

dr Adrian Wiater

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko

Adrian Wiater

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Tytuł magistra – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, kierunek biologia, specjalność biochemia, 1996

Tytuł pracy: „Izolacja ludzkiej antytrombiny III”

Stopień doktora – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dziedzina: nauki biologiczne, dyscyplina: biologia, 2002

Tytuł rozprawy: „Biosynteza, struktura chemiczna i hydroliza enzymatyczna mutanu - biopolimeru płytki nazębnej”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (w 2011 roku przekształcony w Wydział Biologii i Biotechnologii)

10.1996 – 09.1997 asystent-stażysta w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej

10.1997 – 09.2002 asystent w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej

10.2002 – obecnie adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej

a) Studia i praca magisterska

Studia biologiczne rozpocząłem w 1991 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W trakcie studiów, w ramach Koła Naukowego Biochemików UMCS brałem udział w badaniach dotyczących ko-metabolicznego oddziaływania gwajakolu w hodowlach wglębnych grzybów z rodzaju *Pleurotus*. Zaobserwowano wówczas, że związek ten indukuje powstawanie nowych metabolitów, pochodnych amigdaliny. Wyniki tych badań były prezentowane na XXX. Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:

- Malarczyk, E., Gibuła, K., Ryński, J., **Wiater, A.**, Wilkołazka, J., Kochmańska-Rdest, J., 1994: Biosynteza nowych metabolitów wtórnych przez grzyby z rodzaju *Pleurotus*. XXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin, Materiały Naukowe Zjazdu, P-219.

W 1996 roku uzyskałem tytuł magistra biologii po obronie pracy magisterskiej pod tytułem „Izolacja ludzkiej antytrombiny III”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Rogalskiego. Praca miała na celu opracowanie szybkiej metody analitycznej, pozwalającej na ilościowe oznaczanie antytrombiny III w surowicy krwi ludzkiej. Opracowana metoda opierała się na wykorzystaniu chromatografii powinowactwa i użyciu nowatorskiego nośnika heparyno-CPG (CPG, szkło o kontrolowanej porowatości). Otrzymany w wyniku rozdziałów, preparat antytrombiny III, zbadano pod kątem czystości przy użyciu metod koagulometrycznej, immunodyfuzji oraz immunoelektroforezy. Ponadto, oceniono opłacalność procesu w oparciu o nośnik heparyno-CPG. Stwierdzono wówczas, że zastosowana metoda jest wysoce opłacalna i daje duże szanse na zastosowanie w analizie klinicznej. W ramach pracy magisterskiej, określiłem również wpływ grup sulfonowych na zdolność separowania antytrombiny III przez heparynę. W tym celu przeprowadzono syntezę nośnika, gdzie heparynę zastąpiono wolnymi grupami sulfonowymi uzyskanymi w wyniku sulfonowania dekstranu, którym opłaszczono CPG. Doświadczenia z użyciem nowego nośnika, wykazały dużą zależność między ilością grup sulfonowych obecnych na nośniku, a ilością izolowanej antytrombiny III. Jednak w porównaniu z nośnikiem kontrolnym (heparyno-CPG), ilość separowanego na takim złożu białka była niewielka. Wyniki badań stanowiących przedmiot mojej pracy magisterskiej były prezentowane na ogólnopolskim seminarium chromatograficznym oraz zostały częściowo opublikowane:

- Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., **Wiater, A.**, Gibuła, K., Winiarczyk, S., 1998: The preparation of specific sorbents with polyclonal antibodies as a ligand for purification of human antithrombin III. *Acta Microbiologica Polonica*. 47, 153-165.
- Dawidowicz, A.L., **Wiater, A.**, Rogalski, J., Winiarczyk, S., Radkiewicz, S., 1996: Izolacja ludzkiej antytrombiny III. VII Ogólnopolskie Seminarium Chromatograficzne Nauka-Przemysł na temat: Nowoczesne techniki w analizie chromatograficznej i przygotowaniu próbek, Lublin, Materiały Naukowe Zjazdu, P-5.

b) Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Po uzyskaniu tytułu magistra rozpocząłem pracę w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w zespole prof. dr hab. Janusz Szczodraka, początkowo na stanowisku asystenta-stażysty (1.10.1996 r.), a następnie od 1.10.1997 r. na stanowisku asystenta. Brałem udział w badaniach nad określeniem optymalnych warunków dla przebiegu fermentacji alkoholowej, prowadzonej przez unieruchomione w żelu agaru porowatego komórki *Candida pseudotropicalis* oraz ich wykorzystaniem w procesie okresowej (półciągłej) fermentacji podłoży zawierających laktozę. Uczestniczyłem również w pracach dotyczących doboru skutecznych metod zagęszczania i wytrącania laktazy z płynów pochodzących z *Penicillium notatum*, oraz izolacji, oczyszczania i immobilizacji dekstranazy pochodzącej z komercyjnego preparatu DN 50L (Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark). Rezultaty w/w badań opublikowano w czasopiśmie o zasięgu krajowym i międzynarodowym:

- Szczodrak, J., Szczodrak, Z., **Wiater, A.**, 1997: Wytwarzanie etanolu z laktozy przez komórki drożdży unieruchomione w kulkach agaru porowatego. *Biotechnologia*. 39, 82-93.
- Rogalski, J., Szczodrak, J., Głowiak, G., Pleszczyńska, M., Szczodrak, Z., **Wiater, A.**, 1998: Purification and immobilisation of dextranase. *Acta Biotechnologica*. 18, 63-75.
- Szczodrak, J., **Wiater, A.**, 1998: Selection of method for obtaining an active lactase preparation from *Penicillium notatum*. *Journal of Basic Microbiology*. 38, 79-83.

