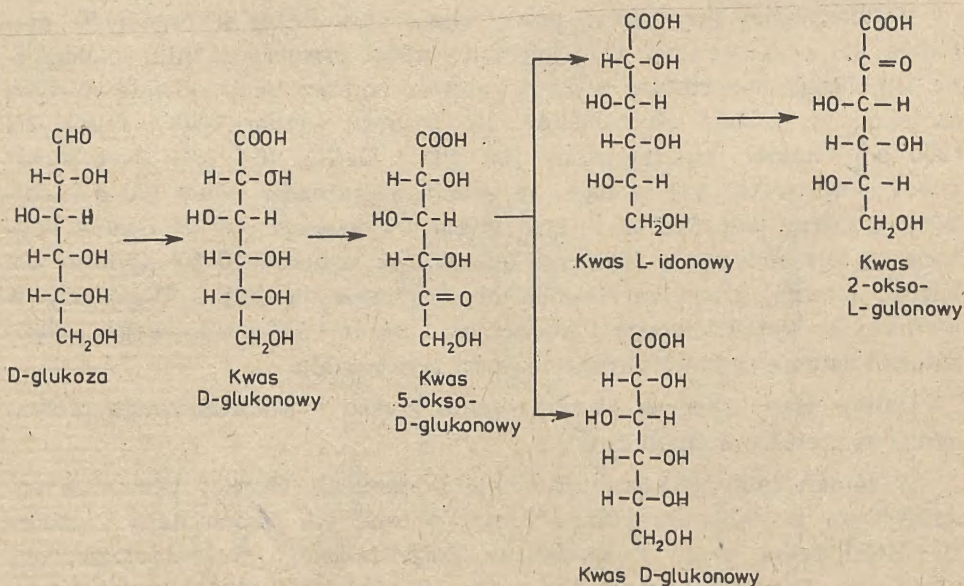
W latach 1960-1975 amerykańskie i japońskie zespoły badawcze podejmowały próby zmniejszenia liczby przejść we wspomnianym procesie Reichsteina przez zastosowanie bezpośredniego mikrobiologicznego utleniania D-sorbitolu lub L-sorbozy do kwasu 2-okso-L-gulonowego, wykorzystując do tego celu różne szczepy *Acetobacter* lub *Pseudomonas* [39]. Próby te nie przyniosły jednak zadowalających rezultatów, albowiem w najlepszym razie uzyskiwano 5 g/l, co odpowiada wydajności 10%.

W 1981 r. grupa chińskich badaczy [40] zakomunikowała o uzyskaniu 37 g kwasu 2-okso-L-gulonowego na podłożu zawierającym 100 g/l L-sorbozy przy użyciu szczepu *Gluconobacter oxydans*. Wynik ten stanowi znaczny postęp w porównaniu z wcześniejszymi pracami.

W odróżnieniu od metody Reichsteina, w której glukoza poddawana jest katalitycznemu uwodornieniu do sorbitolu, znane są procesy bazujące na utlenianiu D-glukozy. Pierwszy z nich polega na utlenianiu glukozy w pozycji C-5 i prowadzi poprzez kwas L-idonowy, drugi zaś — na otrzymywaniu z glukozy kwasu 2,5-diokso-D-glukonowego i jego dalszych przemianach w kwas L-askorbinowy.

Metoda, poprzez kwas L-idonowy, obejmuje trzy kolejne etapy (rys. 8):

1. Mikrobiologiczne utlenianie D-glukozy do kwasu 5-okso-D-glukonowego via kwas D-glukonowy.
2. Chemiczne lub biochemiczne uwodornienie kwasu 5-okso-D-glukonowego do kwasu L-idonowego.
3. Mikrobiologiczne utlenianie kwasu L-idonowego do kwasu 2-okso-L-gulonowego.



Rys. 8. Konwersja D-glukozy w kwas 2-okso-L-gulonowy przez kwas L-idonowy

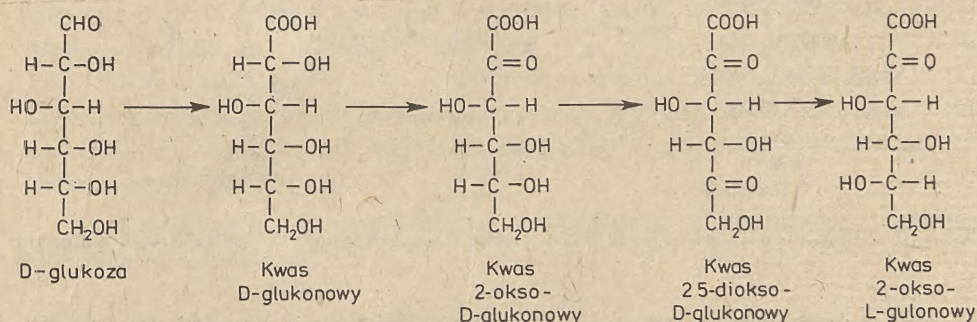
Pierwszy z tych procesów zachodzi łatwo przy udziale *Acetobacter suboxydans* ATCC 621, który zapewnia konwersję 100 g glukozy w litrze w ciągu 33 godzin z wydajnością 90% [41].

Jeżeli chodzi o drugi etap, to raczej stosuje się katalityczne uwodornienie, aczkolwiek w jego wyniku powstaje obok kwasu L-idonowego izomeryczny kwas D-glukonowy, przy czym w najlepszym razie te dwa izomery tworzą się w proporcji 70:30% [42]. Okazało się, że określone mikroorganizmy, takie jak: *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* lub *Acetobacter melanogenum* wykorzystują do swego wzrostu kwas D-glukonowy i jednocześnie przekształcają kwas L-idonowy w kwas 2-okso-L-gulonowy. Stosunkowo dobre rezultaty uzyskano tą metodą w firmie Takeda [43], gdzie 100 g/l mieszaniny zawierającej 70% kwasu L-idono-

wego otrzymano 67 g kwasu 2-okso-L-gulonowego w litrze, jednakże technika ta nie znalazła zastosowania w skali przemysłowej.

Droga poprzez kwas 2,5-diokso-D-glukonowy jest obiektem szerszego zainteresowania od 1970 r. Obejmuje ona tylko dwa etapy (rys. 9):

1. Mikrobiologiczne utlenianie D-glukozy do kwasu 2,5-diokso-D-glukonowego oraz
2. Mikrobiologiczną redukcję kwasu 2,5-diokso-D-glukonowego do kwasu 2-okso-L-gulonowego.



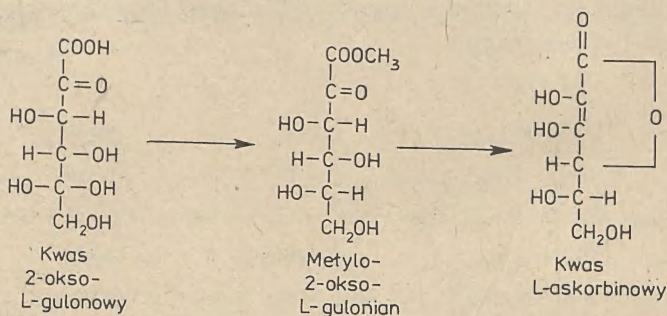
Rys. 9. Konwersja D-glukozy w kwas 2-okso-L-gulonowy przez kwas 2,5-diokso-D-glukonowy

Pierwszy etap nie stwarza poważniejszych problemów, a uzyskiwane wydajności są duże.

Inaczej rzecz się ma, a raczej do niedawna miała, w przypadku drugiego etapu. Dopiero w 1982 r. Sonoyama i in. [44] opublikowali wyniki swej pracy, które stanowiły przełom w dotychczasowych poszukiwaniach. Autorzy ci zaproponowali dwustopniowy proces z zastosowaniem mutantów *Erwinia* sp. i *Corynebacterium* sp. Pierwszy z nich wytwarzał w ciągu 26 godzin 328 g 2,5-diokso-D-glukonianu wapniowego, a drugi nagromadzał 106 g 2-okso-L-gulonianu wapniowego w litrze w ciągu 66 godzin.

Po pierwszej fermentacji brzeczka wraz z komórkami *Erwinia* poddawana jest sterylizacji pod działaniem dodecylsiarczanu sodowego (0,25 g/l w temperaturze 28°C w ciągu 6 godzin), a następnie do środowiska dodawana jest glukoza w ilości 0,2 kg na 1 kg kwasu 2,5-diokso-D-glukonowego. Spełnia ona rolę dawcy wodoru w procesie redukcji tego ostatniego do kwasu 2-okso-L-gulonowego. Tak sporządzona brzeczka wprowadzana jest do hodowli *Corynebacterium* sp. w końcu fazy wzrostu. W metodzie tej w pierwszej fazie fermentacji wydajność molarowa konwersji wynosi 94%, a w drugiej 92% w stosunku do wykorzysty-

wanego 2,5-diokso-D-glukonianu wapniowego. Ogólna wydajność mola kwasu 2-okso-L-gulonowego uzyskiwana w końcu drugiej fermentacji w przeliczeniu na glukozę wynosi 86%. Kwas ten, analogicznie jak we wszystkich omawianych metodach, jest następnie poddawany enolizacji, w wyniku której z niemal ilościową wydajnością przekształca się w witaminę C (rys. 10).



Rys. 10. Chemiczna konwersja kwasu 2-okso-L-gulonowego w kwas L-askorbinowy

Jak z tego widać jest to najbardziej efektywny sposób otrzymywania kwasu 2-okso-L-gulonowego, a tym samym i kwasu L-askorbinowego, spośród wszystkich znanych od 1934 roku metod produkcji tej witaminy. Liczba przejść została zmniejszona z pięciu do dwóch, jakkolwiek te dwa obejmują kilka subtelnych operacji. Wyodrębnianie kwasu 2-okso-L-gulonowego w końcowej fazie drugiej fermentacji polega na obróbce brzeczki węglanem sodowym i zagęszczaniu jej aż do wykrystalizowania 2-okso-L-gulonianu sodowego (wydajność około 90%).

Próby dalszego udoskonalenia tego procesu i uzyskania kwasu 2-okso-L-gulonowego z glukozy w jednostopniowej fermentacji nie dały, jak dotąd, pozytywnych rezultatów [45].

Mając jednakże na uwadze fakt, iż proces biosyntezy kwasu L-askorbinowego w organizmach zwierzęcych został dobrze poznany, można sądzić, że w niezbyt odległej przyszłości będzie możliwe wprowadzenie do komórek mikroorganizmów genów, kodujących syntezę różnych enzymów katalizujących poszczególne reakcje tego szlaku. Uwieńczenie takiej manipulacji genetycznej sukcesem, pozwoliłoby na zintegrowanie biotechnologicznego procesu otrzymywania witaminy C z glukozy.

BETA-KAROTEN (PROWITAMINA A)

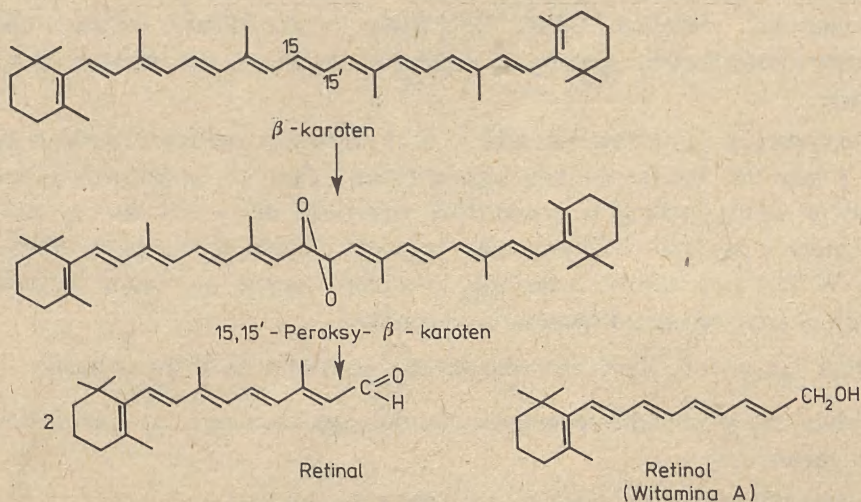
Beta-karoten — $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ — jest wielcienienasyconym węglowodorem (polienem), szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie i należy do dużej grupy naturalnych, żółto-pomarańczowych barwników, zwanych karo-

tenoidami. Występuje on przede wszystkim w roślinach i mikroorganizmach, w których zachodzi jego biosynteza. W organizmach zwierzęcych karotenoidy mogą się nagromadzać i nawet podlegać pewnym przemianom, jednakże ich wytwarzanie *de novo* nigdy dotychczas nie zostało jednoznacznie stwierdzone.

Szczególnie bogatym źródłem beta-karotenu jest marchew (łac. *carota* i stąd jego nazwa), a także owoce dzikiej róży, porzeczki, jarzębiny oraz zielone części roślin.

W organizmie zwierzęcym beta-karoten ulega biokonwersji do retinalu i retinolu czyli witaminy A, która w świecie roślinnym nie występuje. Odgrywa ona niezmiernie istotną rolę w procesie widzenia u ludzi i zwierząt, a ponieważ — jak wiadomo — karotenoidy biorą udział w pochłanianiu światła przez rośliny, to można stwierdzić, że zarówno witamina A, jak też jej prekursorzy są niezbędne w procesie recepcji światła przez żywe organizmy.

Przekształcenie beta-karotenu w witaminę w organizmie zwierzęcym ilustruje schemat (rys. 11).



Rys. 11. Schemat konwersji β -karotenu w witaminę A

Mechanizm tej konwersji został ostatecznie wyjaśniony po wyodrębnieniu 15,15'-dioksygenazy beta karotenowej, czyli enzymu katalizującego rozszczepienie jednej cząsteczki beta-karotenu z wytworzeniem dwóch cząsteczek retinalu [46]. Przemiana retinalu w retinol i odwrotnie zachodzi w jelicie przy udziale dehydrogenazy [47].

Jak z tego widać beta-karoten jako prowitamina A może być i jest stosowany jako dodatek do żywności i pasz w celu ich witaminizacji. Z drugiej zaś strony, podobnie jak inne karotenoidy, jest on naturalnym barwnikiem i z tego względu znajduje szerokie zastosowanie do barwienia różnych produktów spożywczych, a przede wszystkim margaryny, olejów i napojów.

