



α -(1→3)-Glukany ściany komórkowej żółciaka siarkowego – *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill – izolacja, charakterystyka i zastosowanie do indukcji syntezy mutanazy

Adrian Wiater, Małgorzata Pleszczyńska, Janusz Szczodrak,
Katarzyna Próchniak

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej, Lublin

α -(1→3)-Glucans from cell wall of *Laetiporus sulphureus*
(Bull.:Fr.) Murrill – isolation, characteristics and application for in-
duction of mutanase synthesis

Summary

Five different methods described in the literature were used for the isolation of α -(1→3)-glucans from the cell wall of fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill, and their comparative analysis was performed. The separated fungal biopolymers were well-characterized in respect of their structure and some physicochemical properties. Structural analyses, i.e., Fourier-transform infra-red (FT-IR) spectroscopy, ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and specific rotation, revealed that the alkali-soluble wall fraction from this basidiomycetous fungus contained about 56% of (1→3)-linked α -glucans. Four out of five α -(1→3)-glucans isolated by different methods from the mycelium of the polypore fungus *L. sulphureus* induced higher activity of fungal and bacterial mutanase than those obtained on mutan. Therefore, the α -(1→3)-glucans from fruiting bodies of *L. sulphureus* can be used as a new alternative to streptococcal mutan, which so far has been known as the best inducer of mutanase production.

Key words:

Laetiporus sulphureus, α -(1→3)-glucans, structural analyses, mutanase induction.

Adres do korespondencji

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

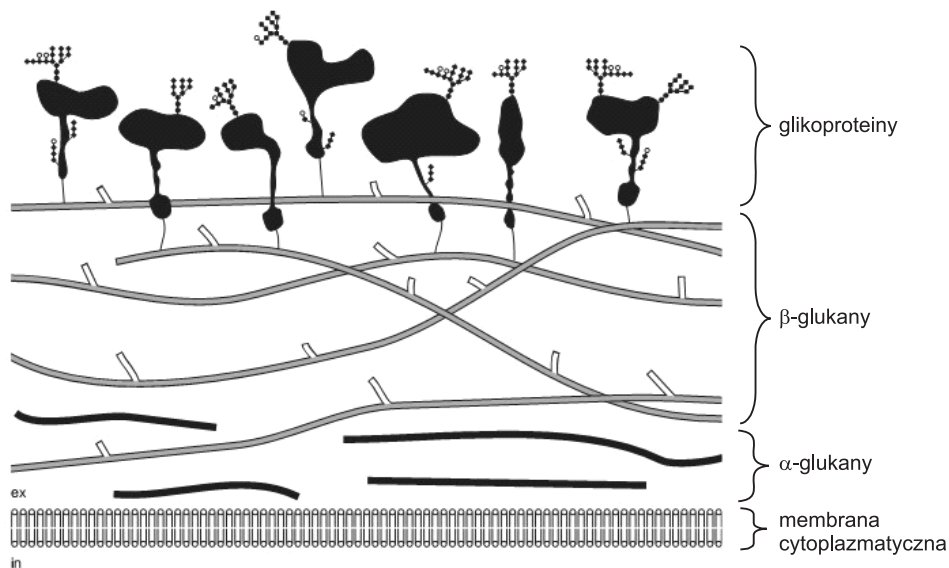
biotechnologia

2 (81) 174–189 2008

1. Wstęp

Głównymi komponentami ściany komórkowej grzybów są glikoproteiny i polisacharydy decydujące o jej sztywności, a jednocześnie zapewniające jej elastyczność niezbędną w czasie wzrostu komórek. Poszczególne elementy tworzą strukturę warstwową, w której glikoproteiny występują na zewnątrz, zaś wewnętrzną warstwę stanowią polisacharydy: β -(1→3)-glukany, β -(1→6)-glukany, α -(1→3)-glukany oraz chityna. Zewnętrzna warstwa glikoproteinowa przykrywa mikrofibrylarną sieć gęsto upakowanych β -glukanów, kowalencyjnie związanych z łańcuchami chityny. Najgłębiej położone są nierozgałęzione łańcuchy α -(1→3)-glukanów, przy czym nie jest do końca wiadomo czy stanowią one integralną część sieci β -glukanowo-chitynowej (rys. 1) (1). Architektura ściany komórkowej, a szczególnie występowanie α -glukanów i chityny, różni się znacząco u poszczególnych gatunków grzybów.

Obecność α -(1→3)-glukanów została stwierdzona u licznych przedstawicieli należących zarówno do klasy *Ascomycetes*, jak i *Basidiomycetes*. Ilość tych polisacharydów u poszczególnych grzybów waha się w bardzo szerokim zakresie; brak ich u drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans* (1), jednak w grzybni *Aspergillus niger* ich zawartość sięga 9% (2), u *Histoplasma capsulatum* 46,5% (3), a w owocnikach porka brzożowego – *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) i żółciaka siarkowego – *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill, odpowiednio nawet 44-53 i 75-88% suchej masy (4-6).



Rys. 1. Struktura ściany komórkowej grzybów wg Grüna (1).

α -(1→3)-Glukany będące składnikiem strukturalnym ściany komórkowej grzybów pełnią w niej funkcję podporową, są czynnikiem wirulencji u niektórych patogenów lub stanowią materiał zapasowy (7-9). Ponadto, mogą one stanowić bogate źródło bezpiecznego i taniego induktora α -(1→3)-glukanaz (mutanaz), alternatywnego w stosunku do paciorkowcowego α -(1→3)-glukanu (mutanu) (10).

α -(1→3)-Glukanazy należą do klasy hydrolaz rozkładających wiązania α -(1→3)-glukozydowe. Opracowanie wydajnej, taniej i zarazem bezpiecznej technologii produkcji tych enzymów w skali fabrycznej otworzyłoby perspektywę dla szerszego ich wykorzystania w profilaktyce stomatologicznej do efektywnego usuwania filmów tworzonych na zębach przez patogenne drobnoustroje jamy ustnej i oczyszczania z biofilmów aparatów protetycznych (11).