Pracę doktorską wykonywałem pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Janusza Szczodraka. Przeprowadzone badania obejmowały dobór optymalnych parametrów dla wydajnej biosyntezy nierozpuszczalnego w wodzie paciorkowcowego α -glukanu (mutanu), poznanie struktury chemicznej tego polimeru, a także selekcję aktywnego producenta grzybowej α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (mutanazy), otrzymanie preparatu enzymatycznego, jego oczyszczenie oraz zbadanie możliwości wykorzystania uzyskanego enzymu do hydrolizy enzymatycznej natywnego mutanu oraz syntetyzowanego *in vitro* biofilmu.

W pierwszym etapie doświadczeń wybrano próchnicotwórczy szczep *Streptococcus mutans* 20381 oraz podłoże z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI) do wydajnej syntezy nierozpuszczalnego w wodzie wielocukru i po przeprowadzeniu analizy strukturalnej tego biopolimeru ustalono, że jest on α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-D-glukanem z przewagą wiązań typu α -(1 \rightarrow 3), czyli jest mutanem. Zsyntetyzowany mutan posiadał, jak wykazano w doświadczeniach prowadzonych *in vitro*, właściwości silnego przylegania (adherencji) do twardych powierzchni (szkiełka podstawowe, proteza zębowa). Następnie w wyniku skringingu, przeprowadzonego wśród 19 kultur grzybów strzępkowych należących do 3 rodzajów, wyselekcjonowano szczep *Trichoderma harzianum* CCM F-470, który najefektywniej wytwarzał mutanazę i nie posiadał aktywności dekstranazowej. W celu zwiększenia wyjściowej aktywności mutanolitycznej wybranego szczepu zoptymalizowano warunki jego hodowli. Wykazano, że utrzymywanie pH na stałym poziomie 6,0 oraz mieszanie środowiska z szybkością 450 obr/min pozwala na skrócenie czasu hodowli fermentorowej *T. harzianum* do 48 godzin oraz powoduje w tym samym czasie wzrost aktywności enzymatycznej o 53% w porównaniu do hodowli prowadzonej przy nieregulowanym odczynie środowiska.

Kolejne badania zmierzały w kierunku otrzymania aktywnego preparatu mutanolitycznego i zbadania wpływu pH, temperatury oraz jonów metali na jego aktywność i stabilność, a także określenia specyficzności substratowej mutanazy. Do oczyszczania otrzymanego preparatu mutanazy wykorzystano techniki chromatografii jonowymiennej, oddziaływania hydrofobowego i chromatogniskowania. W wyniku rozdzieleń chromatograficznych otrzymano wysokooczyszczony (94-krotnie) i homogenny preparat enzymatyczny, który scharakteryzowano od strony fizykochemicznej poprzez wyznaczenie jego masy cząsteczkowej, punktu izoelektrycznego, zawartości węglowodanów w cząsteczce, stałych kinetycznych oraz aktywności przy różnych wartościach pH i temperatury. Preparat mutanazy *T. harzianum* CCM F-470 i/lub komercyjnej dekstranazy wykorzystano do hydrolizy enzymatycznej mutanu przebiegającej w ustalonych wcześniej warunkach optymalnych. Największy stopień scukrzenia mutanu (88%) uzyskano po zastosowaniu w układzie hydrolitycznym mieszaniny obu enzymów. Analiza produktów końcowych depolimeryzacji mutanu dała podstawę do poznania mechanizmu działania mutanazy *T. harzianum* i stwierdzenia, że badana α -(1 \rightarrow 3)-glukanaza należy do grupy enzymów egzogennych (egzolitycznych). Wykazano również, że obecność mutanazy i dekstranazy w środowisku reakcji ma poprzez rozkład mutanu istotny wpływ na proces osadzania się płytki nazębnej na twardych powierzchniach oraz na płytkę już wytworzoną.

Opisane badania były częściowo wykonywane w ramach projektu badawczego (Grant KBN 6 P04B 028 20) finansowanego w latach 2001-2002 przez Komitet Badań Naukowych, w którym uczestniczyłem w charakterze kierownika. Badania przeprowadzone w ramach

pracy doktorskiej były tematem 5 artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- **Wiater, A.**, Choma, A., Szczodrak, J., 1999: Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. *Journal of Basic Microbiology*. 39, 265-273.
- **Wiater, A.**, Szczodrak, J., 2001: Selection of method for obtaining an active mutanase preparation from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*. 23, 427-431.
- **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Rogalski, J., 2001: Purification and characterization of extracellular mutanase from *Trichoderma harzianum*, *Mycological Research*. 105, 1357-1363.
- **Wiater, A.**, Szczodrak, J., 2002: Selection of strain and optimization of mutanase production in submerged cultures of *Trichoderma harzianum*. *Acta Biologica Hungarica*, 53, 389-401.
- **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Rogalski, J., 2004: Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in streptococcal films by fungal α -D-glucanases. *Process Biochemistry*. 39, 1481-1489.

oraz 8 doniesień konferencyjnych. Obrona dysertacji doktorskiej pt. „Biosynteza, struktura chemiczna i hydroliza enzymatyczna mutanu - biopolimeru płytki nazębnej” na podstawie, której uzyskałem stopień naukowy doktora nauk biologicznych odbyła się 5 czerwca 2002 roku. Rozprawa doktorska została wyróżniona w 2003 roku nagrodą Ministra Edukacji Narodowej i Sportu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl szesnastu publikacji pod wspólnym tytułem:

Poznawcze i aplikacyjne badania nad grzybową mutanazą, istotne dla intensyfikacji jej wytwarzania i wykorzystania w praktyce stomatologicznej

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego to 14 oryginalnych prac eksperymentalnych i 2 prace przeglądowe:

1. **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., 2005: Optimization of conditions for the efficient production of mutan in streptococcal cultures and post-culture liquids. *Acta Biologica Hungarica*. 56, 137-150.
2. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., Bachanek, T., 2005: Usuwanie płytki protez przez wybrane enzymy glukanolityczne. *Dental and Medical Problems*. 42, 241-247.
3. **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., Próchniak, K., 2005: Production and use of mutanase from *Trichoderma harzianum* for effective degradation of streptococcal mutans. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36, 137-146.
4. **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., 2006: Enhancement of mutanase production in *Trichoderma harzianum* by way of mutagenization. *Acta Biologica Hungarica*. 57, 123-132.
5. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., 2006: Enzymy rozkładające α -(1 \rightarrow 3)-glukany. Część I – Źródła mikrobiologiczne, produkcja, właściwości, genetyka. *Biotechnologia*. 73, 206-220.
6. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., 2006: Enzymy rozkładające α -(1 \rightarrow 3)-glukany. Część II – Zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia*. 73, 221-233.
7. **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., 2008: Mutanase induction in *Trichoderma harzianum* by cell wall of *Laetiporus sulphureus* and its application for mutan removal from oral biofilms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 1335-1341.
8. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., Próchniak, K., 2008: α -(1 \rightarrow 3)-Glukany ściany komórkowej żółciaka siarkowego – *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill – izolacja, charakterystyka i zastosowanie do indukcji syntezy mutanazy. *Biotechnologia*. 81, 174-189.
9. **Wiater, A.**, Janczarek, M., Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., 2011: Identification and characterization of the *Trichoderma harzianum* gene encoding α -1,3-glucanase involved in streptococcal mutan degradation. *Polish Journal of Microbiology*. 60, 293-301.
10. Pleszczyńska, M., Wiater, A., Jodkowska, E., Rusyan, E., Dubielecka, M., Małkiewicz, K., Paduch, R., Walasik, K., Szczodrak, J., 2011: The effects of microbial mutanases on dental plaque aggregation and periodontal parameters. *Polish Journal of Environmental Study*. 20, 91-96. Autorzy równorzędni
11. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., Janusz, G., 2012: Comparative studies on the induction of *Trichoderma harzianum* mutanase by α -(1 \rightarrow 3)-glucan-rich fruiting bodies and mycelia of *Laetiporus sulphureus*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 9584-9598.

12. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Próchniak, K., Szczodrak, J., 2012: Structural diversity of streptococcal mutans synthesized under different culture and environmental conditions and its effect on mutanase synthesis. *Molecules*. 17, 11800-11815.
13. **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Rogalski, J., Szajnecka, L., Szczodrak, J., 2013: Purification and properties of an α -(1 \rightarrow 3)-glucanase from *Trichoderma harzianum* and its use for reduction of artificial dental plaque accumulation. *Acta Biochimica Polonica*. 60, 123-128.
14. **Wiater, A.**, Janczarek, M., Choma, A., Próchniak, K., Komaniecka, I., Szczodrak, J., 2013: Water-soluble (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- α -D-glucan from mango as a novel inducer of cariogenic biofilm-degrading enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 58, 199-205.
15. Choma, A., **Wiater, A.**, Komaniecka, I., Paduch, R., Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., 2013: Chemical characterization of a water insoluble (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydrate Polymers*. 91, 603-608.
16. Pleszczyńska, M., **Wiater, A.**, Siwulski, M., Szczodrak, J., 2013: Successful large-scale production of fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill on an artificial substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29, 753-758. Autorzy równorzędni

Łączny *impact factor* publikacji wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania: **18,907**

Suma punktów za publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z wykazem MNiSW: **280 pkt**

b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WPROWADZENIE

Grzybowe α -(1 \rightarrow 3)-glukanazy (mutanazy) są jednym ze składników przeciwgrzybowego kompleksu enzymatycznego, złożonego głównie z enzymów glukano- i chitynolitycznych określanych jako enzymy rozkładające ścianę komórkową (CWDEs, ang. *Cell Wall Degrading Enzymes*). Współdziałanie enzymów tego kompleksu prowadzi do rozkładu ścian komórkowych grzybów, m.in. patogenów roślin, dzięki czemu od dawna są one badane pod kątem zastosowania jako środek ochrony biologicznej w rolnictwie, a od kilku lat wchodzi w skład preparatów dostępnych na rynku. Spośród enzymów rozkładających ścianę komórkową, szczególną uwagę poświęca się obecnie najmniej

poznany α -(1→3)-glukanazom. Wymownym na to przykładem są badania, w wyniku których wyhodowano rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) z wklonowanym genem α -(1→3)-glukanazy z *T. harzianum*, co znacząco zwiększyło odporność rośliny na infekcje grzybowe¹. Preparaty α -(1→3)-glukanaz są wykorzystywane także, m. in. przy otrzymywaniu protoplastów grzybowych, analizie chemicznej i badaniach ultrastruktury ściany komórkowej grzybów oraz jako czynniki ułatwiające filtrowanie wina otrzymywanego z winogron zainfekowanych grzybnią *Botrytis cinerea*. α -(1→3)-Glukanazy są również używane do enzymatycznego usuwania inkluzji zatykających pory w utworach skalnych w trakcie odzyskiwania ropy naftowej z częściowo wyczerpanych złóż.