Te niezaprzeczalne walary beta-karotenu wywołały, szczególnie w latach 1955-1970, duże zainteresowanie badaczy mikrobiologiczną syntezą tego związku. Mimo jednak niewątpliwych sukcesów w tej dziedzinie metoda biotechnologiczna nie wyparła chemicznej.

BIOSYNTeza

Jak już wspomniano wyżej biosynteza karotenoidów zachodzi wyłącznie w roślinach i mikroorganizmach, natomiast organizmy zwierzęce nie mają takiej zdolności.

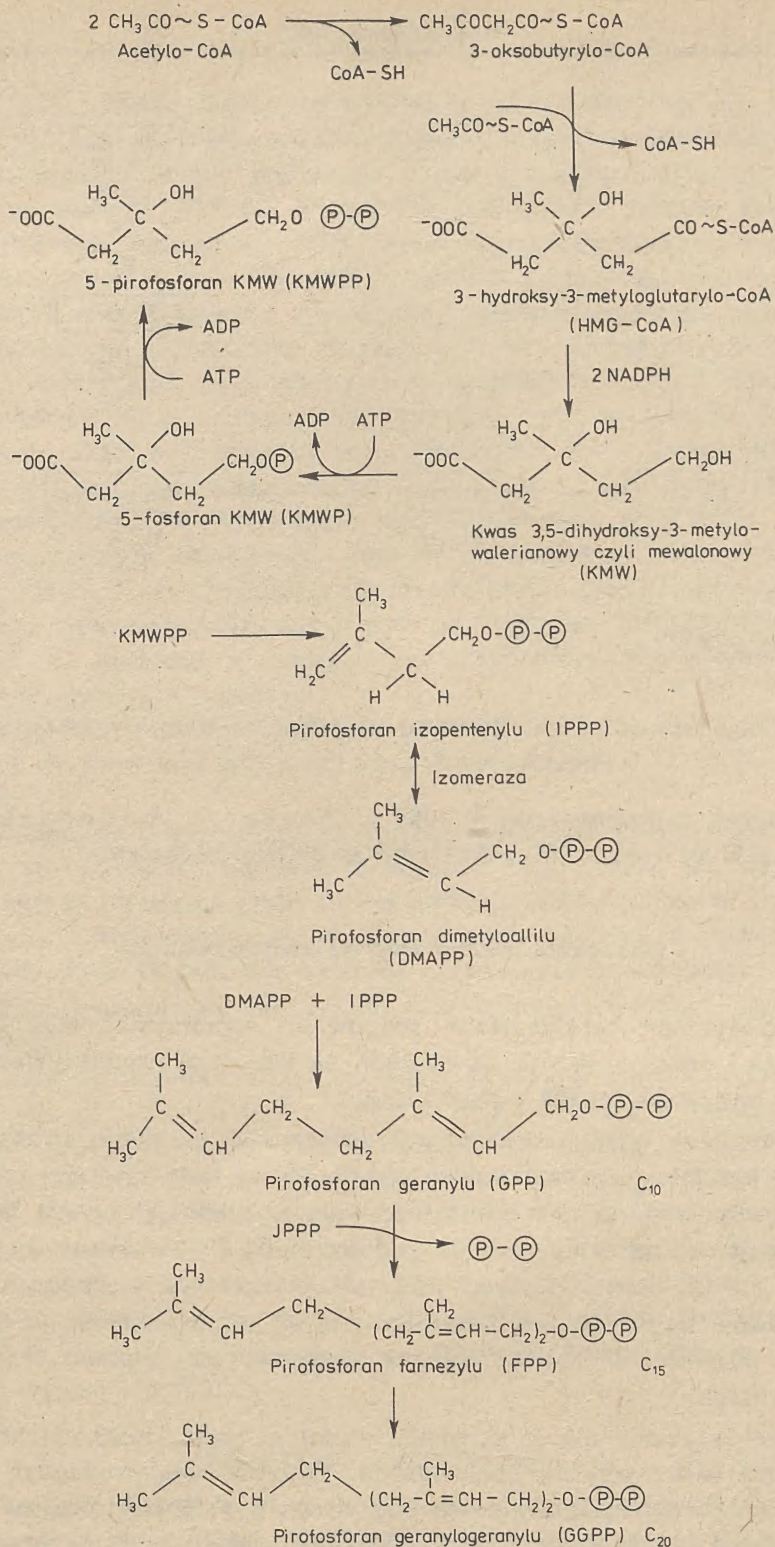
Szlak biosyntezy karotenoidów, przedstawiony niżej, stanowi pewnego rodzaju uogólnienie wyników badań przeprowadzonych w wielu karotenogennych układach, takich jak: liście i chloroplasty, owoce i chromoplasty pomidorów, grzyby i bakterie, a także otrzymane z nich enzymy.

Karotenoidy są tetraterpenami i ich biosynteza zachodzi według znanego schematu tworzenia się izoprenoidów. Jest to podstawowy szlak biogenezy wielu ważnych produktów naturalnych — kauczuku, steroidów, mono-, seskwi- i diterpenów występujących w olejkach eterycznych. W ten sam sposób powstają łańcuchy boczne chinonów uczestniczących w procesie przenoszenia elektronów.

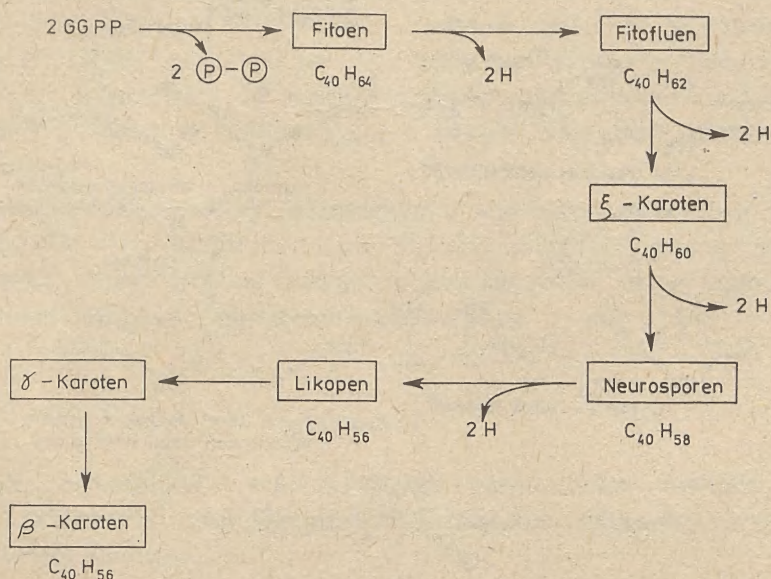
Szlak biosyntezy karotenoidów można podzielić na kilka etapów:

1. wytwarzanie oksodiestrowego produktu pośredniego, tj. pirofosforanu geranylu;
2. powstawanie fitoenu, czyli pierwszego związku C_{40} ;
3. szereg reakcji odwodorowania;
4. cyklizacja i związane z nią procesy;
5. końcowe modyfikacje.

Pierwszy z tych etapów, tj. tworzenie się pirofosforanu geranylogeranylu jest charakterystyczny dla biosyntezy wszystkich znanych izoprenoidów; natomiast cztery pozostałe dotyczą wyłącznie biogenezy karotenoidów (rys. 12).



Rys. 12. Szlak biosyntezy kwasu mewalonowego i prekursorów β -karotenu



Rys. 12a. Schemat konwersji pirofosforanu geranylogeranylu w β-karoten

Schemat ten zaproponowali w 1962 r. Porter i Anderson [48], a później Goodwin [49] potwierdził go swoimi badaniami.

BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA

Do biosyntezy beta-karotenu próbowano wykorzystać algi, grzyby nitkowate i drożdże, jednak ze względu na ich niską produktywność nie znalazły one praktycznego zastosowania.

Niedawno w wyniku manipulacji genetycznej uzyskano szczep *Phycomyces blakesleanus*, nagromadzający do 25 mg beta-karotenu na gram suchej masy komórek. Niezależnie od tego od wielu lat uwaga badaczy koncentruje się na drobnoustroju podobnym do *P. blakesleanus*, a mianowicie na *Blakeslea trispora*, który w optymalnych warunkach może nagromadzać nawet do 3 g beta-karotenu w litrze. Znalazło to odbicie w wielu publikacjach [50-53], a także w analizowanych przez Gutcho [54] patentach.

Ważne znaczenie dla zapewnienia wysokiej produktywności beta-karotenu ma skład podłoża hodowlanego. Stężenie węglowodanów, tłuszczów i białek winno być odpowiednio wysokie, a lepkość podłoża duża. Na przykład można podać, że podłoże zawierające wywar gorzelniczy

(60-75 g/l), skrobię kukurydzianą (50-70 g/l) i olej roślinny w ilości 70-80 g/l jest najbardziej odpowiednie do hodowli producenta beta-karotenu. Spośród olejów roślinnych preferowane są: olej sojowy i olej z nasion bawełny. Wywar gorzelniczy jest bardzo dobrym substratem ze względu na wysoką zawartość fosforanów, odgrywających ważną rolę w karotenogenezie [55]. Obecność w podłożu rozpuszczalnika substratów lipidowych ułatwia wysoce specyficzną przemianę tłuszczów u grzybów.

Niezbędnymi składnikami podłoża są różne aktywatory karotenogenezy, a wśród nich beta-jonon, który wprawdzie nie jest wbudowany w cząsteczkę beta-karotenu, ale stymuluje syntezę szeregu enzymów biorących udział w biosyntezie tej prowitaminy. Wiele uwagi poświęcono możliwości zastąpienia beta-jononu i wykazano, że 2,6,6-trimetylo-1-acetylo-cykloheksen jest najlepszym jego substytutem, przy czym znacznie od niego tańszym. Stwierdzono również, że niektóre heterocykliczne zasady azotowe, a w szczególności hydrazyd kwasu izonikotynowego i jego pochodne wywierają korzystny wpływ na biosyntezę beta-karotenu. Ważna jest też obecność w podłożu antyoksydantów, przeciwdziałających utlenianiu produktu finalnego.

Biorąc pod uwagę wszystkie te czynniki Ninet i Renaut [53] uzyskali w produkcji pilotowej 2,5-3 g beta-karotenu w litrze w ciągu 7-8 dni.

Karotenoidy tworzące się w procesie mikrobiologicznej syntezy gromadzą się wewnątrz komórek producenta, przy czym ich ilość może dochodzić do 35 mg na gram suchej grzybni. Można ją po odfiltrowaniu, przemyciu i wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem stosować do celów paszowych. Dobrze jest dodać do biomasy przed suszeniem niewielką ilość przeciwutleniacza, np. 0,5 g/l 2,2,4-trimetylo-6-etoksy-1,2-dihydro-chinoliny.

W celu wyodrębnienia karotenoidów w czystej postaci, grzybnę oddziela się od cieczy pofermentacyjnej przez filtrację i odwadnia bądź to pod zmniejszonym ciśnieniem, bądź też za pomocą obróbki bezwodnym metanolem. Beta-karoten, stanowiący 75-90% wszystkich karotenoidów, jest ekstrahowany odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym, np. heksanem lub chlorkiem metylenu. W wyniku wytrącenia, ponownego rozpuszczenia i krystalizacji z różnych rozpuszczalników lub ich mieszanin otrzymuje się czysty beta-karoten. Ogólna wydajność ekstrakcji w stosunku do zawartego w odfermentowanej brzeczce beta-karotenu wynosi 80% [53].

ERGOSTEROL (PROWITAMINA D₂)

W roku 1932 Windaus uzyskał, w rezultacie UV-napromieniania ergosterolu z drożdży, witaminę D i ustalił strukturę tego związku.

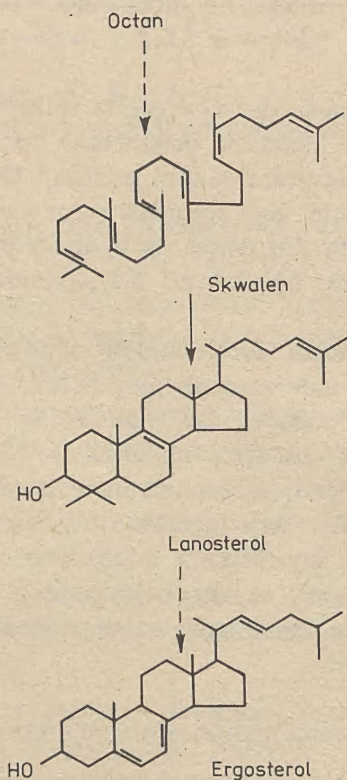
Jak obecnie wiadomo pod pojęciem witaminy D kryje się kilka różnych związków, z których najważniejsze są dwa: ergokalciferol (D_2), tworzący się z ergosterolu pod wpływem promieniowania UV, i cholekalciferol (D_3), będący naturalną formą i występujący zazwyczaj w tłuszczu wątroby ryb i zwierząt morskich. Forma ta tworzy się również w organizmie człowieka w wyniku fotoizomeryzacji obecnego w tkance podskórnej 7-dehydrocholesterolu, zachodzącej pod wpływem promieni UV światła słonecznego.

Ergosterol jest najważniejszą spośród znanych prowitamin D.

BIOSYNTeza

Ergosterol, podobnie jak cholesterol, jest pochodną lanosterolu — głównego związku na szlaku biosyntezy steroidów. Ten ostatni tworzy się ze skwalenu — triterpenoidowego węglowodoru, zbudowanego z jednostek izoprenowych powstających z octanu [56, 57].

Konwersja lanosterolu w ergosterol przebiega w drożdżach wg schematu (rys. 13) [58, 59].



Rys. 13. Uproszczony schemat biosyntezy ergosterolu, wg Fryberga i in. [58, 59]

BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA

Ergosterol jest najpospolitszym steroidem drobnoustrojowym, albowiem został on znaleziony w wielu mikroorganizmach, aczkolwiek bakterie i promieniowce albo w ogóle nie zawierają steroli, albo występują one w ich komórkach w bardzo niewielkich ilościach (0,001-0,01% suchej masy) [60]. Grzyby rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Fusarium* i *Trichoderma* zawierają 0,1-0,8% steroli na suchą masę [61, 62]. Jednakże głównym źródłem ergosterolu, wykorzystywanym w skali przemysłowej, są drożdże.