Dotychczas najlepszym źródłem induktora dla biosyntezy mutanaz był mutan produkowany pozakomórkowo przez niektóre szczepy próchnicotwórczych paciorkowców zmiennych, m. in. *Streptococcus mutans* i *S. sobrinus*. Jednak produkcja tego biopolimeru jest z wielu powodów niemożliwa do przeprowadzenia od strony biotechnologicznej. Związane jest to głównie z: 1) zastosowaniem wieloetapowej procedury wymagającej użycia patogennych dla personelu producentów oraz drogiego i niebezpiecznego podłoża hodowlanego (wołowy wyciąg mózgowo-sercowy), 2) stosunkowo niską wydajnością otrzymywanego produktu (2,2 g/dm³ podłoża), 3) znaczną zmiennością strukturalną mutanu, zależną zarówno od użytego szczepu bakteryjnego, rodzaju podłoża, jak i warunków hodowli (10,12). Problemy te sprawiają, że mutan nie jest produkowany jako preparat handlowy przez żadną firmę na świecie. Dlatego wielu badaczy jest od dawna zainteresowanych poszukiwaniem nowych, tanich, bezpiecznych, a zarazem skuteczniejszych zamienników tego aktywatora. W tym właśnie kierunku zmierzają również prace prowadzone w naszym laboratorium, w których wykorzystano bogate w α -(1→3)-glukany owocniki *L. sulphureus* jako źródło induktorów mutanaz.

W artykule przedstawiono i porównano różne metody izolacji α -(1→3)-glukanów z owocników *L. sulphureus* oraz określono ich strukturę i podstawowe właściwości fizykochemiczne, łącznie z oceną ich przydatności jako induktorów syntezy bakteryjnych i grzybowych mutanaz.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał grzybowy

Owocniki żółciaka siarkowego – *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill zebrano w okresie od maja do sierpnia 2005 r. z zainfekowanych drzew w Lublinie i jego okolicach. Poszczególne zbiory zostały zidentyfikowane od strony taksonomicznej przez Zofię Flisińską z Zakładu Botaniki i Mykologii UMCS w Lublinie.

2.2. Metody izolacji α -(1→3)-glukanów

Do izolacji α -(1→3)-glukanów z żółciaka siarkowego zastosowano pięć różnych metod, w których użyto mieszanek wysuszonych (zliofilizowanych) i sproszkowanych owocników w ilości 100 g.

2.2.1. Metoda I wg Mizuno i wsp. (13)

Zliofilizowane i zmielone owocniki żółciaka siarkowego zawieszano w 2 dm³ wody destylowanej i wirowano do zaniku barwy (9600 obr/min, 10 min). Przemytą biomasę ponownie zawieszano w 2 dm³ wody destylowanej i autoklawowano w 121°C przez 20 min, a następnie odwirowywano. Czynność autoklawowania i wirowania powtarzano 3-krotnie. W celu pozyskania polimerów nierozpuszczalnych w wodzie, a rozpuszczalnych w zasadach, częściowo oczyszczoną zawiesinę owocników ogrzewano (60°C) w 2 dm³ 5% KOH przez 20 min. Po tym czasie zawiesinę odwirowywano, a osad przepłukiwano 3 razy 5% KOH. Alkaliczne supernatanty neutralizowano 22,5% CH₃COOH, a otrzymany precypitat (glukan) odwirowywano. Po 3-krotnym przepłukaniu wodą destylowaną preparat glukanu zamrażano i poddawano suszeniu w liofilizatorze.

2.2.2. Metoda II wg Wiater i wsp. (10)

Zliofilizowane i zmielone owocniki żółciaka siarkowego zawieszano w 2 dm³ wody destylowanej i autoklawowano (121°C, 60 min), a następnie pozostawiano na noc w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu i przepłukaniu wodą destylowaną, autoklawowanie powtarzano 2-krotnie, każdorazowo przepłukując osad wodą destylowaną. Następnie przeprowadzano ekstrakcję częściowo oczyszczonego materiału za pomocą 2 dm³ 1 M NaOH. W celu całkowitego wyeliminowania związków nierozpuszczalnych w zasadach, rozpuszczony w NaOH preparat mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego (300 obr/min) przez 24 godz. Po tym czasie, uzyskany po odwirowaniu supernatant, neutralizowano 1 M HCl, doprowadzając pH do wartości 7,0. Uzyskany biały, amorficzny precypitat przepłukiwano 3-krotnie wodą destylowaną, zamrażano i suszono w liofilizatorze.

2.2.3. Metoda III wg Kiho i wsp. (14)

Zliofilizowane i zmielone owocniki żółciaka siarkowego ekstrahowano (temp. pokojowa, 24 godz.) kolejno za pomocą metanolu, 0,9% NaCl, gorącej wody i 5% Na₂CO₃. Następnie osad zawieszano w 5 dm³ 1 M NaOH z dodatkiem (1g) borowo-

dorku sodu i całość mieszano (300 obr/min) przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Uzyskany ekstrakt neutralizowano 1 M HCl, powstały osad odwirowywano i przepłukiwano 3-krotnie wodą destylowaną. Otrzymany precypitat zamrażano i suszono w liofilizatorze.

2.2.4. Metoda IV wg Hasegawa i wsp. (15)

Zliofilizowane i zmielone owocniki żółciaka siarkowego zawieszano w 5 dm³ wody destylowanej i wirowano do zaniku barwy. Przemity materiał zawieszano ponownie w 5 dm³ wody destylowanej i autoklawowano (121°C, 20 min). Zawiesinę pozostawiano na noc, a następnie odwirowywano i powtarzano płukanie wodą destylowaną. Przemity materiał zawieszano w 5 dm³ 0,1 M borowodorku sodu i pozostawiano na 3 godz., okresowo mieszając. Do zawiesiny dodawano NaOH (bez regulacji pH), w celu uzyskania roztworu 1 M, a następnie poddawano ją 3-godzinnemu gotowaniu we wrzącej łaźni wodnej. Do odwirowanego ekstraktu, przy silnym mieszaniu, dodawano 2 objętości metanolu i całość pozostawiano na 3-4 godz. w temperaturze pokojowej. Wytworzony precypitat zbierano przez wirowanie i przemitywano mieszaniną metanol:woda (3:1, v/v) do zaniku barwy. Przemity osad rozpuszczano w 5 dm³ 1 M NaOH, całość odwirowywano i supernatant traktowano dwoma objętościami metanolu. Otrzymany biały precypitat przemitywano dwukrotnie mieszaniną metanol:woda (3:1, v/v), a następnie w celu neutralizacji zawieszano w mieszaninie metanol:0,1 M kwas octowy (3:1, v/v) i pozostawiano na kilka godzin okresowo mieszając. Po tym czasie precypitat płukano mieszaniną metanol:woda (3:1, v/v), a następnie odwirowywano i płukano samą wodą destylowaną. W dalszej kolejności precypitat zawieszano w gorącej wodzie i gotowano go we wrzącej łaźni wodnej przez 20 min. Po tym czasie był on odwirowywany, a czynność gotowania i wirowania była powtarzana dwukrotnie. Otrzymany osad glukanu przemitywano dwukrotnie etanolem i eterem. Po odwirowaniu uzyskany preparat zamrażano i suszono w liofilizatorze.