Po raz pierwszy enzym hydrolizujący wiązania α -(1→3)-glukozydowe opisali w roku 1966 Hasegawa i wsp. Enzym został wyizolowany z płynu po hodowli *Trichoderma viride* i *Penicillium funiculosum* na podłożu z dodatkiem pseudonigeranu, otrzymanego ze ściany komórkowej *Aspergillus niger* i użyty do hydrolizy grzybowych glukanów typu nigeranu, pseudonigeranu oraz mykodekstranu. Niedługo później, odkryto możliwości jakie kryje w sobie produkcja drobnoustrojowych α -(1→3)-glukanaz. Jak się okazało można je wykorzystać w stomatologii do zapobiegania próchnicy zębów i oczyszczania protez zębowych z paciorkowcowych biofilmów. W 1972 roku Guggenheim i Haller jako pierwsi opisali α -(1→3)-glukanazę z *T. harzianum* wykazującą zdolność do rozkładu paciorkowcowego mutanu (α -(1→3),(1→6)-glukanu), którą nazwali mutanazą.

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

¹ Calo, L.; García, I.; Gotor, C.; Romero, L.C. Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1,3-glucanase. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 3911–3920.

zakwaszania i umiejętności przeżycia w kwaśnym środowisku, została uznana za główny czynnik decydujący o ich próchnicotwórczości, spowodował, że próby eliminacji tego właśnie składnika płytki nazębnej na drodze enzymatycznej hydrolizy stały się jak najbardziej uzasadnione.

Rozkład i usuwanie mutanów prowadzi do zniszczenia lub choćby naruszenia struktury płytki nazębnej, a tym samym może być sposobem na zapobieganie powstawania ognisk próchnicowych. Próchnica zębów jest nadal naszym problemem narodowym. Ostatnie statystyki dotyczące sytuacji epidemiologicznej próchnicy w Polsce są zatrważające. Aż 95% dorosłych Polaków cierpi z powodu próchnicy zębów, a tylko połowa osiemnastolatków ma wszystkie zęby. Ponadto, tylko co 10 osoba w kraju regularnie stosuje pasty do zębów oraz inne akcesoria stomatologiczne, a ponad 70% dzieci w wieku 3 lat ma próchnicę zębów mlecznych. Zaawansowana próchnica oraz zły stan dziąseł mogą prowadzić także do wielu groźnych chorób m. in. miażdżycy naczyń i chorób serca (zapalenie wsierdza, niedomykalność zastawek). W związku z tym poszukuje się intensywnie nowych, alternatywnych rozwiązań w walce z próchnicą. Jednym z nich jest zastosowanie drobnoustrojowych enzymów, takich jak mutanazy, które mogą być używane jako substancja aktywna w płukankach do ust, pastach do zębów, gumach do żucia, a nawet żywności [**Biotechnologia, 2006, Część I i II**].

CEL BADAŃ

Celem badań była intensyfikacja wytwarzania mutanazy przez szczep *Trichoderma harzianum* CCM F-340 oraz opracowanie od podstaw innowacyjnej technologii produkcji tego enzymu w dużej skali niezbędnej do jego komercjalizacji. Ponadto, w ramach przeprowadzonego cyklu doświadczeń dokonano izolacji i charakterystyki biochemicznej mutanazy i genu kodującego ten enzym oraz oceniono jej potencjalne wykorzystanie do usuwania i zapobiegania powstawania biofilmów jamy ustnej w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej, wskazały wyraźnie na możliwość zastosowania paciorkowcowego mutanu jako induktora syntezy mutanazy, a wykonane *in vitro* testy symulujące hydrolizę płytki nazębnej, na możliwość jej potencjalnego wykorzystania w stomatologii. Obiecujące rezultaty i wizja komercjalizacji innowacyjnej w skali Europy metody zapobiegania próchnicy zębów, skłoniła mnie do kontynuowania doświadczeń nad grzybową mutanazą. Należy podkreślić, że badania te,

należą do pionierskich w skali kraju i nawiązują do nielicznych prowadzonych w zaledwie kilku ośrodkach na świecie.

Pierwszy etap badań dotyczył intensyfikacji produkcji mutanazy przez wybrany szczep grzybowy. W tym celu, wyselekcjonowano nową, wysokowydajną pod tym względem kulturę *Trichoderma harzianum* CCM F-340, która okazała się być znacznie aktywniejsza mutanolitycznie i stabilniejsza od używanego przez mnie w pracy doktorskiej szczepu *T. harzianum* CCM F-470. Intensyfikację wytwarzania mutanazy przez wybrany szczep przeprowadzono trzema sposobami, tj., na drodze mutagenizacji, opracowania układu ekspresyjnego do nadprodukcji rekombinowanego enzymu oraz poszukiwania nowych induktorów syntezy mutanazy.