Nadproducentami tego sterolu (ponad 2% ergosterolu na suchą masę komórek) są wyłącznie drożdże z rodzaju *Saccharomyces* i *Candida*, przy czym do najlepszych zaliczyć można następujące gatunki: *Candida tropicalis*, *S. oviformis*, *S. uvarum*, *S. carlsbergensis* i przede wszystkim *S. cerevisiae*. Zawartość ergosterolu w innych drożdżach jest stosunkowo mała i rzadko przekracza 0,5% [65].

Ergosterol jest ekstrahowany z drożdży, w których jest głównym składnikiem steroli, występujących w ilości 1-3% suchej masy komórek. Ta metoda otrzymywania jest wyraźnie tańsza od specjalnych fermentacji ukierunkowanych na produkcję ergosterolu [64]. Znane są jednak opracowania, w wyniku których wyselekcjonowano szczepy *S. cerevisiae* o bardzo dużej zawartości ergosterolu (8-10% suchej masy). Na przykład można wymienić szczep *S. cerevisiae* MY 813, który w odpowiednich warunkach w ciągu 4 dni hodowli nagromadzał 3,76 g ergosterolu w litrze, a jego zawartość dochodziła do 10,4% s.m. komórek.

Badania wpływu polienowych antybiotyków, które obniżają glikolityczną aktywność drożdży, wykazały, że sprzyjają one nagromadzaniu steroli [65]. Nystatyna, np. dodawana do podłoża w ilości 25-30 mg/l, powodowała zwiększanie zawartości steroli w komórkach *Saccharomyces carlsbergensis* z 3% do około 5%. W przypadku skojarzonego działania antybiotyków i promieniowania jonizującego osiągnęto stężenie ergosterolu na poziomie 7%.

Do produkcji ergosterolu mogą być wykorzystane grzyby z rodzaju *Trichoderma*, *Fusarium* lub *Cephalosporium*. Grzyby te hodowane na podłożu węglowodanowym, lub jeszcze lepiej zawierającym n-parafiny jako główne źródło węgla, nagromadzają znaczne ilości ergosterolu i jego estrów. W przypadku *Fusarium* sp. uzyskiwano 0,65 g/l palmitynianu ergosterylu i 0,2 g/l wolnego ergosterolu [66]. Podobne wyniki osiągnęto w przypadku *Trichoderma* sp. i *Cephalosporium coremioides*, hodowanych w tych samych warunkach.

W celu wyodrębnienia ergosterolu z komórek drobnoustrojów poddaje się je odpowiedniej obróbce, w wyniku której jest on uwalniany z połączeń z elementami strukturalnymi, np. ze ścianą komórkową, co umożli-

liwia jego późniejszą ekstrakcję. Traktowanie komórek gorącym amoniakiem lub roztworem dimetyloaminy czy też cykloheksyloaminy w istotnej mierze zwiększa efektywność ekstrakcji steroli [67]. Po takiej obróbce wstępnej dodawany jest metanol w celu rozpuszczenia niektórych zanieczyszczeń i odwodnienia biomasy, a otrzymany osad jest oddzielany. Ekstrakcję steroli prowadzi się za pomocą octanu etylu lub eteru. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskuje się suchą pozostałość, zawierającą 90% pierwotnej ilości ergosterolu, a także tłuszcze i inne sterole. Po zmydleniu, frakcję niezmydlającą się z zawartymi w niej sterolami poddaje się ekstrakcji eterem, a następnie przeprowadza rekrytalizację ergosterolu z acetonem, alkoholu lub chlorku metylenu. W celu wyodrębnienia poszczególnych steroli stosuje się różne metody chromatograficzne.

WNIOSKI

1. W literaturze naukowej i licznych patentach opisane są biotechnologiczne metody otrzymywania szeregu witamin grupy B, ale tylko w przypadku dwóch z nich, a mianowicie — cyjanokobalaminy i ryboflawiny — metody te znalazły praktyczne zastosowanie, gdyż są konkurencyjne w stosunku do syntezy chemicznej.
2. Oceniając stan obecny i perspektywy rozwoju biotechnologii, a zwłaszcza inżynierii genetycznej drobnoustrojów przemysłowych, można sądzić, że w przyszłości coraz szerzej będą stosowane skojarzone, chemiczno-biotechnologiczne metody otrzymywania witamin i koenzymów, w których te pierwsze stanowią często główny element strukturalny i funkcjonalny.
3. Mikrobiologiczna synteza prowitamin, np. beta-karotenu i ergosterolu, ma duże znaczenie praktyczne, albowiem u jednej strony może stanowić alternatywną drogę otrzymywania odpowiednich witamin (retinolu i ergokalciferolu), z drugiej zaś — same prowitaminsy jako takie znajdują szerokie zastosowanie do wzbogacania i uszlachetniania produktów spożywczych i pasz.

LITERATURA

1. Florent J. — *Biotechnology*. t. IV, s. 154, VCH, Weinheim, 1986.
2. Battersby A. R. — *Vitamin B₁₂*. Walter de Gruyter, Berlin, 1979.
3. Battersby A. R., Mc Donald E. — *B₁₂*. t. I, John Wiley and Sons, New York, 1982.
4. Huennelens F. M., Vitols K. K. S., Fujii K., Jacobsen D. W. — *B₁₂*. t. I, John Wiley and Sons, New York, 1982.
5. Battersby A. R., Edington C., Fookes C. J. R. — *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 527, 1984.

6. Scott A. I., Mackenzie N. E., Santander P. J., Fagerness P. E., Mueller G., Schneider E. — *Bioorg. Chem.* 12: 356, 1984.
7. Bykhovski V. Y. — *Vitamin B₁₂*, Walter de Gruyter, Berlin, 1979.
8. Perlman D. — *Economic Microbiology*, t. II, Academic Press, London, 1978.
9. Florent J., Ninet L. — *Microbial Technology*, t. I, Academic Press, New York, 1979.
10. Florent J. — *Ullemanns Encyklopädie der technischen Chemie*, t. XXIII, Verlag Chemie, Weinheim — Deerfield Beach, Florida-Basel, 1983.
11. Marwaha S. S., Kennedy J. F., Sethi R. P. — *Process Biochem.* 18: 24, 1983.
12. Marwaha S. S., Sethi R. P., Kennedy J. F. — *Enzyme Microbiol. Technol.* 5: 361, 1983.
13. Yongsmith B., Apiraktivongse P. — *J. Ferment. Technol.* 61: 105, 1983.
14. Miller J. M., Rosenblum C. — US patent 2 939 822, 1960.
15. Nippon Oil Co. Ltd. — Eur. patent 87820, 1983.
16. Yongsmith B., Chutima K. — *J. Ferment. Technol.* 61: 593, 1983.
17. Kureka Kagaku Kogyo — Eur. patent 131456, 1985.
18. Brown G. M., Williamson J. N. — *Adv. Enzymol.* 53: 346, 1982.
19. Takeda Chemical Industries Ltd. — Fr. Patent 2189513, 1974.
20. Takeda Chemical Industries Ltd. — Ger. Offen 2454931, 1975.
21. Gutcho S. J. — *Chem. Technol. Rev. Chemicals by Fermentation*, 19: 323, 1973.
22. Wickerham L. J., Flickinger M. H., Johnston R. M. — *Arch. Biochem.* 9: 95, 1946.
23. Demain A. L. — *Naturwissenschaften* 67: 582, 1980.
24. Lago B. D., Kaplan L. — *Advances in biotechnology*, t. III, Proc. VI Int. Ferment. Symp., London, Canada, Pergamon Press, Toronto, 1981.
25. Perlman D. — *Microbial Technology*, t. I, Academic Press, New York, 1979.
26. Plaut G. W. E., Smith C. M., Alworth W. L. — *Ann. Rev. Biochem.* 43: 899, 1974.
27. Bekier M. E. — *Wwiedienije w biotechnologiiu*. Piszczewaja Promyslenost, Moskwa, 1978.
28. Malzahn R. C., Philips R. F., Hauson A. M. — *Abstr. 63rd Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* 1963.
29. VNII Genetika — Fr. patent 2546907, 1984.
30. Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. — Japan patent 77-110897, 1977.
31. Hauson A. M. — *Microbial Technology*. Reinhold Publ. Corp., New York, 1967.
32. Florent J. — *Biotechnology*, t. IV, s. 132, VCH, Weinheim, 1986.
33. Mapson L. W. — *The vitamins*, t. I, Academic Press, New York, 1967.
34. Chatterjee I. B. — *Methods Enzymol.* 18a: 28, 1970.
35. Loewus F. A., Wagner G., Yang J. C. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258: 7, 1975.
36. Loewus F. A. — *The biochemistry of plants*, t. III, Academic Press, New York, 1980.
37. Reichstein T., Grüssner A. — *Helv. Chim. Acta* 17: 311, 1934.
38. Sznajdman L. O. — *Proizvodstwo witaminow*. Piszczewaja Promyslenost, Moskwa, 1973.
39. Gutcho S. J. — *Chem. Technol. Rev. Chemicals by Fermentation* 19: 7, 1973.

40. Yan Z. Z., Tao Z.-X., Yu L.-H., Yin G.-L., Ning W.-Z., Wang C.-H., Wang S.-D., Jiung H.-F., Yu J.-F. — Wei Sheng Wu Hsueh Pao 21, 185 Chem. Abstr. 95: 113301 d, 1981.
41. Kulhanek M. — Adv. Appl. Microbiol. 12: 11, 1970.
42. Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd. — Japan patent 63-7725, 1973.
43. Takeda Chemical Industries Ltd. — Japan patent 64-2463, 1964.
44. Sonoyama T., Tani H., Matsuda K., Kageyama B., Tanimoto M., Kobayashi K., Yagi S., Kyotani H., Matsugima K. — Appl. Environ. Microbiol. 43: 1064, 1982.
45. Genentech — Eur. patent 132308, 1985.
46. Goodwin T. W. — Biochem. Soc. Trans. 11: 473, 1983.
47. Goodwin T. W. — *The comparative biochemistry of the carotenoids*. t. I, Chapman and Hall, London, 1980.
48. Porter J. W., Anderson D. G. — Arch. Biochem. Biophys. 97: 520, 1962.
49. Britton G., Goodwin T. W. — Methods Enzymol. 180: 654, 1981.
50. Ciegler A. — Adv. Appl. Microbiol. 7: 1, 1965.
51. Ninet L., Renaut J., Tisser R. — Biotechnol. Bioeng. 11: 1195, 1969.
52. Britton G. — *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. t. I, Academic Press, London, 1976.
53. Ninet L., Renaut J. — *Microbiol. technology*. t. I, Academic Press, New York, 1979.
54. Gufcho S. J. — Chem. Technol. Rev. Chemicals by Fermentation 19: 311, 1973.
55. Dholakia V. N., Modi V. V. — J. Gen. Microbiol. 130: 2043, 1984.
56. Schroepfer G. J. — Ann. Rev. Biochem. 51: 555, 1982.
57. Van Tamelen E. E. — J. Amer. Chem. Soc. 104: 6480, 1982.
58. Fryberg M., Ochlschlager A. C., Unrau A. M. — Arch. Biochem. Biophys. 160: 83, 1974.
59. Schubert K. K., Rose G., Wachtel H., Hoerhold C., Ikekawa N. — Eur. J. Biochem. 5: 246, 1968.
60. Appleton G. S., Kieber R. J., Payne W. J. — Appl. Microbiol. 3: 249, 1955.
61. Dulaney E. L., Stapley E. O., Simpf K. — Appl. Microbiol. 2: 371, 1954.
62. Eliazyan A. A., Maroyan E. A., Arutyunyan T. G. — Microbiology 44: 566, 1975.
63. Ratledge C. — *Economic microbiology*. t. II, Academic Press, London, 1978.
64. Graltsova R. D. — Microbiology 37: 44, 1968.
65. Nakao Y., Kuno M., Suzuki M. — US patent 3884759, 1975.
66. Green J., Price S. A., Edwin E. E. — US patent 3006932, 1961.

ANDRZEJ ZABŹA

Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej

Politechnika Wrocławska

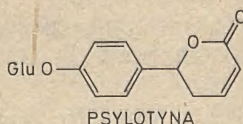
CHEMICZNE PODSTAWY ODDZIAŁYWANIA ROŚLINA-OWAD

SKUTECZNOŚĆ I ZAWODNOŚĆ NATURALNYCH SYSTEMÓW OBRONNYCH
ROSLIN PRZECIWKO OWADOM

Rośliny, które z uwagi na fakt, że tkwią praktycznie nieruchomo w ziemi, mogą wydawać się pozornie bezbronne wobec ataku ruchliwych zazwyczaj owadów czy innych zwierząt roślinożernych. Pomijając łatwo dostrzegalny fizyczny system obronny roślin, jak np. kolce czy ciernie, bezużyteczne w stosunku do owadów, w procesie koewolucji z tymi szkodnikami wypracowały one subtelne, ale bardziej skuteczne chemiczne systemy obronne. Zadziwiająca różnorodność w organizacji tych chemicznych systemów obronnych roślin, różnorodność struktur związków chemicznych przez nie tworzonych, jest praktycznie nieograniczona. Są to zazwyczaj niskocząsteczkowe połączenia, nie mieszczące się w głównych szlakach metabolicznych, stąd często są nazywane „wtórnymi metabolitami”. Ich biosynteza jest zazwyczaj cechą charakterystyczną dla wytwarzającego je żywego organizmu. Funkcje biologiczne „wtórnych metabolitów” są niekiedy trudne do ustalenia. Związki te nie tylko pełnią rolę substancji obronnych, ale stanowią też jeden z ważniejszych sposobów przekazywania różnych istotnych dla życia informacji. Biosynteza „wtórnych metabolitów” jest właściwością nie tylko roślin. Produkują je i inne organizmy, a zwłaszcza owady. Przekazywanie informacji i wzajemne oddziaływanie żywych organizmów w naturalnym środowisku za pomocą tych niskocząsteczkowych związków organicznych określa się często jako oddziaływania „allelochemiczne”, a same substancje mianem połączeń „allelochemicznych” (lub „semiochemicznych”) [30]. Połączenia allelochemiczne, w zależności od pełnionych przez nie funkcji biologicznych, zaszeregowano do trzech obszernych grup. Są to: allomony, kairomony i feromony. Jeśli związek wysyłany przez organizm spełnia funkcje korzystne dla tego organizmu, to związek ten nazwano allomonem. Jeśli natomiast z rozszyfrowania sygnału chemicznego korzyść odniesie organizm go przyjmujący, to związek taki określono mianem kairomon. W przypadku gdy substancje są nośnikami informacji w obrębie jednego gatunku (np. u owadów), to nazwano je feromonami.