2.2.5. Metoda V wg Grüna (1)

Zliofilizowane i zmielone owocniki żółciaka siarkowego zawieszano w roztworze zawierającym 100 mM EDTA i 50 mM Tris o pH 7,6. Po 2 min mieszania, dodawano 2% (w/v) SDS i 40 mM 2-merkapttoetanolu i całość gotowano przez 15 min w celu ekstrakcji zanieczyszczeń cytozolowych. Zawiesinę odwirowywano i po przemyciu wodą destylowaną cały proces powtarzano jeszcze raz. Otrzymany po odwirowaniu materiał zawieszano w lodowatym 2 mM NaBH₄ i 2 M KOH i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego (200 obr/min) przez 30 min w temp. 4°C. Do odwirowanego supernatantu dodawano kwas octowy, doprowadzając pH do wartości 6,0.

Całość mieszano przez 24 godz. w temp. 4°C. Wytrącony precypitat odwirowywano i zawieszano w 50 mM buforze McIlvaine'a (pH 5,3) z dodatkiem 5 mM azydku sodu (NaN₃), 40 mM 2-merkptoetanolu oraz 17,3 mg preparatu enzymatycznego Lyticase (200 U/mg) w celu usunięcia β -(1 \rightarrow 3)-glukanów. Po całonocnym mieszanii (200 obr/min) w temp. 37°C, nierozpuszczalną w wodzie frakcję zbierano przez wirownie i przemywano ją dwukrotnie wodą destylowaną. Następnie proces ekstrakcji alkalicznej i hydrolizy enzymatycznej powtarzano jeszcze raz. Na koniec materiał ponownie ekstrahowano SDS i 2-merkptoetanolom i przemywano 5 mM NaN₃. Otrzymany α -glukan zamrażano i suszono w liofilizatorze.

2.3. Analizy strukturalne

Próbki glukanów poddawano analizie spektralnej w podczerwieni, wykorzystując spektrofotometr FT-IR (Model 1725X, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) w zakresie długości fali od 4000 do 400 cm⁻¹. Próba właściwa zawierała 3 mg liofilizowanego glukanu w 20 mm krążku KBr. Odczytu dokonywano wobec krążka KBr nie zawierającego polisacharydu.

Wodorowe (¹H) widma NMR dla glukanów badano z użyciem spektrometru NMR Avance (300 MHz) (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten/Karlsruhe, Niemcy) w temp. 60°C. Odpowiednie wartości przesunięć chemicznych otrzymywano używając acetonu (δ_H – 2,225 ppm) jako wzorca wewnętrznego. Glukany używane do analizy zawieszano w 30% NaOD. Procentowy udział wiązań glukozydowych w poszczególnych biopolimerach obliczano na podstawie wielkości pola powierzchni poszczególnych sygnałów zamieszczonych na wykresie NMR.

Rodzaj i ilość monosacharydów wchodzących w skład nierozpuszczalnych w wodzie polisacharydów określano po ich kwaśnej hydrolizie (2 M kwas trifluoroctowy, 100°C, 4 godziny) i przekształceniu uwolnionych cukrów w octany alditoli. Jako czynnika redukującego używano borodeuterku sodu. Octany alditoli analizowano przy użyciu chromatografu gazowego (Model HP-5890 seria II, Hewlett Packard, Waldbronn, Niemcy) zaopatrzonego w kolumnę kapilarną (HP-5; 0,25 mm \times 30 m) i połączonego z detektorem masowym (HP-5971).

Pomiar skręcalności optycznej ($[\alpha]_D^{25}$) α -(1 \rightarrow 3)-glukanów (rozpuszczonych w 1 M NaOH) wykonano w polarymetrze firmy Perkin Elmer (Model 341 LC) przy długości światła 589 nm.

Pomiar lepkości α -(1 \rightarrow 3)-glukanów (rozpuszczonych w 1 M NaOH) wykonano przy użyciu wiskozymetru firmy Brookfield (Model DV 3).

2.4. Badanie indukcji bakteryjnej i grzybowej mutanazy

Szczep *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1, pochodzący z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w Lublinie, stanowił źródło bakteryjnej mutanazy (16).

Wysterylizowane podłoże hodowlane wg Kanzawy (17) z dodatkiem 0,25% α -(1 \rightarrow 3)-glukanów wyizolowanych z owocników *L. sulphureus* różnymi metodami (I-V) rozlewano do kolb stożkowych (500 cm³) w ilości 75 cm³, a następnie podłoże szczepiono zawiesiną bakterii *P. curdlanolyticus* w ilości 5% (v/v). Hodowle wgłębne prowadzono w temp. 30°C na wytrząsarce rotacyjnej przy 170 obr/min. Po czterech dniach hodowle odwirowywano (12 000 obr/min, 15 min) i w płynach pohodowlanych oznaczano aktywność mutanazy.

Szczep *Trichoderma harzianum* CCM F-340, pochodzący z Czeskiej Kolekcji Mikroorganizmów (CCM, Brno), wykorzystano jako kulturę podstawową dla syntezy grzybowej mutanazy (18).

Wyjałowione podłoże hodowlane A (100 cm³) wg Mandels i wsp. (19) zmodyfikowane wg Wiater i wsp. (10) z dodatkiem 0,4% preparatów α -(1 \rightarrow 3)-glukanów wyizolowanych z owocników *L. sulphureus* pięcioma różnymi metodami, szczepiono zawiesiną konidiów *T. harzianum* F-340 w ilości 1 cm³. Hodowle prowadzono w kolbach stożkowych (500 cm³) w temp. 30°C na wytrząsarce rotacyjnej (220 obr/min) w ciągu 3 dni. Następnie hodowle odwirowywano (12 000 obr/min, 15 min) i w płynach pohodowlanych oznaczano aktywność mutanazy.