Mutagenizacja kultury rodzicielskiej *T. harzianum* CCM F-340, opierała się na zastosowaniu fizycznych i chemicznych czynników mutagennych [***Acta Biologica Hungarica, 2006***]. Mutanty indukowano poprzez naświetlanie wodnych zawiesin konidiów promieniami UV w dawkach 250-1000 ergów/mm² lub traktowanie roztworami mutagenów chemicznych (nitrozoguanidyny (NTG), bromku etydyny (BE), hydroksylaminy (HA) i jodku metylu (JM)) oraz zastosowanie UV (250 ergów/mm²) w połączeniu z NTG. Przeżywalność konidiów *T. harzianum* pod wpływem różnych mutagenów była zróżnicowana i wahała się od 0,004 (BE) do 70% (NTG). W sumie wykonano 8 oddzielnych serii mutagenizacji, po każdej z nich 50 losowo wybranych mutantów hodowano w mikrohodowlach wytrząsanych w celu określenia ich aktywności mutanolitycznej. Aktywność enzymatyczna przebadanych mutantów wahała się w przedziale od 7 do 207% w porównaniu z kulturą rodzicielską. Jednocześnie stwierdzono, że około 56% spośród 400 przebadanych szczepów charakteryzowała się aktywnością wyższą od aktywności szczepu wyjściowego. Zastosowanie nitrozoguanidyny jako czynnika mutagennego okazało się najlepszym wariantem, czego wyrazem było uzyskanie 49 (z 50 przebadanych) mutantów o zwiększonej aktywności mutanolitycznej, w tym mutantu *T. harzianum* F-340-48 o najwyższej aktywności w stosunku do kultury rodzicielskiej (207%). Zwiększenie skali hodowli najaktywniejszego mutantu, spowodowało nieznaczny spadek w produkcji mutanazy, jednak ciągle była ona blisko dwukrotnie wyższa (197%) w stosunku do aktywności szczepu rodzicielskiego. Należy w tym miejscu podkreślić, że wyselekcjonowany mutant F-340-48 w początkowym okresie przechowywania pozostawał stabilny. W kilku hodowlach powtórzeniowych wykonanych w okresie 4 miesięcy po mutagenizacji, jego aktywność mutanolityczna wahała się w zakresie 5%. Wyraźny spadek produkcji mutanazy w hodowlach wytrząsanych (do poziomu aktywności szczepu rodzicielskiego) nastąpił po około dwóch latach przechowywania i pasażowania mutantu. Fakt ten całkowicie dyskredytuje mutantu *T. harzianum* F-340-48 jako potencjalnie nowe, wysokowydajne źródło zewnątrzkomórkowej mutanazy, które mogłoby zostać wykorzystane w praktyce do otrzymywania aktywnego preparatu enzymatycznego.

Kolejnym ze sposobów intensyfikacji wytwarzania mutanazy przez *T. harzianum* CCM F-340, były próby mające na celu uzyskanie efektywnych układów ekspresyjnych homo- i heterologicznych do nadprodukcji tego enzymu [**Polish Journal of Microbiology, 2011**]. Wykorzystując RNA wyizolowany ze szczepu *T. harzianum* CCM F-340 oraz starter oligo(dT)₁₅ i starter zdegenerowany komplementarny do 5' końca genu kodującego mutanazę otrzymano cDNA w reakcji RT-PCR. Uzyskany produkt PCR został wklonowany do wektora pJET1.2 i poddany analizie sekwencyjnej, a następnie przeklonowany do wektora ekspresyjnego pET15bTM. W ramach przeprowadzonych doświadczeń sprawdzono możliwości produkcji enzymu w formie nieglikozylowanej w heterologicznym układzie ekspresyjnym *Escherichia coli* jako białka natywnego oraz białka zawierającego etykietkę oligohistydynową (His)₆ na N-końcu polipeptydu. Sprawdzono również efektywność drożdżowego systemu ekspresyjnego *Pichia pastoris* GS115 w produkcji tego enzymu. Ustalono, że mutanaza była syntetyzowana i eksportowana na zewnątrz komórek drożdży, ale białko to nie posiadało aktywności enzymatycznej najprawdopodobniej z powodu wysokiego stopnia jego glikozylacji, która jest typowa dla systemu ekspresyjnego *P. pastoris*. Natomiast w bakteryjnym systemie ekspresyjnym uzyskano produkcję aktywnej mutanazy, ale tylko dla wariantu białka niezawierającego etykietyki histydynowej (His)₆ (białko fuzyjne nie posiadało aktywności enzymatycznej prawdopodobnie w efekcie zmian strukturalnych spowodowanych obecnością domeny oligohistydynowej). Jednak stabilność i aktywność tego enzymu była zdecydowanie mniejsza w porównaniu do natywnej mutanazy wyizolowanej z supernatantu pochodzącego z *T. harzianum*, co mogło być skutkiem braku właściwej modyfikacji potranslacyjnej (glikozylacja), która jest obecna w białku produkowanym w rodzimym tle genetycznym. Wydajność produkcji rekombinowanej mutanazy w układzie ekspresyjnym *E. coli* była na dość niskim poziomie. Efekt ten mógł być spowodowany niższą wydajnością odczytywania kodonów genu eukariotycznego w gospodarzu bakteryjnym oraz wysoką toksycznością tego białka dla komórek. W wyniku oczyszczania z użyciem metod chromatograficznych (żywice jonowymiennie: słaby i silny anionit i kationit oraz chromatografia hydrofobowa) otrzymano frakcję białka o 80% stopniu czystości, która poddana została analizie enzymatycznej i biochemicznej. Podsumowując, spośród przeanalizowanych systemów ekspresyjnych jedynie w bakteryjnym systemie *E. coli* udało się uzyskać produkcję aktywnej mutanazy. Jednak synteza tego białka była na niskim poziomie, a otrzymany enzym charakteryzował się niższą aktywnością od natywnej mutanazy pochodzącej z *T. harzianum*, wskazując że sposób uzyskiwania rekombinowanego enzymu jest mało efektywny.