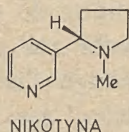
W procesie koewolucji z roślinami, owady nabyły zdolność do dezaktywacji toksyn biosyntezyowanych przez rośliny, a w wielu przypadkach wykorzystują je nawet w organizacji własnego systemu obronnego. Często stanowią one dla nich istotny znak rozpoznawczy przy identyfikacji miejsca żerowania.

Istnieją dowody świadczące o tym, że rośliny tworzyły chemiczny system obronny już we wczesnych etapach swojego rozwoju. Może o tym świadczyć związek — psylotyna — wyizolowany z rośliny *Psilotum nudum* [13]. Połączenie to wykazuje wyraźne właściwości deterrentne w

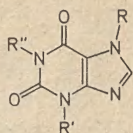


stosunku do owadów i uważane jest za jeden z najstarszych „wtórych metabolitów”, które produkowane są przez bardzo prymitywne rośliny. Nie można wykluczyć, że biosynteza tego związku przyczyniła się w pewnym stopniu do przetrwania do naszych czasów niektórych gatunków roślin z rzędu *Psilotales*; kilka z nich można jeszcze spotkać na południu Europy, w Hiszpanii.

Często nieuświadamiamy sobie jak wiele powszechnie znanych związków pochodzenia naturalnego biosyntezyowanych jest przez roślinę właśnie w celach obronnych. Znany wszystkim związek — nikotyna (czy inne alkaloidy biosyntezyowane przez tytoń) — powoduje m.in. paraliż

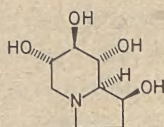


mszyc żerujących na tej roślinie. Nikotyna jest więc substancją obronną tytoniu, przynajmniej przed niektórymi gatunkami owadów [30]. Nikotyna stanowi też jeden z wielu insektycydów produkowanych w USA, którego roczna produkcja przekracza 500 ton [1]. Nie stwarza ona jednak zbyt skutecznej bariery ochronnej. Pewne gatunki owadów zaadaptowały się bowiem do nikotyny i stanowi ona dla nich nawet znak rozpoznawczy, czyli kairomon, wskazujący na tytoń jako główne lub jedyne źródło pokarmu [1]. Również związki atrakcyjne dla człowieka z innego powodu, jak np. kofeina (biosyntezyowana przez krzewy kawy i herbaty), teofilina (występująca w liściach herbaty), czy inne połączenia z grupy metyloksantyn (np. heteroksantyna biosyntezyowana m.in. przez krzewy kakao czy koli) stanowią substancje obronne roślin [19]. Wykazują one

KOFEINA: $R=R'=R''=Me$ TEOFILINA: $R=H$; $R'=R''=Me$ HETEROKSANTYNA: $R=Me$; $R'=R''=H$

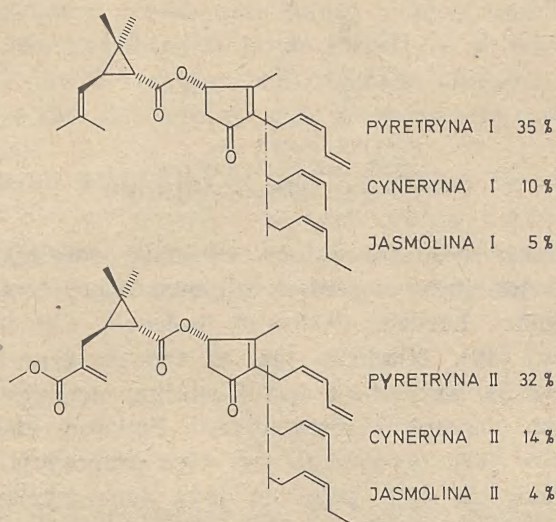
w stosunku do larw wielu szkodników własności antyfidantów lub inhibitorów wzrostu już przy stężeniach odpowiadających zawartości tych związków w liściach herbaty (0,68-2,1% kofeiny), czy ziarnkach kawy (0,8-1,8% kofeiny) [19]. Wiadomo też, że związki typu metyloksantyn hamują u kręgowców aktywność fosfodiesteraz, enzymów stanowiących jeden z głównych elementów metabolizmu. Podobny efekt stwierdzono również u owadów [19]. Wysuwana jest więc propozycja wykorzystania niektórych pochodnych tych połączeń jako synergetyków, szczególnie dla przypadków gdy stosowany pestycyd oddziałuje na specyficzne enzymy AMP.

Silne właściwości toksyczne w stosunku do owadów i wyższych zwierząt wykazuje inny interesujący związek z grupy alkaloidów indolizynowych — ksantospermina, który zawiera aż cztery grupy hydroksylo-

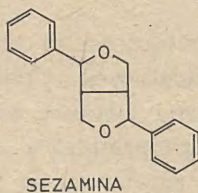
KASTANO-
SPERMINA

we. Związek ten (i inne połączenia o zbliżonej strukturze) izolowano z australijskiego drzewa strączkowego *Castanospemum australe*. Z uwagi na swoją strukturę chemiczną związek ten można uważać za azotowy analog cukru, w którym pierścieniowy atom tlenu został zastąpiony przez atom azotu. Nic więc dziwnego, że jest on silnym inhibitorem takich ważnych dla życia enzymów, jak α -glukozydaza czy α -mannozydaza. Stwierdzono też, że jeden z przedstawicieli tej grupy połączeń, mianowicie 2,5-dihydroksymetylo-3,4-dihydroksypirolidyna, jest skutecznym inhibitorem trehalazy. Enzym ten odgrywa ważną rolę w fizjologii owadów, a jest nieobecny u ssaków. Analogi ksantosperminy mogą więc stanowić atrakcyjne modele do syntez nowych selektywnych i bezpiecznych insektycydów [33].

Substancjami o znanych od wielu lat i prawie doskonałych właściwościach insektobójczych, porażających system nerwowy owadów, są pochodne kwasu chryzantemowego: pyretryny, cyneryny i jasmoliny.



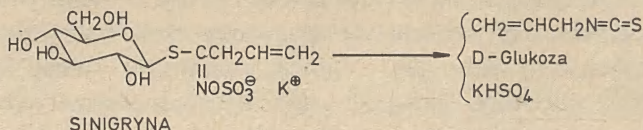
Wytwarzane są one przez roślinę *Chrysanthemum cinerariifolium* [8]. Substancje te stanowią od dawna wzór dla licznych strukturalnych analogów, z których wiele syntetyzowano następnie na skalę przemysłową. Mimo silnych właściwości owadobójczych pojawiły się odmiany motyli (zwłaszcza polifagi), które w swoim przewodzie pokarmowym tak uaktywniły działanie oksydaz, że potrafią szybko metabolizować pyretroidy do metabolitów bezpiecznych już dla swojego organizmu. Jak to niekiedy bywa, również i ten system detoksykacji u owadów nie okazał się dostatecznie skuteczny. Z kwiatów jednej z odmian *Ch. cinerariifolium*,



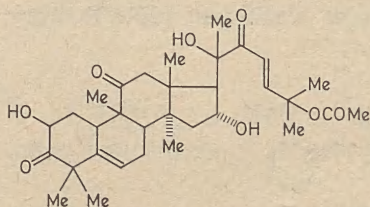
SEZAMINA

obok wymienionych wyżej pyretroidów, wyizolowano jeszcze dodatkowo substancje typu sezaminy, które są skutecznymi inhibitorami właśnie oksydaz obecnych w organizmie owadów, uniemożliwiając tym samym szybki metabolizm owadobójczych pyretroidów [30]. Możemy więc mówić o kolejnym etapie w ewolucyjnym rozwoju metod obronnych roślin przed groźnymi dla nich szkodnikami.

Substancje obronne są często wytwarzane przez roślinę dopiero w momencie jej zaatakowania. Rośliny z rodziny krzyżowych (*Cruciferae*) biosyntezują glikozyd o bardzo gorzkim smaku — sinigrynę, która po



uszkodzeniu rośliny ulega enzymatycznej hydrolizie (enzym myrozynaza) wydzielając izotiocyanian allylu, wykazujący właściwości toksyczne dla wielu gatunków owadów [26]. Znalazły się jednak owady, które opracowały sposób na detoksykację tej substancji i sinigrina stanowi dla nich kairomon wskazujący miejsce żerowania [30]. Do tych owadów należą: znany u nas dobrze bielinek kapustnik (*Pieris brassicae*), bielinek rzepnik (*P. rapae*), 'tantniś krzyżowacek (*Plutella maculipennis*), roślinożerny ryjkowiec *Listroderes costirosteris*, pchełka krzyżówka (*Phyllotreta cruciferae* i *P. strilata*), a też mszyca kapuściana (*Brevicoryne*



KUKURBITACYNA B

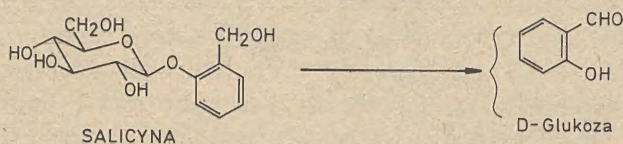
brassicae). Wart odnotowania jest fakt, że sinigrina zwabia również owady z rodziny męczelkowatych (*Braconidae*), mianowicie *Diaeretiella reoae*, które atakują nie roślinę, ale mszyce żerujące właśnie na roślinach z rodziny krzyżowych.

Innym przykładem wykorzystania substancji obronnych roślin, jako kairomonów wskazujących miejsce pokarmu dla licznych grup owadów z rodziny stonkowatych (*Chrysomelidae*) są kukurbitacyny, produkowane przez rośliny z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*). Dla człowieka związki te są prawdopodobnie najbardziej gorzkimi substancjami jakie znamy. Gorzki smak połączenia steroidowego — kukurbitacyny B — wykrywany jest już przy stężeniu 1 ppb [32].

Jeszcze inne rośliny, jak np. koniczyna biała (*Trifolium repens*) lub komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*) syntezują cyjanogenne glikozydy, które gromadzą następnie w liściach [25]. Po ich uszkodzeniu, w skutek działania dwóch specyficznych enzymów, glikozyd ten ulega rozpadowi z wydzieleniem trującego HCN. Jednakże enzymy niezbędne do tej hydrolizy nie są obecne u wszystkich roślin obu tych gatunków; nie wszystkie mogą się więc bronić za pomocą tego systemu. Stwierdzono, że zdolność rozkładu enzymatycznego cyjanogennych glikozydów

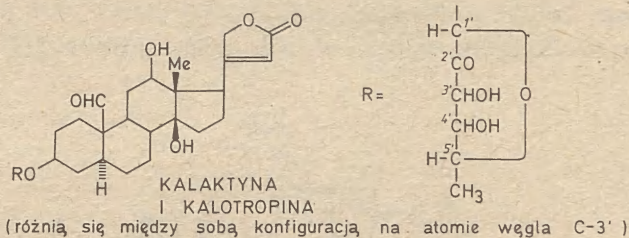
u tych roślin zależna jest od strefy klimatycznej, w której dana roślina rośnie, a konkretnie od średniej temperatury najzimniejszego miesiąca dla danego regionu. W rejonach ciepłych, np. wokół Morza Śródziemnego, ok. 70-90% roślin tego gatunku wykazuje pełne właściwości cyjanogenne, podczas gdy w rejonach zimniejszych, np. w środkowej części Związku Radzieckiego, prawie żadna z tych roślin nie była cyjanogenna. Najprawdopodobniej opisany wyżej system obronny rośliny jest w tym przypadku skierowany głównie nie przeciwko owadom, ale ślimakom, które w cieplejszych regionach są jej głównymi szkodnikami. W cieplejszym klimacie ślimaki są aktywne przez cały rok i rośliny bez tej chemicznej obrony skazane byłyby na całkowite zjedzenie. W obszarach geograficznych o mroźnej zimie sam czynnik klimatyczny reguluje populację groźnych dla rośliny ślimaków [26].

Ciekawe relacje roślina-owad zaobserwowano również dla jednego z gatunków wierzby *Salix stichensis*, rosnącej na dużych wysokościach w górach Sierra Nevada w Kalifornii [29]. Rośliny te biosyntezują sub-



stancję obronną — salicynę, która w dużym stopniu chroni je przed wyjadaniem przez kozice żyjące na tych wysokościach, a jednocześnie zwiększa niebezpieczeństwo ataku przez niektóre gatunki owadów. Salicyna zawarta w liściach tej rośliny jest kairomonem pokarmowym dla chrząszczy z rodziny stonkowatych (*Chrysomelidae*). Owady te zdolne są do przekształcenia salicyny w aldehyd salicylowy i glukozę. Aldehyd salicylowy gromadzą w specjalnym gruczole i wykorzystują go następnie jako własną substancję obronną w przypadku ataku ze strony innych stawonogów, np. mrówek czy pająków. Owady *Chrysomela aenicollis* żerujące na wierzbie o zwiększonej zawartości salicyny mają więc większą szansę przeżycia. Zwiększona zawartość salicyny w tej roślinie obserwowana jest jedynie u roślin rosnących powyżej 2700 m n.p.m. Poniżej tej wysokości wierzba zawiera już wyraźnie mniejsze ilości tych substancji obronnych. Najprawdopodobniej owady *Ch. aenicollis* w niższych partiach gór, z uwagi na łagodniejsze warunki klimatyczne, występują tam w większych ilościach i wyjadają selektywnie przede wszystkim te odmiany wierzby, które zawierają większe ilości atrakcyjnej dla nich salicyny [29]. Jest to jeden z wielu możliwych mechanizmów naturalnej selekcji roślin w naturalnym środowisku.