2.5. Metody analityczne

Aktywność mutanaz oznaczano zmodyfikowaną metodą Hasegawa i wsp. (15) określając ilość cukrów redukujących uwalnianych przez enzym z paciorkowcowego mutanu. Mieszanina reagująca zawierała 1 mg glukanu (79,8 mol% wiązań α -(1 \rightarrow 3); 20,2 mol% wiązań α -(1 \rightarrow 6)-glukozydowych) zawieszono w 0,5 cm³ 0,2 M buforu octanowego o pH 5,5 (mutanaza *T. harzianum*) lub 0,05 M buforu potasowo-fosforanowego o pH 6,6 (mutanaza *P. curdlanolyticus*) oraz 0,5 cm³ odpowiednio rozcieńczonego enzymu. Reakcję enzymatyczną prowadzono w temp. 45°C w czasie 60 min. Ilość powstałych cukrów redukujących oznaczano metodą Somogyi-Nelsona (20,21). Za jednostkę aktywności mutanazy przyjęto ilość enzymu, która w czasie 1 min w warunkach oznaczenia uwalniała cukry redukujące równoważne 1 mikromolowi (μ M) glukozy.

Zawartość białka w końcowej frakcji (Kf) otrzymanej przy izolacji α -(1 \rightarrow 3)-glukanów oznaczano metodą Schacterle i Pollacka (22).

Stopień scukrzenia α -(1 \rightarrow 3)-glukanów przy udziale mutanazy obliczano na podstawie ilości cukrów redukujących powstałych podczas 24-godzinnej hydrolizy z użyciem egzomutanazy *T. harzianum* F-340 w stężeniu 0,1 U/cm³. Cukry redukujące oznaczono kolorymetryczną metodą Somogyi-Nelsona (20,21). Procentową wartość scukrzenia obliczano na podstawie wzoru:

$$\% \text{ scukrzenia} = a \cdot 0,9 \cdot 100 / C_{\alpha\text{-glukanu}}$$

gdzie: a – stężenie cukrów redukujących w hydrolizacie (mg/cm^3); $0,9$ – współczynnik wynikający z poprawki na uwodnienie polisacharydu; 100 – przelicznik na %; $C_{\alpha\text{-glukanu}}$ – stężenie α -glukanu (mg/cm^3).

3. Wyniki i dyskusja

Wysoka zawartość α -(1→3)-glukanów w ścianie komórkowej żółciaka siarkowego (5), powszechne występowanie tego grzyba w przyrodzie oraz uznanie go za stosunkowo bezpiecznego dla człowieka (młode owocniki są jadalne), sprawiły, że organizm ten stał się obiektem naszego zainteresowania jako potencjalne źródło efektywnego i alternatywnego w stosunku do mutanu induktora mutanaz. W literaturze, jak dotąd, nie ma doniesień na ten temat i dlatego przeprowadzone w tym kierunku badania mają charakter pionierski.

Ze względu na dużą różnorodność składników chemicznych wchodzących w skład owocnika *L. sulphureus*, pierwsza część doświadczeń miała na celu dokonanie porównania poszczególnych metod stosowanych do izolacji α -(1→3)-glukanów ze ścian komórkowych grzyba, oraz udowodnienie, że końcowa frakcja (Kf) otrzymana za pomocą użytych metod separacji jest α -(1→3)-glukanem. Wyniki zebrane z tych serii doświadczeń przedstawiono w tabeli i na rysunkach 2-4.

Tabela

Charakterystyka α -(1→3)-glukanów ściany komórkowej *Laetiporus sulphureus* izolowanych różnymi metodami

| Cecha różniąca | Metoda izolacji | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | IV | V |
| Kf w suchej masie grzybni (%) ^a | 56,54 | 56,3 | 56,9 | 53,3 | 32,1 |
| rodzaj i ilość monocukrów w Kf (mol%) ^b | Glc – 97,50 Man – 2,50 Ara – ślad | Glc – 95,97 Man – 3,19 Ara – 0,84 | Glc – 97,17 Man – 2,83 Ara – ślad | Glc – 97,40 Man – 2,60 Ara – ślad | Glc – 97,94 Man – 2,06 Ara – ślad |
| ilość białka w Kf ($\mu\text{g}/\text{mg}$) | 4,33 | 4,81 | 2,40 | 0,00 | 0,00 |
| obecność wiązań α -(1→3)-glukozydowych w Kf (cm^{-1}) ^c | 822,58 845,05 | 823,51 849,08 | 823,48 848,66 | 821,84 846,80 | 824,00 847,91 |
| liczba wiązań α -(1→3)-glukozydowych w Kf (mol%) ^d | 91,15 | 91,49 | 94,42 | 85,85 | 94,33 |
| skręcalność optyczna ($[\alpha]_D^{+}$) | 216 | 223 | 246 | 282 | 306 |
| lepkość (mPa·s) | 2,53 | 2,12 | 3,55 | 2,85 | 1,98 |
| stopień scukrzenia polimeru (%) ^e | 68,6 | 51,7 | 67,8 | 67,2 | 66,0 |

^a (Kf) – Kończowa frakcja otrzymana podczas izolacji α -(1→3)-glukanów; ^b Kwaśna hydroliza i analiza chromatograficzna (chromatografia gazowa – GC); ^c Oznaczana metodą FT-IR; ^d Oznaczana metodą ¹H NMR; ^e – Oznaczany metodą enzymatyczną (24-godzinna hydroliza z użyciem egzomutanazy *T. barzianum* w stężeniu $0,1 \text{ U}/\text{cm}^3$).