Mutanaza *T. harzianum* CCM F-340, podobnie jak większość mutanaz grzybowych należy do enzymów indukowanych obecnością glukanów zawierających w swojej strukturze wiązania glukozydowe typu α -(1→3). Dlatego, trzecim sposobem intensyfikacji produkcji

mutanazy przez *T. harzianum* CCM F-340, było poszukiwanie nowych, naturalnych źródeł tych polimerów. Ten etap badań obejmował testowanie induktorów izolowanych z materiału pochodzenia bakteryjnego, grzybowego oraz roślinnego.

W odniesieniu do źródła bakteryjnego, najlepszym, dotychczas stosowanym induktorem biosyntezy mutanazy był mutan (α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glukan), produkowany pozakomórkowo przez niektóre szczepy próchnicotwórczych paciorkowców, m. in. *Streptococcus mutans* i *S. sobrinus*. Dlatego, użyto go w charakterze stymulatora w kolejnym doświadczeniu określającym optymalne warunki produkcji mutanazy metodą hodowli wgłębnej przez *T. harzianum* CCM F-340 [**Bazilian Journal of Microbiology, 2005**]. Stwierdzono, że wydajna produkcja enzymu zachodziła w temperaturze 30°C, na zoptymalizowanym podłożu Parrish i Mandels`a o pH 5,3, zawierającym 0,3% mutanu jako jedyne źródła węgla. Uzyskana w tych warunkach aktywność (0,72 U/cm³), była jedną z najwyższych cytowanych w literaturze, a ponadto, ponad dwukrotnie przewyższała aktywność (0,33 U/cm³) badanej w ramach mojej pracy doktorskiej kultury *T. harzianum* CCM F-470. Określenie optymalnych warunków dla działania tego enzymu oraz jego podstawowych właściwości fizykochemicznych stało się podstawą do opracowania opatentowanego w 2008 roku preparatu do usuwania biofilmów jamy ustnej [**Patent Nr 199056**]².

Z uwagi na fakt, że przemysłowa produkcja mutanazy wymagałaby użycia dużych ilości mutanu jako induktora, w kolejnym etapie badań opracowano efektywny sposób pozyskiwania większych ilości tego biopolimeru [**Acta Biologica Hungarica, 2005**]. Proces biosyntezy mutanu przebiega w dwóch zasadniczych etapach. Pierwszy z nich to hodowla paciorkowców próchnicotwórczych wytwarzających w sposób konstytutywny zewnątrzkomórkowe glukozylotransferazy (GTF-azy). W drugim etapie przy udziale tych enzymów syntetyzowany jest z sacharozy nierozpuszczalny w wodzie mutan. Prace dotyczące zwiększenia wydajności mutanu obejmowały więc, zarówno optymalizację warunków wytwarzania glukozylotransferaz w hodowli paciorkowców (*S. sobrinus/downei* CCUG 21020), jak też syntezy biopolimeru z udziałem tych enzymów. Średnia wydajność mutanu w zoptymalizowanych warunkach dwustopniowej biosyntezy wyniosła 2,2 g/l supernatantu i była blisko 12-krotnie większa w porównaniu z danymi literaturowymi.

Patrząc przez pryzmat przyszłej komercjalizacji produkcji mutanazy, użycie mutanu paciorkowcowego do indukcji enzymu, dodawanego następnie do środków higieny jamy ustnej, wydaje się jednak z wielu powodów niewskazane. Związane jest to głównie z bezpieczeństwem stosowania mutanu oraz ekonomią całego procesu. Mutan produkowany jest z zastosowaniem wieloetapowej procedury wymagającej użycia patogennych

² Szczodrak, J., **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M. 2008, Preparat do usuwania biofilmu jamy ustnej. Patent nr 199056, Polska, Urząd Patentowy RP.

paciorkowców próchnicotwórczych oraz drogiego i niebezpiecznego podłoża hodowlanego (wołowy wyciąg mózgowo-sercowy). Ponadto, mutan syntetyzowany jest ze stosunkowo niską wydajnością (max. 2,2 g/l), co znacznie podraża całą technologię. Bardzo ważnym aspektem syntezy mutanu jest dodatkowo jego zmienność strukturalna, zależna zarówno od użytego szczepu bakteryjnego, rodzaju podłoża, jak i warunków hodowli. Wykazałem to w badaniach, w których w wyniku zmiany parametrów biosyntezy otrzymano 76 różnych mutanów [**Molecules**, 2012]. Nieznaczna zmiana choćby jednego z parametrów dwustopniowej biosyntezy, prowadziła do otrzymania polimeru o odmiennej strukturze i właściwościach. Stwierdzono, że ilość wiązań typu α -(1→3) i α -(1→6) w badanych mutanach wahała się odpowiednio, od 43 do 75,3% i od 24,7 do 57%. Natomiast, stosunek wiązań α -(1→3)/ α -(1→6) w badanych glukanych oscylował między 0,75 a 3,05. Warto tutaj również wspomnieć o otrzymaniu czterech mutanów o unikatowej, nie opisanej dotychczas w literaturze strukturze. Ich wyjątkowość związana jest z nietypową ilością w ich cząsteczce wiązań α -(1→3)-glukozydowych, tzn. poniżej charakterystycznego dla mutanów poziomu 50%. Tak duża różnorodność strukturalna mutanów, a co za tym idzie i ich właściwości fizykochemicznych spowodowana jest aktywnością całej grupy GTF-az odpowiedzialnych za ich syntezę. Dla przykładu *S. mutans* produkuje trzy różne glukozylotransferazy, tj. I, S, SI, a *S. sobrinus* cztery (I, S, T i U). Ostateczny produkt biosyntezy mutanu zależy więc od względnej aktywności tych enzymów i wzajemnych zależności między nimi, ponieważ każda GTF-aza może modyfikować produkt innej.