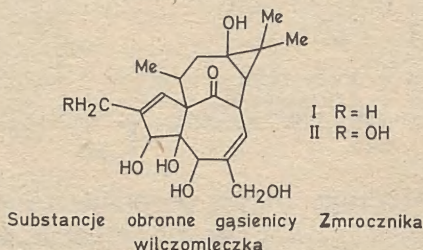
Nawet tak silne toksyny, jak kardenolidy występujące w roślinach należących do kilku rodzin, szczególnie w *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* i *Scrophulariaceae* (rodzaju *Digitalis*), czy mniej popularne u roślin bufanolidy (*Liliaceae*, rodzaj *Scilla*, *Ranunculaceae* rodzaj *Helleborus*) nie stanowią dla nich absolutnej ochrony. Egzotyczny szarańczak *Poecilotherus bufonis* żeruje wyłącznie na roślinach z rodziny trojeściowatych (*Asclepiadaceae*), mimo że zawierają one cały zespół tych niezwykle toksycznych substancji [26]. Owad ten gromadzi je w specjalnym gruczole i wykorzystuje następnie we własnej obronie. Dokładna analiza substancji obronnych tego owada, wystrzykiwana przez niego w momencie zagrożenia, wykazała obecność dwóch znanych kardenolidów — kalaktyny i kalotropiny. Związki te są również ekstrahowane z roślin,



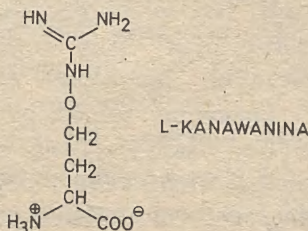
na których owady te żerują. Innym przykładem konstrukcji przez owady własnego systemu obronnego z wykorzystaniem kardenolidów biosyntezowanych przez rośliny mogą być roślina *Asclepias curassavica* i żerujące na niej gąsiennice motyli z rodziny *Danaidae* [26]. Roślina ta produkuje znaczne ilości kardenolidów, które w pełnym cyklu rozwojowym żerującej na niej larwy przechodzą do organizmu owada. Przeprowadzono szczegółową analizę związków zawartych w motylach i poczwarkach u tej rodziny owadów i stwierdzono obecność ok. 10 różnych kardenolidów. Ilość tych związków zawarta w organizmie jednego tylko motyla jest wielokrotnie wyższa od dawki wystarczającej do uśmiercenia kota lub małego psa. Nic więc dziwnego, że owady te są raczej unikane przez owadożerne ptaki. Aby ostrzec potencjalnych wrogów przed swoim niebezpiecznym „ładunkiem chemicznym” motyle z rodziny *Danaidae* są też zazwyczaj zabarwione w jaskrawe kolory. Pod ten „parasol kardenolidowy” skrywają się sprytnie owady innego gatunku (np. motyle *Limenitis archippus*), których „skład chemiczny” jest wprawdzie zupełnie niegroźny, ale zabarwieniem swoich skrzydeł upodabniają się bardzo do motyli z rodziny *Danaidae*, pozorując tym niebezpieczeństwo. Jednakże bariera kardenolidowa również dla korzystających z niej owadów nie gwarantuje im absolutnej nietykalności. Wiadomo bowiem, że większość motyli *Danaidae* spędza zimę w środkowym

Meksyku. Tam atakowane są przez owadożerne ptaki (m.in. wilgi i grubodzioby), które nauczyły się selektywnie unikać tych części organizmu owada, w których gromadzone są właśnie te substancje toksyczne. W ten sposób w Meksyku w czasie zimy ginie ponad 60% motyli tego gatunku [26].

Podobnym przykładem wykorzystania substancji obronnych roślin przez owady we własnych celach obronnych jest bogato wybarwiony motyl zmrocznik wilczomleczek (*Celerio euphorbiae*), którego larwy żerują tylko na wysoce toksycznym wilczomleczu, pomijając inne gatunki roślin. Ponieważ rośliny te są uciążliwym chwastem, ten właśnie owad wykorzystywany jest niekiedy jako czynnik biologicznej z nim walki. Substancje toksyczne tej rośliny stanowią główną zawartość gorzkiej, drażniącej cieczy obronnej wydzielanej przez niepokojoną gąsiennicę wilczomlecza. Podstawowym składnikiem tej cieczy jest połączenie terpenowe o dosyć skomplikowanym wzorze strukturalnym [1].



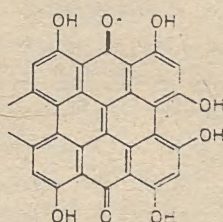
Szczególnym przypadkiem detoksykacji substancji obronnych roślin i wykorzystania ich przez owada w swoim cyklu rozwojowym jest chrząszcz *Caryedes brasiliensis* z rodziny strąkowcowatych (*Bruchidae*). Owad ten jest jedynym „amatorem” nasion rośliny *Dioclea megacarpa*, rosnącej w lasach Kostaryki. Około 13% suchej zawartości nasion tej rośliny stanowi L-kanawanina. Jest to tzw. „nienaturalny” aminokwas.



który nie stanowi elementu budowy białek i wykazuje silne właściwości insektobójcze, hamując m.in. działanie arginazy. Związek ten produkowany jest również przez roślinę *Canavalia ensiformis*, stąd nazwa tego

nietypowego aminokwasu. Chrząszcz *C. brasiliensis* ma niezbędny system enzymów, które przeprowadzają toksyczną L-kanawaninę w mocznik i dalej w amoniak, wykorzystywany następnie w biosyntezie aminokwasów potrzebnych do syntezy białek. W ten sposób produkowany przez roślinę jej wysoce toksyczny allomon pełni w przypadku *C. brasiliensis* funkcję kairomonu, w pełni zaspokajając larwy tego chrząszcza w dietę zasobną w azot [26].

Jeszcze inną ciekawą substancję obronną biosyntezują rośliny z rodziny dziurawcowatych. Jest to hiperycyna — połączenie o dosyć złożonej budowie diantranu, o krwisto-purpurowym zabarwieniu [30]. Zwią-



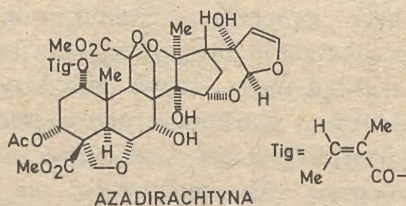
HIPERYCYNĄ

zek ten jest odpowiedzialny za niebezpieczne uczulenie wzroku i skóry ssaków na działanie światła, prowadzące niekiedy do fatalnych skutków. Dlatego też rośliny zawierające hiperycynę są unikane prawie przez wszystkie zwierzęta roślinożerne. Są jednakże owady, które na drodze ewolucji genetycznej uzyskały zdolność detoksykacji tej niebezpiecznej substancji. Kilka gatunków chrząszczy z podrodziny *Chrysomelinae*, np. złotka (*Chrysomela hyperici*), występuje tylko na dziurawcu. Owad ten został nawet sprowadzony z Europy do Australii, aby zwalczać tam tę groźną dla bydła roślinę, a która stała się tam uciążliwym chwastem. Podobnie też inny przedstawiciel tej podrodziny *Ch. brunsvicensis*, wykorzystuje hiperycynę jako kairomon wskazujący źródło pokarmu. Chrząszcze te badają powierzchnię liści za pomocą specjalnie ukształtowanych tarczowatych chemoreceptorów, aż hiperycyna obecna na powierzchni liścia umiejscowi im źródło pokarmu [30].

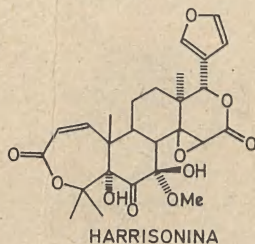
Opisane wyżej substancje obronne roślin produkowane są przez nie niezależnie od tego czy są one atakowane czy nie. Są jednak gatunki roślin, które swoją obronę opierają na „indukowanym” systemie obronnym, kiedy ochronne substancje biosyntezowane są tylko w odpowiedzi na atak [26]. Jako przykład mogą służyć pomidory, które w przypadku ataku przez owady syntezują substancje przemieszczające się od miejsca zranienia rośliny do innych jej części, inicjując biosyntezę co najmniej dwóch inhibitorów proteaz. Uniemożliwiają one (albo przynajmniej

utrudniają) trawienie białka pobranego z liścia. Roślina jako źródło pokarmu staje się więc mniej atrakcyjna. Co więcej, zaobserwowano, że roślina zaatakowana przez owady może przekazać sygnał ostrzegawczy innym roślinom jeszcze nie atakowanym, ale znajdującym się w pobliżu. Ostrzeżone rośliny natychmiast uruchamiają własne systemy obronne. Wydaje się więc, że przynajmniej niektóre rośliny wykorzystują — podobnie jak owady — w obrębie swojego gatunku feromonowy system alarmowy. Trzeba też pamiętać, że substancje toksyczne produkowane przez rośliny mogą być również szkodliwe dla niej samej. Wspomniany wcześniej gatunek wierzby *Salix stichensis* zaatakowany przez owady pogarsza „jakość pokarmową” swoich liści i jednocześnie przesyła sygnał alarmowy do innych wierzb rosnących w pobliżu [26]. Podobnie drzewa z rodziny klonowatych, np. klon cukrowy (*Acer saccharum*) w momencie ataku owadów znacznie zwiększa intensywność biosyntezy taniny i innych substancji fenolowych oraz ostrzega inne pobliskie klony. Tanina, jako substancja obronna, ma działanie pośrednie; wiąże się ona bowiem z białkiem w trudniejszy do strawienia kompleks, stąd pokarm jest trudniej przyswajalny [30]. Można ogólnie stwierdzić, że larwy owadów pasożytujące na roślinach o zwiększonej zawartości taniny, katechiny i innych fenoli nigdy nie osiągają odpowiednio dużych rozmiarów i wagi [12]. Tanina jest również znanym inhibitorem wzrostu grzybów i bakterii. Chroni więc roślinę zarówno przed zwierzętami jak i mikroorganizmami.

Aktywność biologiczna przedstawionych wyżej połączeń jako deterrentów czy antyfidantów jest jednak stosunkowo mała. Aby mogły one przynieść wyraźny efekt w organizowanym przez człowieka systemie ochrony roślin trzeba byłoby je stosować w dużych ilościach, liczonych co najmniej w tonach na hektar powierzchni uprawnej [22]. Są jednak rośliny, które biosyntezują niezwykle aktywne substancje z grupy antyfidantów i mimo że występują w minimalnych ilościach tworzą dla siebie skuteczną obronę. Jeden z bardziej znanych i aktywnych antyfidantów został wyizolowany z owoców i liści rośliny afrykańskiej i indyjskiej *Azadirachta indica* [25]. W roślinie tej, obok kilku innych połączeń tetranorterpenoidowych, wyizolowano wysoce aktywny antyfidant o nazwie azadirachtyna (aktywny już przy stężeniu poniżej 1 ppm). Związek

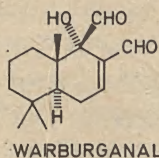
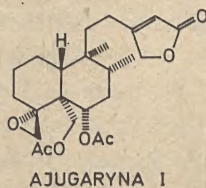


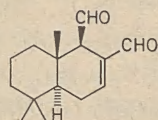
ten nie jest trucizną, gdyż owoce tej rośliny są ulubionym pokarmem wielu ptaków. Inną rośliną wschodnio-afrykańską, która z powodzeniem broni się przed atakiem owadów i jest przez tubylców stosowana jako środek je odstrasżający, jest krzew *Harrisonia abyssinica* znana tam pod



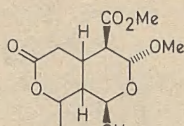
nazwą „msabubini” lub „mpapura-doko” [16]. Z rośliny tej wyizolowano aktywną substancję — harrisoninę. Jeszcze bardziej aktywnym antyfidantem okazał się odpowiedni diketon. Najprawdopodobniej właśnie ten diketon biosyntezywany jest przez samą roślinę, natomiast izolowana harrisonina jest już sztucznie otrzymanym z niego w procesie izolacji hemiketalem w pierścieniu B. Ugrupowanie diketonowe, obecne w natywnym związku, może bowiem z łatwością reagować z metanolem, użytym do ekstrakcji tego związku z rośliny. Problem tzw. „artefaktów”, tj. związków tworzących się w samym procesie izolacji produktów naturalnych z naturalnych surowców, jest jednym z bardziej kłopotliwych zagadnień współczesnej chemii bioorganicznej i wprowadza niekiedy wiele zamieszania przy ustalaniu prawidłowych mechanizmów badanych procesów biologicznych.

Obserwując i analizując inne rośliny, wykazujące analogiczną odporność w stosunku do owadów, wyizolowano wiele interesujących połączeń o silnych właściwościach typu antyfidantów. Między innymi warburganal (z *Warburga stuhlmannii*), ajugaryny (z *Ajuga remota*), ksylo-mollina (z *Xylocarpus sp. melicaeae*), trichyliny (z *Trichila roka*), poli-

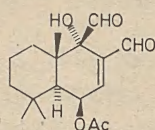




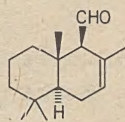
(-) POLIGODIAL



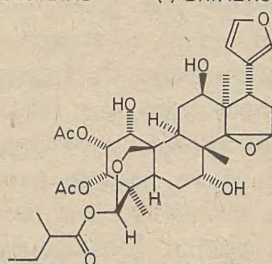
KSYLOMOLLINA



UGANDENSYDIAL



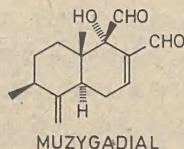
(-) DRIMENOL



TRICHYLINA A

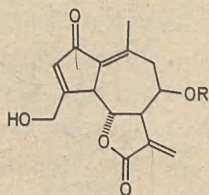
godial (z *Polygonum hydropiper*), ugandensydial czy muzygodial (z *Warburga ugansensis*) [16, 17, 18]. Ciekawe są korelacje tej specyficznej aktywności biologicznej z absolutną konfiguracją tych niektórych połączeń. Obecny w roślinie *Polygonum hydropiper*, (-)-poligodial, chroni ją przed mszycami, które zostały już nawet w dużym stopniu uodpornione na znane konwencjonalne insektycydy. Jednakże otrzymany syntetycznie jego enancjomer — (+)-poligodial — okazał się wysoce toksyczny dla roślin. Już 0,01% roztwór (+)-poligodiale powoduje bowiem znaczne uszkodzenia tkanki liści [22]. Pełny obraz mechanizmu działania tej grupy związków nie jest jeszcze w pełni poznany. Biorąc jednak pod uwagę niezwykle wysoką i specyficzną aktywność biologiczną tych związków można je uważać za bardzo atrakcyjne nowe środki ochrony roślin. Na przeszkodzie w ich szerszym stosowaniu stoi, jak na razie, ich skomplikowana struktura chemiczna i związana z tym złożona synteza. Możliwe i rozważane są dwa sposoby rozwiązania tego problemu: albo, wykorzystując możliwości manipulacji genetycznej, „uruchomić”, lub

czasem tylko zintensyfikować, szlaki biosyntezy prowadzące do tych obronnych substancji w samej roślinie, lub też wykorzystać fakt łatwiejszej dostępności z materiału roślinnego niektórych prostszych połączeń o zbliżonej budowie, które już w typowych przekształceniach chemicznych można będzie przeprowadzić w te wysoko aktywne antyfidanty.