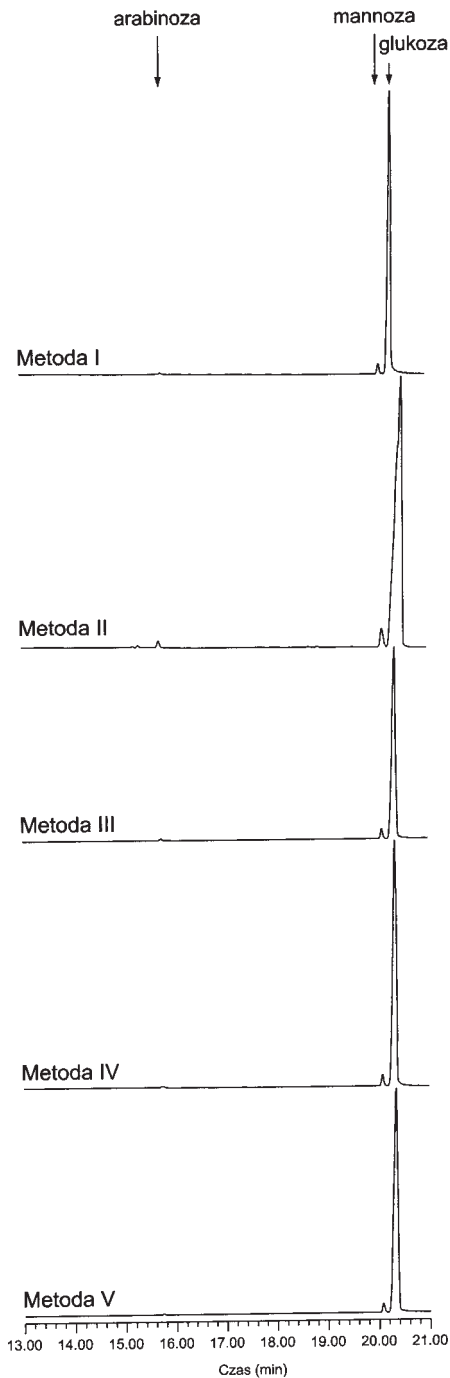
Różnice pomiędzy poszczególnymi metodami zaznaczają się przede wszystkim w ich pracochłonności, wieloetapowości oraz toksyczności odczynników stosowanych do izolacji i oczyszczania α -(1 \rightarrow 3)-glukanów. Metoda I opisana przez Mizuno i wsp. (13) i II stosowana w pracy Wiater i wsp. (10) wymagają użycia niewielu odczynników, z kolei metoda III opracowana przez Kiho i wsp. (14) i dużo starsza IV wg Hasegawa i wsp. (15) są bardziej czasochłonne i związane ze stosowaniem większej liczby odczynników, często toksycznych, jak np. bromowodorek sodu i eter. W metodzie V, w celu całkowitego usunięcia β -(1 \rightarrow 3)-glukanów, badaną frakcję poddano dodatkowo działaniu preparatu enzymatycznego Lyticase (Sigma-Aldrich). Nie poprawiło to jednak w zasadniczy sposób wydajności α -(1 \rightarrow 3)-glukanów izolowanych zgodnie z metodą zaproponowaną przez Grüna (1). Cztery z pięciu testowanych metod dawały dużą i zarazem podobną ilość (średnio około 56%) końcowej frakcji (Kf) α -(1 \rightarrow 3)-glukanów (tab.). Jedynie w metodzie V, w której zastosowano preparat Lyticase, otrzymano dużo mniejszą wydajność tego biopolimeru (32%). Należy podkreślić, że uzyskana przy użyciu różnych metod izolacji wydajność α -(1 \rightarrow 3)-glukanów (32-56 g/100 g suchej masy grzyba) jest 145-255 razy wyższa od tej, jaką udało się dotychczas uzyskać dla paciorkowcowego mutanu (0,22 g/100 cm³ podłoża) (23). Wyniki te dają podstawę do dalszych badań nad możliwością szerszego zastosowania grzybowych α -(1 \rightarrow 3)-glukanów jako efektywnych induktorów dla syntezy drobnoustrojowych mutanaz.

Końcowe frakcje α -(1 \rightarrow 3)-glukanów, otrzymane po wieloetapowych procesach izolacji, poddano następnie analizie strukturalnej i scharakteryzowano pod względem fizykochemicznym.

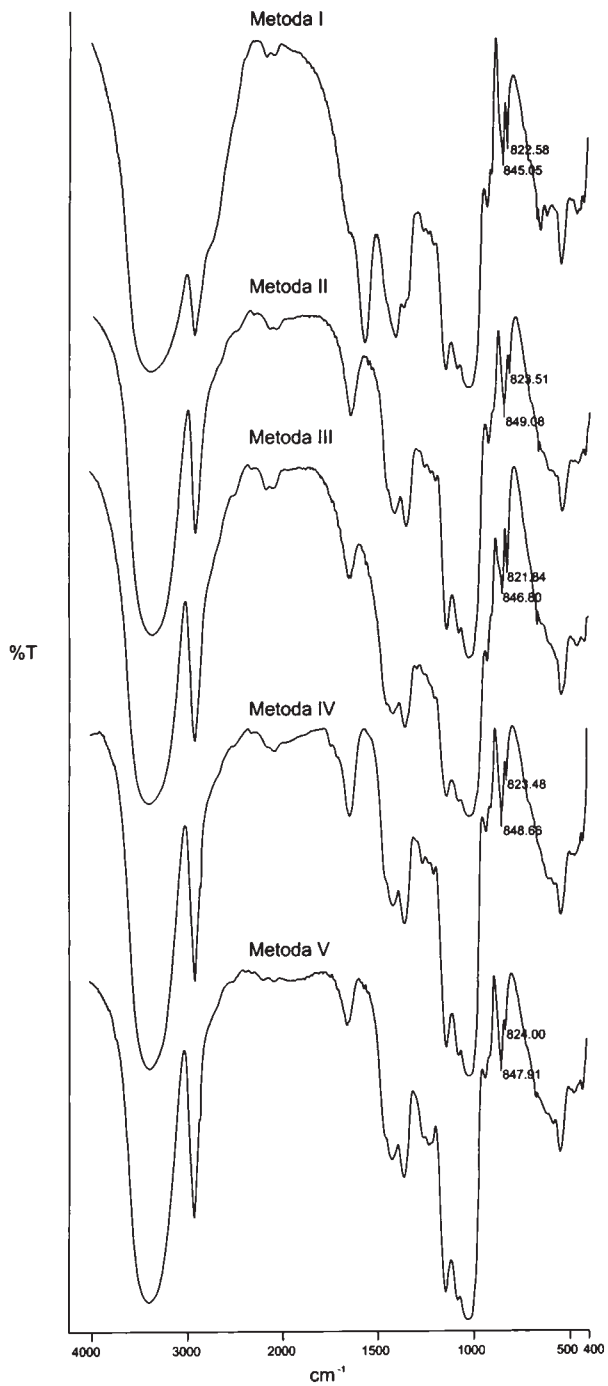
W pierwszym etapie za pomocą chromatografii gazowej zbadano rodzaj i ilość monosacharydów budujących te polimery. Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli i na rysunku 2 dowodzi się, że badane frakcje są homoglukanami zbudowanymi w około 97% z cząsteczek glukozy (Glc). Poza glukozą, w łańcuchach polisacharydów stwierdzono dodatkowo niewielkie lub śladowe ilości arabinozy (Ara) i mannozy (Man). Podobny rezultat uzyskał wcześniej Grün (1). Wykonał on analizę chromatograficzną, na podstawie której wykazał, że α -glukan z żółciaka siarkowego składa się w 96,2% z glukozy i zawiera niewielką domieszkę mannozy (2,3%) i ksylozy (1,5%).