Ważnym aspektem prowadzonych badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy i jaki wpływ na indukcję mutanazy ma ilość wiązań α -(1→3)-glukozydowych w cząsteczce mutanu. W tym celu 76 strukturalnie różnych mutanów (zawierających od 43 do 75,3% wiązań α -(1→3)-glukozydowych) użyto jako jedyne źródła węgla w hodowlach wytrąsanych *T. harzianum* CCM F-340 [**Molecules**, 2012]. Uzyskane po trzech dniach hodowli aktywności mutanolityczne, wahały się od 0,144 do 1,051 U/ml i jak wykazała analiza statystyczna, nie istniała żadna korelacja między ich poziomem a ilością wiązań α -(1→3)-glukozydowych w cząsteczce induktora (współczynnik korelacji Pearsona $R = -0,159$, współczynnik determinacji $R^2 = 0,0252$, regresja liniowa $y = -0,0044x + 0,7681$, $p < 0,05$). W oparciu o te wyniki, można przypuszczać, że poziom produkcji mutanazy (wrażony jej aktywnością) zależy nie tylko od ilości wiązań α -(1→3)-glukozydowych w mutanie, ale również od innych czynników, takich jak przestrzenny układ wiązań w cząsteczce induktora oraz dostępność enzymu do sekwencji α -(1→3).

Przedstawione powyżej problemy sprawiają, że mutan wydaje się nie być odpowiednim induktorem możliwym do zastosowania w przemysłowej produkcji mutanaz. Dlatego, równoległe z badaniami nad mutanem, poszukiwałem nowych, tanich i bezpiecznych, a zarazem skuteczniejszych zamienników tego aktywatora. Według danych

literaturowych olbrzymi rezerwuar α -(1→3)-glukanów, potencjalnych induktorów syntezy mutanaz, stanowiły grzyby. Obecność tych glukanów została stwierdzona u licznych przedstawicieli, należących zarówno do klasy *Ascomycetes* jak i *Basidiomycetes*. α -(1→3)-Glukany będące składnikiem strukturalnym ściany komórkowej grzybów, pełnią w niej funkcję podporową, są czynnikiem wirulencji oraz stanowią materiał zapasowy [**Biotechnologia, 2008**]. Ponadto, mogą one stanowić bogate źródło bezpiecznego i taniego stymulatora syntezy mutanaz, alternatywnego w stosunku do paciorkowcowego mutanu. Ilość tych polisacharydów u poszczególnych grzybów wahała się w bardzo szerokim zakresie. Dla przykładu, nie stwierdzono ich obecności u drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*, natomiast w grzybni *Aspergillus* spp. ich zawartość osiąga 30%, a w owocnikach poroka brzozowego (*Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.)) i żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill), odpowiednio, nawet 53 i 88% suchej masy.

We wstępnych doświadczeniach dotyczących wykorzystania grzybów jako źródła induktorów syntezy mutanazy, wykazałem, że do tego celu można z powodzeniem zastosować grzybnię *Aspergillus wentii* [**Bazilian Journal of Microbiology, 2005**]. Późniejsze badania, w których zastosowano technikę immunofluorescencji (z wykorzystaniem mysich IgMy MOPC-104E oraz kozich anty mysich przeciwciał drugorzędowych IgM sprzężonych z barwnikiem Alexa Fluor 488) i metodę ekstrakcji alkalicznej potwierdziły, że biomasa tego grzyba stanowi doskonałe źródło α -glukanów (ich zawartość w tym materiale wynosi 6,5% suchej masy) [**Carbohydrate Polymers, 2013**]. Dodatkowo, analizy metylacyjna, FT-IR oraz 1D i 2D NMR (TOCSY, DQF-COSY, NOESY i HSQC) pozwoliły określić dokładną strukturę tego polimeru. Nierozpuszczalny w wodzie polisacharyd o masie 850 kDa składał się z 25 podjednostek, zbudowanych z 200 reszt glukozowych połączonych wiązaniem α -(1→3)-glukozydowym, rozdzielonych krótkimi odstępnikami złożonymi z glukoz połączonych wiązaniem α -(1→4)-glukozydowym.

Dalsze poszukiwania wydajnego źródła grzybowych α -(1→3)-glukanów, polegały na szeroko zakrojonym skryningu, w trakcie którego przebadano grzybnię grzybów strzępkowych m.in. z rodzaju *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Trichoderma* oraz owocników grzybów z rodzaju *Ganoderma*, *Kuehneromyces*, *Laetiporus*, *Lentinus*, *Piptoporus* i *Pleurotus*. Zdecydowanie najwyższą zawartość α -(1→3)-glukanów w ścianie komórkowej stwierdzono u żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*). Powszechne występowanie tego grzyba w przyrodzie, tworzenie owocników o dużej masie (sięgającej nawet 45 kg)³ oraz uznanie go za stosunkowo bezpiecznego dla człowieka (młode owocniki są jadalne), sprawiły, że organizm ten stał się obiektem mojego zainteresowania jako potencjalne źródło efektywnego i alternatywnego w stosunku do mutanu induktora syntezy

³ Glenday, Craig (2009). *Guinness World Records 2009*. Random House, Inc. ISBN 978-0-553-59256-6.

mutanaz. W literaturze, jak dotąd, nie było doniesień na ten temat i dlatego przeprowadzone w tym kierunku badania miały charakter pionierski.