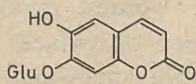


Ten drugi sposób wykorzystano już do otrzymania większych ilości warburganalu z łatwiej dostępnego (–)-drimenolu, izolowanego w znacznych ilościach z drzewa *Drimis winteri*. [22].

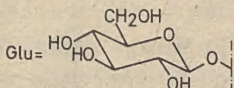
Rośliną, która zwróciła na siebie uwagę faktem bardzo ograniczonego na nią ataku ze strony roślinożernych owadów, jest cykoria podróżnik (*Cichorium intybus* L.). Można ją z łatwością hodować w szklarni, a co ważniejsze, sztuczna hodowla nie zmienia praktycznie dróg biosyntezy jej „wtórnych metabolitów”, w tym też substancji obronnych. Można więc było bardzo dokładnie ustalić, że związki które tworzą tę barierę ochronną to laktony seskwiterpenowe: 8-deoksylaktucyna, laktupikryna i laktucyna (zawarte w liściach i korzeniach), oraz związek z grupy kumaryn — cykoryna (obecna tylko w liściach) [24]. Ta ostatnia sub-



LAKTUCYNA R = H

LAKTUPIKRYNA R = OCOCH₂-

CYKORYNA

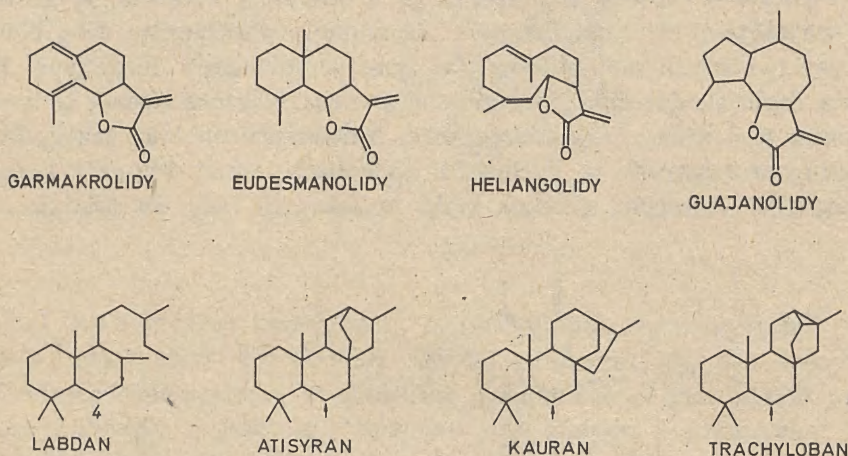


stancja jest efektywnym antyfidantem już przy stężeniu nie przekraczającym 0,006% suchej masy rośliny. Największe stężenie tych związków znajduje się w tych częściach rośliny, które są dla jej rozwoju

najważniejsze, a więc w tkankach najintensywniej się rozwijających. Bariera ochronna cykorii składa się więc z kilku biologicznie aktywnych substancji. Pokonanie takiej wieloskładnikowej bariery jest dla owadów znacznie trudniejsze. Trudno jest bowiem dla organizmu owada uruchomić mechanizmy detoksykacji w stosunku do kilku na raz związków.

Umieszczenie substancji obronnych w roślinie właśnie w rejonie jej największego zagrożenia jest również obserwowane u wielu innych roślin. W uprawianej w USA odmianie słonecznika (*Helianthus annuus*) duże straty powodowane są przez pasożytujące na nim owady, głównie *Homoeosoma electellum*. Zauważono jednak, że wiele dzikich odmian *Helianthus* jest odpornych na te pasożyty. Badania wykazały, że są za to również odpowiedzialne związki z grupy laktonów seskwiterpenowych, należące aż do czterech grup strukturalnych: germakrolidów, heliangolidów, eudesmanolidów i guajanolidów, oraz kwasów diterpenowych z grupy: labdanu, kauranu, atisyranu i trachylobanu z grupą karboksylową w pozycji 4 α [9]. Laktony seskwiterpenowe wywołują

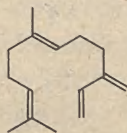
Grupy strukturalne laktonów seskwiterpenowych i kwasów diterpenowych



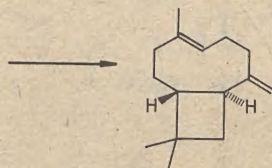
w organizmie owadów wiele niekorzystnych efektów fizjologicznych już na poziomie komórkowym. Są one bowiem m.in. inhibitorami biosyntezy białek i kwasów nukleinowych, oraz dezaktywują enzymy związane z procesem oddychania. W procesie ewolucji owady nabyły zdolność wcześniejszego wykrywania roślin, które te związki zawierają i starają się ich unikać. Laktony seskwiterpenowe spełniają więc skuteczną rolę deterrentów pokarmowych owadów [2, 13, 15; 27]. Larwy *Homeosoma electellum*, szczególnie pierwszego i drugiego stadium, odżywiają się prawie wyłącznie pyłkiem kwiatowym słonecznika. Brak tego podstawowego pożywienia praktycznie uniemożliwia egzystencję owada. Największe stężenie substancji obronnych jest w szyjce pylnika kwiatu, właśnie

w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca żerowania larw tego szkodnika. Niestety, uprawne odmiany słonecznika pozbawione są tej chemicznej obrony. Ponieważ słonecznik stanowi w USA jedno z podstawowych źródeł olei roślinnych, prowadzi się tam intensywne badania nad wyhodowaniem nowych odmian tej rośliny zawierającej więcej przedstawionych wyżej terpenoidowych substancji obronnych.

Innym interesującym sposobem samoobrony roślin przed szkodliwymi owadami jest wytworzenie przez nie substancji, które w samym procesie rozwoju i zachowania się owadów odgrywają kluczową rolę. Należą do nich m.in. feromony alarmowe sygnalizujące owadom określonego gatunku niebezpieczeństwo i zmuszające je do ucieczki lub organizacji obrony. Przykładów jest wiele, a przytoczony poniżej wytłumaczy mechanizm tego systemu samoobrony roślin. Feromonem alarmowym mszyc żerujących na ziemniaku jest (E)- β -farnezen. Wydzielany przez mszyce

(E)- β -FARNEZEN

w momencie zagrożenia powoduje ich szybką ucieczkę. Rośliny biosyntezujące ten właśnie związek są więc dobrze chronione, przynajmniej przed tymi szkodnikami [11]. Okazało się jednak, że niektóre rośliny, mimo że zawierają (E)- β -farnezen w wystarczająco dużej koncentracji, mogą być również miejscem kolonizacji mszyc. Długo zastanawiano się nad wyjaśnieniem tego zjawiska. W końcu ustalono, że brak efektu alarmowego (E)- β -farnezeniu wynika z obecności u tych roślin jeszcze innej substancji seskwiterpenowej, mianowicie (-)- β -kariofilenu, który

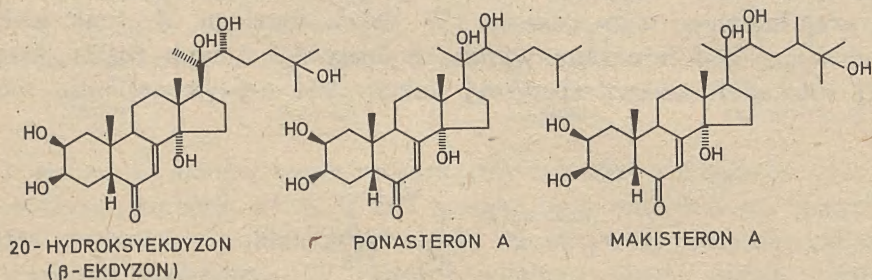
(-)- β -KARIOFILEN

może tworzyć się w roślinie poprzez prostą cyklizację obecnego tam (E)- β -farnezeniu. (-)- β -Kariofilen okazał się bowiem silnym inhibitorem „alarmowej” aktywności (E)- β -farnezeniu [22]. Oba wymienione wyżej związki występują w uprawnej odmianie ziemniaka *Solanum tuberosum*, stąd roślina ta nie może się sama obronić przed inwazją mszyc. Nato-

miast blisko z nią spokrewniona odmiana dziko rosnąca, *Solanum berthaultii*, nie cyklizuje (E)- β -farnezenu i nie zawierając (–)- β -kariofilenu skutecznie chroni się przed tym pasożytem.

Jest jeszcze inna grupa związków, które może wytworzyć roślina w swojej obronie, a które nie są ani truciznami ani repellentami, ale są tym groźniejsze dla owadów, że bezpośrednio oddziałują na specyficzny dla nich cykl rozwojowy. Wiele owadów rozwija się z jaj przechodząc przez trzy morfologicznie rozróżnialne stadia: larwy, poczwarki i dorosłego owada. Niektóre, przed przepoczwarczeniem, przechodzą kilka form larwalnych; inne już od początku swojego rozwoju formą morfologiczną przypominają dorosłe osobniki, a ulegają tylko okresowym linieniom, za każdym razem zwiększając swoje rozmiary. W regulacji tego cyklu rozwojowego bezpośrednią i podstawową rolę odgrywają m.in. dwa rodzaje hormonów: hormon juwenilny i hormon linienia (ekdyzony, lub poprawniej ekdysteroidy). Jedną z wielu poznanych funkcji hormonu juwenilnego jest utrzymywanie larwalnego etapu rozwoju, tzn. zapobieganie prrzedwczesnej metamorfozie. Natomiast ekdysteroidy właśnie inicjują linienie i zmianę formy morfologicznej. W dużym przybliżeniu można powiedzieć, że w momencie metamorfozy, czy linienia, stężenie hormonu juwenilnego w organizmie owada gwałtownie opada, natomiast wzrasta stężenie hormonu linienia [7]. Przekonano się też, że rośliny umieją syntezować substancje, które wykazują silne działanie imitujące aktywność obu hormonów. Liczną grupę przedstawicieli ekdysteroidów wytwarzanych przez rośliny nazwano fitoekdysteroidami [5].

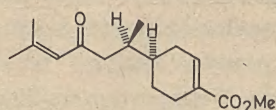
Fitoekdysteroidy



Bogate np. w 20-hydroksyekdyson okazały się kłącza spotykanej również u nas paproci zwyczajnej (*Polypodium vulgare*), czy orlicy pospolitej (*Pteridium aquilinum*). W liściach drzew *Podocarpus nakai*, *P. elatus* i *P. macrophyllus* znaleziono też inne, strukturalnie bliskie związki z grupy tzw. ponasteronów i makisteronów. W sumie rośliny są bogatszym źródłem związków tego typu niż same owady. Z wielu gatun-

ków roślin wyizolowano kilkadziesiąt różnych strukturalnych analogów ekdysteroidów, przy czym niektóre z nich okazały się bardziej aktywne biologicznie niż właściwy hormon linienia. Można więc sądzić, że związki te produkuje roślina jako substancje obronne przeciwko owadom, gdyż po ich spożyciu stężenie tego hormonu w organizmie owada powinno gwałtownie wzrosnąć i powodować przedwczesne linienie. Jednakże funkcje biologiczne fitoekdysteroidów w roślinie nie zostały jeszcze jednoznacznie wyjaśnione. Wiadomo np., że szarańcza pustynna (*Schistocerea gregaria*) odżywiana wyłącznie liśćmi paproci *Pteridium aquilinum*, bardzo bogatej w 20-hydroksyekdyzon, nie ma zakłóconego cyklu rozwojowego [23]. Również larwy jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) żerują na liściach morwy, które też zawierają znaczne ilości ekdysteroidów, a rozwijają się normalnie [23]. Fakty te usiłuje się wytłumaczyć bądź brakiem przyswajalności tego typu związków przez przewód pokarmowy owada, bądź też na wytworzonym u niektórych gatunków owadów sprawnym systemie enzymatycznym, który reguluje poziom hormonu linienia w organizmie poprzez wiązanie nadmiaru ekdysteroidów w odpowiedni glikozyd. Opisane są też przykłady ochronnej roli fitoekdysteroidów u biosyntezujących je roślin. Uczeni amerykańscy badali substancje chemiczne zawarte w roślinie *Ajuga remota*, która jako jedyny gatunek roślin ostał się po inwazji niemal wszystko jedzącej szarańczy. Ekstrakt z tej rośliny, zawierający znaczne ilości kilku fitoekdysteroidów, w eksperymentach prowadzonych na wielu gatunkach owadów powodował interesujące zakłócenia w procesie metamorfozy larwy do poczwarki, indukując tworzenie się nie jednej ale kilku puszek głowowych. W efekcie dojrzały owad ginie nie mając normalnie wykształconego aparatu gębowego [26]. Ta interesująca grupa połączeń nie ma jednak większych szans wykorzystania w organizowanym przez człowieka systemie ochrony roślin. Na przeszkodzie stoi tu dosyć złożona synteza chemiczna tych połączeń, jak również fakt utrudnionej penetracji tych związków poprzez kutykulę chroniącą organizm owada.