Brak lub śladowa zawartość białka w Kf glukanów potwierdza, że badane preparaty są związkami jednorodnymi (tab.), co świadczy o poprawności procesów izolacji. Ponadto, brak zanieczyszczeń, które mogłyby hamować aktywność mutanaz (badanych w dalszej części doświadczeń) kwalifikuje wyizolowane α -(1 \rightarrow 3)-glukany jako potencjalne induktory tych enzymów.

W dalszej kolejności homoglukany uzyskane różnymi metodami poddano analizie spektralnej wykonanej w podczerwieni (IR). Widma przedstawione na rysunku 3 posiadają dwa charakterystyczne maksima, przy długości fal 845-849 cm⁻¹ i 821-824 cm⁻¹ (tab., rys. 3). Pierwsze z nich jest charakterystyczne dla wiązań α -glukozydowych, drugie zaś sugeruje, że testowane polimery posiadają wiązania glukozydowe



Rys. 2. Analiza chromatograficzna monosacharydów zawartych w hydrolizatach α -(1→3)-glukanów izolowanych różnymi metodami ze ściany komórkowej *L. sulphureus*.



Rys. 3. Widma IR α -(1 \rightarrow 3)-glukanów izolowanych różnymi metodami ze ściany komórkowej *L. sulphureus*.

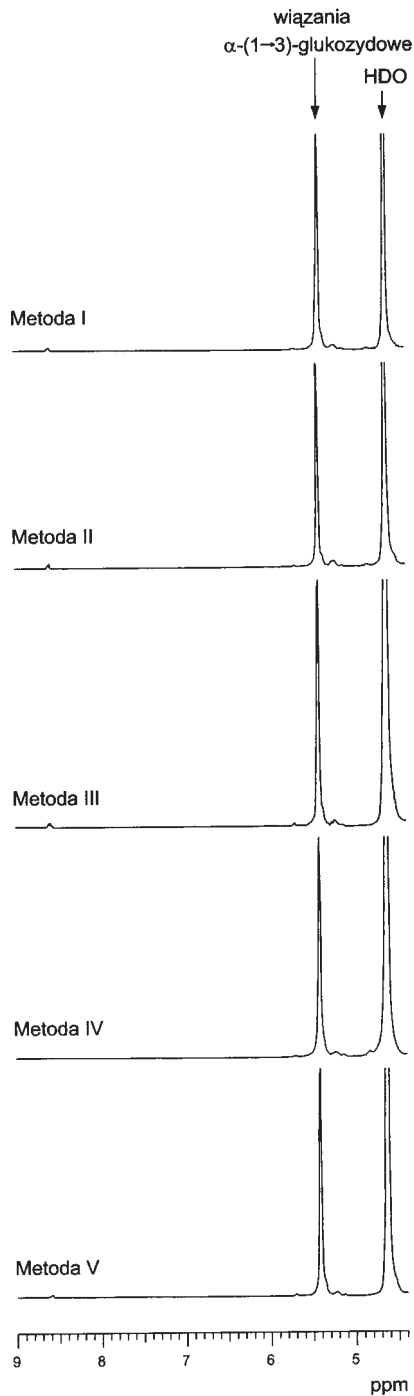
typu α -(1→3). Podobny obraz widma uzyskali Jelsma i Kreger (5). Badana przez autorów, nierozpuszczalna w wodzie, a rozpuszczalna w alkaliach frakcja wyizolowana ze ściany komórkowej *Piptoporus betulinus*, *Schizophyllum commune* i *Laetiporus sulphureus* wykazywała dwa wyraźne szczyty przy długości fal 844 cm^{-1} i 823 cm^{-1} .

Analizując glukany przy użyciu wodorowego magnetycznego rezonansu jądrowego ($^1\text{H NMR}$), uzyskano we wszystkich przypadkach widma z pojedynczym singletem o wartości 5,426-5,441 ppm (rys. 4). Świadczy to o obecności w badanych biopolimerach cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem α -(1→3)-glukozydowym oraz ich liniowym charakterze. Na podstawie wielkości pola powierzchni otrzymanego sygnału wyliczono ilość wiązań α -(1→3)-glukozydowych (86-94 mol%) w cząsteczkach analizowanych glukanów (tab.). Na podstawie tych danych potwierdza się fakt, że badane próbki są homoglukanami, w których dominuje jeden typ wiązań. Podobne wartości przesunięć chemicznych (δ) protonów anomerycznych otrzymał Grün (1) badając α -glukany ściany komórkowej *L. sulphureus*, *P. betulinus*, *S. commune*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* i *Cryptococcus neoformans*.

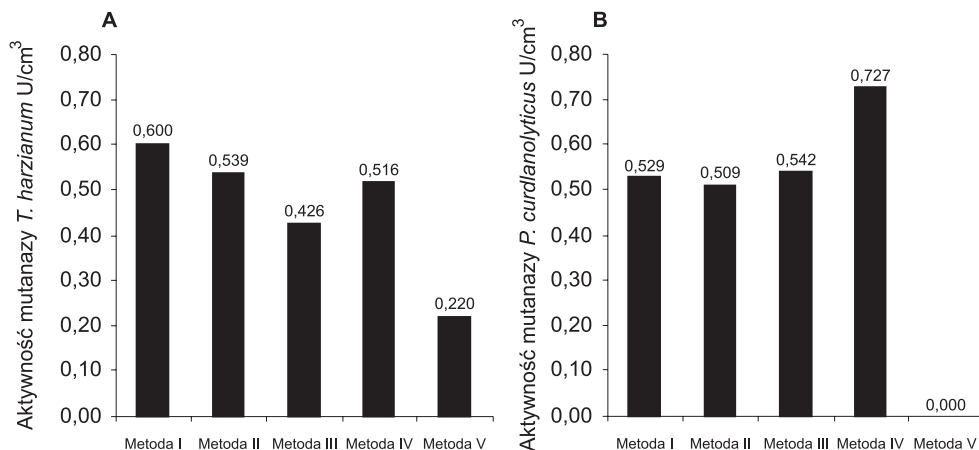
W przeprowadzonej serii doświadczeń dokonano również oznaczeń lepkości i skręcalności optycznej ($[\alpha_D^{25}]$) wyizolowanych różnymi sposobami α -(1→3)-glukanów. Na podstawie uzyskanych wyników dowodzi się, że testowane glukany skręcają w prawo płaszczyznę światła spolaryzowanego, a otrzymane wartości mieściły się w przedziale od $+216^\circ$ do $+300^\circ$. Johnson (24), izolując α -(1→3)-glukan z *Aspergillus niger* NRRL 326, określił jego skręcalność optyczną na poziomie $+233^\circ$ (1M NaOH), natomiast Hasegawa i wsp. (15) dla glukanu z tego samego gatunku grzyba otrzymali skręcalność o wartości $+257^\circ$. Z kolei pseudonigeran wyizolowany przez Horisbergera i wsp. (25), posiadał skręcalność optyczną równą $+248,5^\circ$. Jedyne α -(1→3)-glukan z owocników *Amanita muscaria* charakteryzował się dużo niższą wartością skręcalności $+160^\circ$ (0,4 M NaOH) (14).

Lepkość wyizolowanych α -glukanów wahała się w granicach 2-3,6 mPa·s i dla przykładu była 1,3-2,4 razy mniejsza od wartości (4,8 mPa·s) uzyskanej dla natywnego mutanu (α -(1→3)-, α -(1→6)-glukanu) zsyntetyzowanego przez próchnicotwórczy szczep *Streptococcus sobrinus/downei* CCUG 21020. Wiąże się to z zawartością w nim znacznej ilości wiązań α -(1→6)-glukozydowych (40,9%), które są odpowiedzialne za zwiększoną lepkość tego biopolimeru (wyniki nie publikowane).

Przeprowadzono także hydrolizę enzymatyczną testowanych biopolimerów w celu określenia ich podatności na działanie α -(1→3)-glukanazy. W wyniku 24-godzinnej hydrolizy przy użyciu grzybowej egzomutanazy otrzymano średnią wartość scukrzenia badanych α -(1→3)-glukanów na poziomie 64% (tab.). Na podstawie tych rezultatów sugeruje się po pierwsze, że nie wszystkie wiązania α -(1→3)-glukozydowe tych biopolimerów są podczas hydrolizy dostępne dla enzymu, tym bardziej że cząsteczki α -(1→3)-glukanu mogą występować w formie mono- lub (mniej podatnej na hydrolizę) dimerycznej. Po drugie, cząsteczki glukozy w nierozpuszczalnym w wodzie α -glukanie z żółciaka siarkowego mogą być w niewielkim procencie połączone także wiązaniem (1→4)-glukozydowym (1).



Rys. 4. Widma ¹H NMR α-(1→3)-glukanów izolowanych różnymi metodami ze ściany komórkowej *L. sulphureus*.



Rys. 5. Aktywność mutanaz *T. harzianum* (A) i *P. curdianolyticus* (B) w podłożach hodowlanych z dodatkiem α -(1→3)-glukanów wyizolowanych różnymi metodami (I-V) ze zliofilizowanych owocników *L. sulphureus*.

Podsumowując dotychczasowe wyniki można jednoznacznie stwierdzić, że frakcje końcowe glukanów wyekstrahowane z owocników *L. sulphureus* różnymi metodami są α -(1→3)-glukanami.

W dalszej kolejności zbadano wpływ wyizolowanych α -(1→3)-glukanów na aktywność mutanazy *T. harzianum* i *P. curdianolyticus* wytwarzanej w hodowlach wytrząsanych, w których polimery te stanowiły induktor dla syntezy tych enzymów. Najwyższą aktywność katalityczną grzybowej mutanazy (0,6 U/cm³), otrzymano po zastosowaniu jako induktora α -(1→3)-glukanu wyizolowanego z owocników żółciaka siarkowego metodą I (13) (rys. 5 A). Uzyskana aktywność mutanolityczna *T. harzianum* była 1,5-razy wyższa od tej, jaką otrzymano wykorzystując mutan w charakterze stymulatora enzymu (10).

W literaturze niewiele jest danych na temat zastosowania do indukcji grzybowej mutanazy biomasy, pochodzącej z różnych gatunków grzybów strzępkowych i podstawczaków. Reese i wsp. (26) wykazali zwiększoną produkcję enzymu indukowanego α -(1→3)-glukanami zawartymi w grzybni grzybów z rodzajów *Trichoderma*, *Dactylium*, *Sepedonium* i *Verticillum*. Badacze ci stymulowali u ponad dwustu mikroorganizmów syntezę zewnątrzkomórkowych α -(1→3)-glukanaz za pomocą owocników *P. betulinus*. Z kolei Ait-Lahsen i wsp. (27) użyli grzybnię *A. niger* jako induktora mutanazy u *T. harzianum*, zaś Sanz i wsp. (28) przeprowadzili aktywację syntezy mutanazy *T. asperellum* grzybnią *Botrytis cinerea*. Należy jednak zaznaczyć, że porównywanie aktywności mutanaz pochodzących nawet z tego samego źródła, może być obarczone dużym ryzykiem błędu. Związane jest to głównie z wykorzystaniem do oznaczenia aktywności enzymu i jego indukcji różnych substratów.