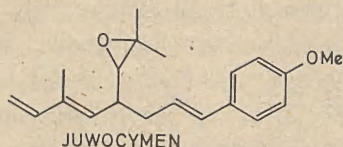
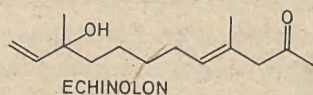
Równie wcześniej, bo już w roku 1965, udowodniono obecność w roślinach związków organicznych o działaniu imitującym aktywność hormonu juwenilnego. Przedstawicielem tej grupy połączeń jest juwabion,



JUWABION

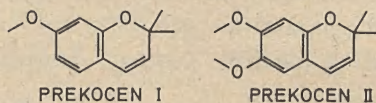
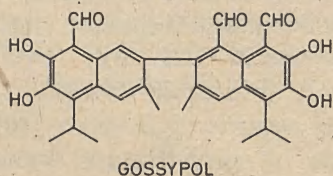
związek seskwiterpenowy, którego obecność w jodle *Abies balsamea* i jego specyficzną aktywność w stosunku do owadów z rodziny kowalowatych (*Pyrrhocoridae*), wykazali Williams i Slama [31]. W ko-

lejszych latach z innych roślin wyizolowano dalsze substancje o właściwościach juwenoidowych. Są to echinolon [14] i juwocymen [3]. Specyficzna aktywność hormonalna juwenoidów uniemożliwia wprowadzenie me-



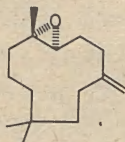
tamorfozę i prowadzi w efekcie do bezpotomnej śmierci owada, przedłuża jednak jego larwalny etap rozwoju, w którym zazwyczaj wyrządza on roślinie największe szkody.

Bardziej korzystna dla rośliny byłaby więc biosynteza substancji, które skracalyby ten niebezpieczny okres rozwoju pasożytujących na niej owadów i powodowałyby np. ich wcześniejszą metamorfozę. Obecność takich związków wykryto w niewielkiej roślinie *Ageratum houstonianum* [4]. Związki te, pochodne chromenu, mają bardzo prostą budowę i z uwagi na ich efekt biologiczny nazwano prekoceniem I i prekoceniem II



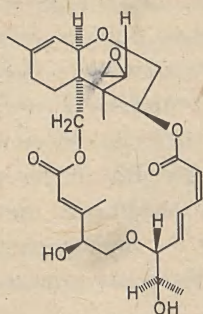
[precocious (ang) = przedwcześnie dojrzewający]. W dużym uproszczeniu, mechanizm ich biologicznej aktywności polega na niszczeniu w organizmie owada gruczołu wydzielniczego hormonu juwenilnego (*corpora allata*) powodując, obok przedwczesnego linienia, jeszcze inne ujemne skutki w organizmie owada. Prekoceny wykazują aktywność biologiczną tylko w stosunku do kilku gatunków owadów z rzędu *Hemiptera* i nadrzędu *Orthopteroidae*. Mimo bardzo prostej syntezy chemicznej oraz otrzymania już wielu analogów strukturalnych, nie znalazły one jeszcze praktycznego zastosowania w ochronie roślin.

Bardziej złożony system działania biologicznego zaobserwowano dla dwóch połączeń seskwiterpenowych: gossypolu i tlenku β -kariofilenu, biosyntezowanych przez niektóre rośliny bawełny (*Gossypium* sp.). Przewodząc testy biologiczne na *Anthonus grandis* i *Protoparce sexta*, groźnych szkodnikach plantacji bawełny i tytoniu, stwierdzono, że wyższa koncentracja gossypolu w roślinie powstrzymuje na długi czas rozwój owada już w jego wczesnych stadiach; natomiast niece niższe stężenie tego związku powoduje efekt przeciwny — szybki rozwój i dojrzewanie. Obecny w roślinie tlenek β -kariofilenu zwiększa znacznie aktywność bio-

tlenek β -KARIOFILENU

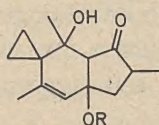
logiczną i to obu tych przeciwnych efektów wywoływanych przez gossypol. Tą ciekawą i złożoną aktywność biologiczną próbuje się wytłumaczyć tym, że przy większych stężeniach oba związki działają jako deterenty pokarmowe, natomiast przy mniejszych stężeniach jako stymulatory żerowania [33].

Przytoczone przykłady systemu obronnego roślin, jego skuteczność ale też bardzo często zawodność, stanowią jedynie mały fragment obszernego działu wiedzy, zwanej chemią ekologiczną. Pominięte tu zostały nakładające się na siebie efekty wzajemnego, chemicznego współoddziaływania owadów, często nieobojętne również dla roślin (jak np. współzawodnictwo w atakowaniu drzew przez dwa gatunki kornika *Dendroctonus frontalis* i *Ips avulsus* [21]), symbiotyczne oddziaływania owad-roślina, jak również znaczącej roli w tych oddziaływaniach mikroorganizmów (np. roli grzyba — opieńki miodowej (*Armillariella mellea*) w biotransformacji α -pine-
nu, zawartego w żywicy drzew iglastych, do werbenoli — podstawowych składników feromonów agregacyjnych licznych gatunków korników [6]). Niekiedy rośliny całkiem niegroźne dla otoczenia, za sprawą mikroorganizmów zawartych w glebie, stają się niebezpiecznie toksyczne. Rosnąca w Brazylii roślina *Baccharis coridifolia* D.C. (*Compositae*) powoduje okresowe zatrucia bydła które się na niej pasie [28]. Jak stwierdzono, jest to spowodowane obecnością w glebie grzybów *Myrothecium roridum* i *M. verrucaria*, które biosyntezują mykotoksyny: roridyne A i warra-curyne. Same rośliny *Baccharis coridifolia* i *B. megapotamica* są odporne na ich działanie, przyswajają je jednak z gleby oraz metabolizują do innych trujących połączeń z grupy seskwiterpenów, tzw. bakkaranoidów, i same stają się toksyczne. Analogiczne przypadki udowodniono również



(BAKKARADOIDY)
MIOTOKSYNA A $\equiv$
 $\equiv$ 4'-HYDROKSYRORYDYNA E

dla niektórych gatunków paproci, m.in. dla opisanej wcześniej *Pteridium aquilinum*, izolując z niej toksyczny i kancerogeny glikozyd norseskwi-terpenowy — ptakwilozyd, który jest również metabolitem mykotoksyn. Związki tego typu są też najprawdopodobniej powodem okresowych zatruc koni w Wielkiej Brytanii ("the grass sickness"), gdyż jej objawy są identyczne do przypadków zatruc wywoływanych przez związki z grupy



R = glukoza

PTAKWILÓZYD

makrocyklicznych trichotecenemycotoksyn: roridyne A, werucyne A, czy 4'-hydroksyroridyne [28].

Znane są też rośliny, które same potrafią chwycić owady i przy użyciu specjalnych enzymów uzyskiwać z nich substancje potrzebne im do rozwoju. Przykładem mogą być rosnące i u nas odmiany rosiczek (*Drosera rotundifolia* i *D. anglica*), czy też bardziej egzotyczne, bo rosnące w górach Boliwii, Peru i Chile, odmiany ziemniaka *Solanum berthaultii* Hawkes. Rośliny te, w tym celu wykształciły wyrafinowany system włosków, substancji kleistych, drażniących substancji chemicznych i enzymów [10].

Ilość wyizolowanych niskocząsteczkowych związków organicznych zaangażowanych w systemy obronne roślin jest ogromna. Przedstawienie ich struktury wraz z podaniem udowodnionej, czy postulowanej funkcji biologicznej wymagałoby napisania wielotomowego dzieła. Artykuł ten stanowi jedynie małą ilustrację tych bardzo złożonych układów współzależności żywych organizmów, jakie spotykamy w przyrodzie. Inne przykłady takich „chemicznych” współzależności roślina — owad znajdzie czytelnik również w artykule w języku polskim zamieszczonym w czasopiśmie „Pestycydy” [20]. O tych uwarunkowaniach trzeba też zawsze pamiętać ingerując w naturalne środowisko, gdyż w przeciwnym

wypadku można w nim wywołać trudne do przewidzenia ujemne skutki. Sama przyroda dostarcza nam również ciągle nowych pomysłów w organizacji zintegrowanego systemu ochrony roślin, ale też udowadnia, że nie ma uniwersalnych rozwiązań i idealnych insektycydów. Ciągły proces ewolucji wymaga nieprzerwanego poszukiwania nowych metod selektywnego zwalczania szkodliwych owadów. Spodziewany sukces uwarunkowany jest jednak zgodnym współdziałaniem specjalistów wielu dyscyplin, a przede wszystkim biologów, biochemików, chemików i ekologów.

LITERATURA

1. Batra S. W. T. — *Polyester-making bees and other innovative insect chemists*, J. Chem. Education 62: 121-124, 1985.
2. Błoszyk E. — *Plant extracts and sesquiterpene lactons with antifeeding activity on some stored product insects*, W: *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*, red. Sehnał F., Zabża A., Denlinger D. L., Wyd. Politechnika Wrocławska, vol. I, str. 109-112, 1988.
3. Bowers W. S., Nishida R. — *Juvocimenes: potent juvenile hormone mimics from sweet basil*, Science 209: 1030-1031, 1980.
4. Bowers W. S., Soderlund D. M. — *Chemistry and action of the precoces*, W: *Regulation of insect development and behaviour*, red. Sehnał F., Zabża A., Menn J. J., Cymborowski B., Wyd. Politechnika Wrocławska, vol. I, str. 309-322, 1981.
5. Canonica L. — *Phytoecdisonenes: environmental degradation*, W: *Produits naturels et la protection des plantes*, red. Marini-Bettolo G. B., Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia, Watykan, str. 209-223, 1977.
6. Cagara C., Draczyńska B., Siewiński A., Zabża A., Rymkiewicz A., Leufven A. — *Aggregating pheromones of bark beetle in the products of microbiological transformation of some terpenes*, W: *Regulation of insect development and behaviour*, red. Sehnał F., Zabża A., Menn J. J., Cymborowski B., Wyd. Politechnika Wrocławska, vol. II, str. 1105, 1981.
7. Cymborowski B. — *Endokrynologia owadów*, PWN, Warszawa, 1984.
8. Elliot M. — *Synthetic insecticides designed from the natural pyrethrins*, W: *Produits naturels et la protection des plantes*, red. Marini-Bettolo G. B., Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia, Watykan, str. 157-176, 1977.
9. Gershenzon J., Rossiter M., Mabry T. J., Rogers C. E., Blust M. H., Hopkins T. L. — *Insect antifeedant terpenoids in wild sunflower*, W: *Bio-regulators for pest control*, red. Hedin A., American Chemical Society, ACS Symposium Series No 276, str. 433-445, 1985.
10. Gibson R. W., Pickett J. A. — *Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone*, Nature 302: 608-609, 1983.
11. Griffiths D. C., Pickett J. A. — *A potential application of aphid alarm pheromones*, Ent. Expt. Appl. 27: 199-201, 1980.
12. Hedin P. A., Collum D. H., White W. H., Parrott W. L., Lane H. C., Jenkins J. N. — *The chemical basis for resistance in cotton to Heliothis insects*, W: *Regulation of insect development and behaviour*, red. Sehnał F., Zabża A., Menn J. J., Cymborowski B., Wyd. Politechnika Wrocławska, vol. II, str. 1071-1086, 1981.

13. Herout V. — *Plant-insect interaction from the view-point of phylogeny*. W: *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*. red. Sehnal F., Zabża A., Denlinger D. L., Wyd. Politechnika Wrocławska, vol. I, str. 3-17, 1988.
14. Jacobson M., Redfern R. E., Mills G. D. Jr. — *Naturally occurring insect growth regulators. II. Echinolon, a highly active juvenile hormone mimic from Echinacea angustifolia roots*. *Lloydia* 38: 473-476, 1975.
15. Kopecky J., Vokac K., Toman J., Novotny L., Harmatha J. — *Determination of bisabolangelone in fruits of Angelica sylvestris L. by HPLC*. W: *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*. red. Sehnal F., Zabża A., Denlinger D. L., wyd. Politechnika Wrocławska, vol. I, str. 87-89.
16. Meinwald J., Prestwich G. D., Nakanishi K., Kuba I. — *Chemical ecology: studies from East Africa*. *Science* 199: 1167-1173, 1978.
17. Nakanishi K. — *Insect growth regulators from plants*. W: *Produits Naturels et la protection des plantes*. red. Marini-Bettolo G. B., Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia, Watykan, str. 185-198, 1977.
18. Nakanishi K., Cooper R., Nakatani M. — *Isolation and structures of two insect antifeedants; Application of droplet counter-current chromatography, 2-D-¹H-NMR and a new circular dichroic correlation*. W: *Regulation of insect development and behaviour*. red. Sehnal F., Zabża A., Menn J. J., Cymborowski B., wyd. Politechnika Wrocławska, vol. II, str. 1091-1102, 1981.
19. Nathanson J. A. — *Coffeine and related methyloxanthines — possible naturally-occurring pesticides*. *Science* 226: 184-187, 1984.
20. Nawrot J. — *Produkty naturalne w ochronie roślin*. *Pestycydy* 1984: 1-31, (1984).
21. Payne T. L., Richerson J. V. — *Pheromone-mediated competitive replacement between two bark beetle populations: influence on infestation suppression*. *Zeitschrift fur angewandte Entomologie* 99: 131-138, 1985.
22. Pickett J. A. — *Production of behaviour-controlling chemicals by crop plants*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 310: 235-239, 1985.
23. Rees H. H. — *Ecdysones*. W: *Aspects of terpenoid chemistry and Biochemistry*. red. Goodwin T. W., Academic Press, London, N. York, str. 181-222, 1971.
24. Rees S. B., Harborne J. B. — *The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the Chicory plant*. *Phytochemistry* 24: 2225-2231, 1985.
25. Rembold H. — *Secondary plant products in insect control, with special reference to the azadirachtins*. W: *Advances in invertebrate reproduction* 3, red. Engels W., Elsevier Science Publishers, str. 481-491, 1984.
26. Rosenthal G. A. — *The chemical defences of higher plants*. *Sci. Amer.* 1986: 76-81, 1986.
27. Rosiński G., Błoszyk E., Harmatha J., Knapik A. — *Changes produced by sesquiterpenes in some physiological processes in Tenebrio molitor L. larvae*. W: *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*. red. Sehnal F., Zabża A., Denlinger D. L., wyd. Politechnika Wrocławska, str. 91-94, 1988.
28. Schoental R. — *Mycotoxins and the toxicity of plants*. *Chemistry of Britain* 1984: 1108, 1984.
29. Smiley J. T., Horn J. M., Rank N. E. — *Ecological effects of salicin at three trophic levels: new problems for old adaptations*. *Science* 229: 649-651, 1985.
30. Whittaker R. H., Fenny P. P. — *Allelochemicals: chemical interactions between species*. *Science* 171: 757-770, 1971.

31. Williams C. M., Slama K. — *The juvenile hormone. VI. Effects of the "paper factor" on the growth and metamorphosis of the bug Pyrrhocoris apterus.* Biol. Bull. 130: 791-799, 1968.
32. Wood W. F. — *Chemical ecology: chemical communication in nature.* J. Chem. Education 60: 531-539, 1983.
33. Artykuł Redakcyjny. *Plants natural defenses may be key to better pesticides.* Chemical and Engineering News 1985: 46-51, 1985.

CONTENTS

From the Editor	3
Edward Galas — Enzyme Technology	5
Edward Galas, Tadeusz Trzmiel — Production and application of bacterial alkaline proteinases	15
Edward Galas, Rita Pyć, Irena Romanowska — Exo1,4- β -glucosidase	25
Edward Galas, Celina Kubik, Marianna Turkiewicz — Microbial pectic enzymes and their application	39
Edward Galas, Celina Kubik, Barbara Sikora — Enzymatic degradation of dextrans in raw beet juices	57
Edward Galas, Ewa Kwapisz, Jacek Polak — Application of genetic methods in search and construction of bacteria overproducing of α -amylase	63
Edward Galas, Teresa Bobowicz-Lassocińska — Microbial enzymes hydrolyzing α -1,6 glucosidic bonds Potential applications	79
Tadeusz Antczak, Alina Krystynowicz, Edward Galas — Biosynthesis and application of lipases and esterases in esters synthesis and transformation of acyloglycerols	95
Stanisław Bielecki — Microbial lytic enzymes	111
Piotr Moszczyński — Biosynthesis of vitamins	127
Andrzej Zabża — Chemical basis of plant-insect mutual interaction	155

SPIS TRESCI

Od Redakcji	3
Edward Galas — Technologia enzymowa	5
Edward Galas, Tadeusz Trzmiel — Wytwarzanie i zastosowanie alkalicznych proteinaz bakteryjnych	15
Edward Galas, Rita Pyć, Irena Romanowska — Egzo-1,4- β -glukozydaza . . .	25
Edward Galas, Celina Kubik, Marianna Turkiewicz — Drobnoustrojowe enzy- my pektynolityczne i ich zastosowanie	39
Edward Galas, Celina Kubik, Barbara Sikora — Enzymatyczna degradacja dekstranów w sokach cukrowniczych	57
Edward Galas, Ewa Kwapisz, Jacek Polak — Zastosowanie metod genetycz- nych w poszukiwaniu i konstrukcji bakterii wydajnie wytwarzających α -amylazy	63
Edward Galas, Teresa Bobowicz-Lassocińska — Mikrobiologiczne enzymy hydrolizujące wiązania α -1,6 glukozydowe. Możliwości zastosowania . . .	79
Tadeusz Antczak, Alina Krystynowicz, Edward Galas — Biosynteza i zasto- wanie lipaz i steraz w syntezie estrów i transformacji acylogliceroli . . .	95
Stanisław Bielecki — Drobnoustrojowe enzymy lityczne	111
Piotr Moszczyński — Biosynteza witamin	127
Andrzej Zabża — Chemiczne podstawy oddziaływania roślin-owad. Skutecz- ność i zawodność naturalnych systemów obronnych roślin przeciwko owadom	155

SPIS TREŚCI ROCZNIKA 1989

(Nr zeszytu, strona)

ARTYKUŁY

<i>Antczak Tadeusz, Krystynowicz Alina, Galas Edward</i> — Biosynteza i zastosowanie lipaz i esteraz w syntezie estrów i transformacji acylogliceroli	1	95
<i>Banaszak Józef</i> — Strategia ochrony owadów zapylających w Polsce	3	363
<i>Banaszak Józef, Kasprzak Krzysztof</i> — Zasady użytkowania i ochrony wód powierzchniowych dla zabezpieczenia zasobów hydrobiologicznych	3	375
<i>Bielecki Stanisław</i> — Drobnoustrojowe enzymy lityczne	1	111
<i>Gabryszewska Eleonora, Saniewski Marian</i> — Czynniki regulujące wzrost i rozwój roślin ozdobnych z rodzin <i>Liliaceae</i> , <i>Amaryllidaceae</i> i <i>Iridaceae</i> <i>in vitro</i>	4	485
<i>Galas Edward</i> — Technologia enzymowa	1	5
<i>Galas Edward, Bobowicz-Lassocińska Teresa</i> — Mikrobiologiczne enzymy hydrolizujące wiązania α -1,6-glukozydowe. Możliwości zastosowania	1	79
<i>Galas Edward, Kubik Celina, Sikorska Barbara</i> — Enzymatyczna degradacja dekstranów w sokach cukrowniczych	1	57
<i>Galas Edward, Kubik Celina, Turkiewicz Marianna</i> — Drobnoustrojowe enzymy pektynolityczne i ich zastosowanie	1	39
<i>Glas Edward, Kwapisz Ewa, Polak Jacek</i> — Zastosowanie metod genetycznych w poszukiwaniu i konstrukcji bakterii wydajnie wytwarzających α -amylazy	1	63
<i>Galas Edward, Pyć Rita, Romanowska Irena</i> — Egzo-1,4- β -glukozydaza	1	25
<i>Galas Edward, Trzmiel Tadeusz</i> — Wytwarzanie i zastosowanie alkalicznych protei- naz bakteryjnych	1	15
<i>Karczmareczuk Roman</i> — Limba europejska i syberyjska	2	251
— Pomniki zwierząt	3	385
<i>Kostarczuk Ewa</i> — Rola układu wegetatywnego na tle ogólnych procesów neurofizjologicznych w kształtowaniu się wrażeń hedonicznych	4	469
<i>Kośmicki Eugeniusz</i> — Uwagi o życiu i dziele Konrada Lorenza	4	423
<i>Łomnicki Adam</i> — Władysław Grodziński (1934-1988)	3	313
<i>Marcinkowski Stanisław J. S.</i> — Rozwój badań nad surfaktantem — potwierdzenie słuszności założeń Wojciecha Węśława o filogenezie nabłonka płucnego	2	201
<i>Moszczyński Piotr</i> — Biosynteza witamin	1	127
<i>Promińska Elżbieta</i> — Zachowania agresywne małpiek i małp	4	453
<i>Saniewski Marian</i> — Występowanie i aktywność fizjologiczna prostaglandyn w roślinach	2	211
<i>Sowa Ryszard</i> — Prof. dr hab. Karol Starmach	4	417
<i>Szablewski Leszek</i> — Reakcja niektórych komórek na obecność inhibitorów metabolizmu w środowisku	3	331
<i>Szymczak Jadwiga T.</i> — Charakterystyka czasowa snu i czuwania ptaków	2	225
<i>Uciński Stanisław</i> — Produkcyjność biologiczna Bałtyku w bieżącym stuleciu na podstawie połowów ryb	2	239
<i>Urbanek Adam</i> — Horyzonty intelektualne biologii współczesnej	2	183
<i>Wachowicz Barbara</i> — Selen w płytkach krwi	3	319
<i>Woyciechowski Michał</i> — Ewolucja zachowań społecznych błonkówek	4	429

<i>Zabza Andrzej</i> — Chemiczne podstawy oddziaływania roślin-owad. Skuteczność i zawadność naturalnych systemów obronnych roślin przeciwko owadom	1	155
<i>Zemanek Alicja</i> — Charakterystyka rozwoju botaniki w Uniwersytecie Jagiellońskim w latach 1780-1917	4	505
<i>Zeńczak Michał</i> — Organizmy żywe w polu elektrycznym o częstotliwości przemysłowej	3	343

DYSKUSJA I KRYTYKA

<i>Cebat Stanisław</i> — Teoria naturalna ewolucji czy mutacje dyskryminujące	4	519
<i>Sabath Karol</i> — Kontrowersje wokół powstania lotu aktywnego u kręgowców	4	527

RECENZJE

<i>Karczmarsz Kazimierz</i> — A. Cronquist: The evolution and classification of flowering plants	4	559
— R. E. Longton: The biology of polar bryophytes and lichens	4	558
<i>Kasprzak Krzysztof</i> — Książka o kwiatach, zapylaniu i pszczołach (J. Banaszak: Pszczoły i zapylanie roślin)	3	403
<i>Kielan-Jaworowska Zofia</i> — M. Ryszkiewicz: Jak zostać człowiekiem — przepis ewolucyjny	3	397
<i>Kornaś Jan</i> — B. Dell, A. J. M. Hopkins, B. B. Lamont (red.): Resilience in mediterranean-type ecosystems	2	262
— K. M. Urbanska: Differentiation patterns in higher plants	2	262
<i>Kośmicki Eugeniusz</i> — I. Eibl-Eibesfeldt: Der Mensch — das riskierte Wesen. Zur Natugeschichte menschlicher Unvernunft	4	550
— H. Markl: Natur als Kulturaufgabe. Ueber die Beziehungen des Menschen zur lebendigen Natur	2	263
— W. Nachtigall: Lebensräume. Mitteleuropäische Landschaften und Ökosysteme	2	267
— F. M. Wuketits: Jenseits von Zufall und Notwendigkeit. Biologische und kulturelle Evolution des Menschen	4	546
<i>Latowski Karol</i> — Srawnitel'naja anatomija semjan	4	557
— A. Ł. Tachtadźjan: Sistiema magnoliofitow	4	555
<i>Ochyra Ryszard</i> — G. F. Baczurina, W. M. Melniczuk: Flora mochiw Ukrainskoj RSR. Wip. 1	2	279
— Bryostephane Steereana: a collection of bryological papers presented to William Campbell Steere on the occasion of his 80th birthday	4	560
— C. Casas, M. Brugués, R. M. Cros, C. Sérgio: Cartografia de Briofits. Peninsula Ibérica i les Illes Balears, Canàries, Açores i Madeira	4	561
— E. R. Farr, J. A. Leussink, G. Zijlstra (red): Index Nominum Genericorum (Plantarum)	2	273
— Flora of Suriname. Vol. VI. Part I. <i>Musci</i>	4	563
— S. W. Greene, A. J. Harrington: The conspectus of bryological taxonomic literature	4	564
— R. E. Magill: Flora of Southern Africa which deals the territories of South Africa... <i>Bryophyta</i> . Part 1	2	277
— E. Nyholm: Illustrated flora of Nordic mosses. Fasc. 1. <i>Fissidentaceae</i> - <i>Seligeriaceae</i>	2	275
— C. Oostendorp: The bryophytes of the Palaeozoic and the Mesozoic	4	565

<i>Pinowski Jan</i> — J. Zucchetto, A. M. Jansson: Resources and society. A systems ecology study of the Island of Gotland, Sweden	4	543
<i>Sabath Karol</i> — D. M. Raup: The Nemesis affair. A story of the death of dinosaurs and the ways of science	2	272
— M. Ryszkiewicz: Mieszkańcy światów alternatywnych	2	269
<i>Szarski Henryk</i> — B. Żernicki: Od neuronu do psychiki	2	261
<i>Szmajda Piotr</i> — G. Lucôte: Génétique des populations. Initiation théoretique et biochimique a l'étude du polymorphisme	4	566
<i>Wojewoda Władysław</i> — M. A. Bondarceva, E. H. Parmasto: Clavis diagnostica Fungorum URSS. Ordo <i>Aphyllophores</i> . F. 1	3	400
— J. Eriksson, K. Hojortstam, K. H. Larsson, L. Ryvarden: The <i>Corticaceae</i> of North Europe	3	399
— R. L. Gilbertson, L. Ryvarden: North American Polyphores	3	402
<i>Żarnowiec Jan</i> — G. S. Mogensen (red): Illustrated moss flora of Arctic North America and Greenland	2	281

ZEBRANIA, ZJAZDY I KONFERENCJE NAUKOWE

<i>Kuźnicki Leszek</i> — Czwarty Międzynarodowy Kongres Biologii Komórki, Montreal	3	405
Uroczyste Posiedzenie Rady Naukowej w związku z 70-leciem Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk	2	283
[Wystąpienia]:		
<i>Klekowski Romuald, Fischer Zofia</i> — Profesor Mieczysław Bogucki, 1884-1965	2	300
<i>Kuźnicki Leszek</i> — Jan Dembowski — Przesłania	2	296
<i>Niemierko Stella</i> — Kazimierz Białaszewicz, 1882-1943	2	293
<i>Strzelecka-Golaszewska Hanna</i> — Witold Drabikowski, 1925-1983	2	310
<i>Wojtczak Lech</i> — Włodzimierz Niemierko, 1897—1985	2	307
<i>Zieliński Kazimierz</i> — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego	2	284
<i>Żernicki Bogusław</i> — Wspomnienie o Jerzym Konorskim, 1903—1973	2	303
<i>Żernicki Bogusław</i> — Dziewięć konferencji Trzech Instytutów	3	408

VARIA

<i>Riabinin Sergiusz</i> — O zaznajamianiu niewidomych ze światem przyrody („Pochodnia”, 6/1988)	3	412
--	---	-----

**Tylko prenumerata zapewnia
regularne otrzymywanie
kwartalnika**

K O S M O S

Prenumerata krajowa

Warunki prenumeraty:

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PBK XIII Oddział w Warszawie Nr 3700441195-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Prenumerata zagraniczna

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny.
- do dnia 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa. Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly

through the
Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

Indeks 36260