Najwyższą aktywność bakteryjnej mutanazy (0,727 U/cm³) odnotowano po 4-dniowej hodowli wytrząsanej szczepu *P. curdianolyticus* MP-1 na α -(1→3)-glukanie

wyzolowanym z owocników *L. sulphureus* metodą IV (15) (rys. 5 B). Dotychczas najlepsze wyniki indukcji syntezy mutanazy u *P. curdolanolyticus* osiągnęli Pleszczyńska i wsp. (16), którzy po drugim dniu hodowli bakterii na paciorkowcowym mutanie otrzymali aktywność enzymu na poziomie $0,37 \text{ U/cm}^3$. Należy wyraźnie podkreślić, że w naszych doświadczeniach aktywność mutanolityczna tej bakterii uzyskana w hodowli na α -(1→3)-glukanie wyizolowanym z *L. sulphureus* była prawie 2-krotnie większa. Z danych literaturowych wynika, że wysokie aktywności katalityczne bakteryjnych mutanaz osiągały również *Bacillus circulans* WL-12 ($0,31 \text{ U/cm}^3$; $1,9 \text{ U/mg}$ białka) po hodowli na pożywce mineralnej z dodatkiem 0,25% oczyszczonego α -(1→3)-glukanu z *A. niger* (29) oraz *Streptomyces chartreusis* w hodowli na mutanie ($0,03 \text{ U/cm}^3$; $0,15 \text{ U/mg}$ białka) (30).

Na podstawie analizy danych zamieszczonych na rysunku 5 wynika, że cztery spośród pięciu wyizolowanych α -(1→3)-glukanów zwiększały od 6,5 do 50% aktywność mutanazy *T. harzianum* oraz od 37 do 96% mutanazy *P. curdolanolyticus*, w stosunku do tej, jaką osiągnęły te organizmy w hodowli na podłożu z paciorkowcowym mutanem (10,16).

Warto również zaznaczyć, że na glukanie wyizolowanym z owocników żółciaka siarkowego metodą V (1), *P. curdolanolyticus* nie wytwarzał mutanazy, zaś aktywność enzymu produkowanego przez *T. harzianum* była od 2 do 3 razy niższa w porównaniu do tej, jaką osiągnęła mutanaza na glukanach izolowanych pozostałymi metodami. Z tych też względów metodę Grüna uznano jako mało przydatną dla izolacji α -(1→3)-glukanów – efektywnych w zakresie indukcji syntezy drobnoustrojowych mutanaz.

4. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano możliwość wykorzystania α -(1→3)-glukanów zawartych w owocnikach żółciaka siarkowego jako alternatywnego i zarazem dużo bardziej efektywnego w stosunku do mutanu, źródła induktorów dla bakteryjnych i grzybowych mutanaz. Łatwość, z jaką pozyskuje się owocniki tego grzyba w naturze oraz możliwość hodowli na większą skalę w warunkach laboratoryjnych, otwiera nową drogę do opracowania stosunkowo taniej, wydajnej i bezpiecznej technologii produkcji mutanaz na skalę przemysłową. Jej wdrożenie do praktyki przyczyni się niewątpliwie do szerszego wykorzystania tych enzymów w profilaktyce stomatologicznej do usuwania próchnicotwórczych biofilmów tworzonych na zębach i aparatach protetycznych.

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt rozwojowy nr 325/R/P01/2007/IT1.

Literatura

1. Grün C. H., (2003), *Structure and biosynthesis of fungal α -glucans*, Ed. Grün C. H., Utrecht University, the Netherlands.
2. Bobbit T. F., Nordin J. H., Roux M., Revol J. F., Marchessault R. H., (1977), *J. Bacteriol.*, 132, 691-703.
3. Kanetsuna F., Carbonell L. M., Gil F., Azuma I., (1974), *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 54, 1-13.
4. Duff R. B., (1952), *J. Chem. Soc.*, 3, 2593-2594.
5. Jelsma J., Kreger D. R., (1978), *Arch. Microbiol.*, 119, 249-255.
6. Jelsma J., Kreger D. R., (1979), *Carbohydr. Res.*, 71, 51-64.
7. Kopecká M., Fleet G. H., Phaff H. J., (1995), *J. Struct. Biol.*, 114, 140-152.
8. Hogan L. H., Klein B. S., (1994), *Infect. Immun.*, 62, 3543-3546.
9. Zonneveld B. J. M., (1973), *Dev. Biol.*, 34, 1-8.
10. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., (2008), *J. Microbiol. Biotechnol.*, (w druku).
11. Wiater A., Pleszczyńska M., Szczodrak J., Bachanek T., (2005), *Dent. Med. Probl.*, 42, 241-247.
12. Wiater A., Choma A., Szczodrak J., (1999), *J. Basic Microbiol.*, 39, 265-273.
13. Mizuno K., Avazu N., Tachiki T., (1998), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 39-43.
14. Kiho T., Yoshida I., Katsuragawa M., Sakushima M., Usui S., Ukai S., (1994), *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1460-1462.
15. Hasegawa S., Nordin J. H., Kirkwood S., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 5460-5470.
16. Pleszczyńska M., Marek-Kozaczuk M., Wiater A., Szczodrak J., (2007), *Biotechnol. Lett.*, 29, 755-759.
17. Kanzawa Y., Kurosawa T., Kanegae Y., Harada A., Harada T., (1994), *Microbiology*, 140, 637-642.
18. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., Próchniak K., (2005), *Braz. J. Microbiol.*, 36, 137-146.
19. Mandels M., Parrish F. W., Reese E. T., (1962), *J. Bacteriol.*, 83, 400-408.
20. Somogyi M., (1945), *J. Biol. Chem.*, 160, 61-68.
21. Nelson N., (1944), *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
22. Schacterle G. R., Pollack R. L., (1973), *Anal. Biochem.*, 51, 654-655.
23. Wiater A., Szczodrak J., Pleszczyńska M., (2005), *Acta Biol. Hung.*, 56, 137-150.
24. Johnston I. R., (1965), *Biochem. J.*, 96, 651-664.
25. Horisberger M., Lewis B. A., Smith F., (1972), *Carbohydr. Res.*, 23, 183-188.
26. Reese E. T., Maguire A., Parrish F. W., (1972), *Ferment. Technol. Today*, 735-742.
27. Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., de la Cruz J., Monte E., Llobell A., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5833-5839.
28. Sanz L., Montero M., Redondo J., Llobell A., Monte E., (2004), *FEBS Journal*, 272, 1-7.
29. Meyer M. T., Phaff H. J., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, 118, 197-208.
30. Takehara T., Inoue M., Morioka T., Yokogawa K., (1981), *J. Bacteriol.*, 145, 729-735.