Z punktu widzenia potencjalnej komercjalizacji produkcji mutanazy, ważnym elementem prac był wybór wydajnego i taniego sposobu izolacji α -(1→3)-glukanów z owocników żółciaka siarkowego. W tym celu wybrano z literatury przedmiotowej i przetestowano pięć metod izolacji tych biopolimerów (m.in. jedna z nich została opracowana przeze mnie [**Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008**]), różniących się praco- i kosztocłonnością i zużyciem odczynników [**Biotechnologia, 2008**]. Wykorzystanie analiz strukturalnych (¹HNMR, FT-IR, GC-MS) pozwoliło dodatkowo, na ocenę składu i czystości wyizolowanych frakcji. Cztery z testowanych technik dawały podobną ilość α -(1→3)-glukanów, wynoszącą około 56% suchej masy owocników, natomiast piąta najdroższa i najbardziej pracochłonna metoda enzymatyczna (z użyciem preparatu Lyticase) zaledwie połowę tej ilości. Ostatecznie, spośród badanych metod wybrano procedurę opracowaną przeze mnie, ponieważ praco- i kosztocłonność izolacji α -(1→3)-glukanów w tej metodzie w stosunku do aktywności mutanolitycznej uzyskiwanej z jej udziałem była najniższa.

Z uwagi na fakt, że stosowanie do indukcji syntezy mutanaz, czystych α -(1→3)-glukanów izolowanych z żółciaka siarkowego może być mało opłacalne, podjęto próby wykorzystania w tym celu mniej oczyszczonych, a przez to tańszych preparatów, tj. wysuszone i sproszkowane owocniki oraz CWP (ang. *Cell Wall Preparation*) czyli wysuszone i sproszkowane owocniki poddane dodatkowo 3-krotnemu wygotowaniu w celu odrzucenia substancji rozpuszczalnych w wodzie [**Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008**]. Stwierdzono, że spośród trzech różnych form α -(1→3)-glukanu dodanego do podłoża jako jedyne źródło węgla (czysty polimer, CWP oraz sproszkowane wysuszone owocniki) najlepszym stymulatorem syntezy mutanazy *T. harzianum* CCM F-340, w trakcie 3-dniowej hodowli wytrząsanej, był CWP. Wydajność enzymu z jego użyciem wyniosła 0,71 U/cm³ i była 1,8 razy wyższa od tej uzyskanej na mutanie. Ponadto, mutanaza indukowana CWP wykazywała wysoką aktywność hydrolityczną w reakcji z mutanem. Maksymalny stopień scukrzenia i solubilizacji tego biopolimeru (odpowiednio, 80 i 100%) osiągnięto po 3 godzinach hydrolizy w temperaturze 45°C. Dodatkowo, wykazano, że mieszanina testowanej mutanazy i handlowego preparatu dekstranazy (Sigma-Aldrich), w ciągu 6 godzin, całkowicie usuwała z powierzchni szklanych osadzony na nich biofilm mikrobiologiczny imitujący płytkę nazębną. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, w dalszych badaniach jako induktora syntezy mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 zaczęto stosować CWP z żółciaka siarkowego.

W wyżej opisanych eksperymentach, do przygotowania CWP używano mieszanki wysuszonych, starych i młodych owocników żółciaka siarkowego. Dlatego preparat ten zawierał α -(1→3)-glukany o różnej charakterystyce, co mogło wpływać na indukcję syntezy mutanazy. Biorąc to pod uwagę, w kolejnym etapie doświadczeń przeanalizowano

pojedyncze owocniki żółciaka pod kątem zawartości α -(1→3)-glukanów oraz zastosowano przygotowane z nich CWP jako induktory syntezy mutanazy u *T. harzianum* CCM F-340 [International Journal of Molecular Sciences, 2012]. Zebrane i zidentyfikowane (analiza sekwencji ITS) owocniki *L. sulphureus* (16 okazów) podzielono na 4 grupy, w zależności od stopnia dojrzałości hymenoforu. Stwierdzono, że zawartość α -(1→3)-glukanów w poszczególnych owocnikach, zależała od wieku i wahała się od 17,3% w młodych okazach do 47,8% w najstarszych. Z kolei ilość α -glukanów w preparatach CWP przygotowanych z poszczególnych owocników, użytych następnie jako induktory syntezy mutanazy w 3-dniowej hodowli wgłębnej *T. harzianum*, wzrosła i w zależności od wieku owocnika, wynosiła od 39,4 do 73,4%. Aktywność mutanolityczna uzyskana na poszczególnych CWP wahała się od 0,53 do 0,82 U/cm³. Jak wykazała analiza statystyczna (współczynnik korelacji Pearsona $R = 0.776$, współczynnik determinacji $R^2 = 0.602$, regresja liniowa $y = 0.0066x + 0.2844$, $p < 0.05$) istniała wysoka pozytywna korelacja między ilością α -(1→3)-glukanów w poszczególnych CWP, a indukowaną przez nie aktywnością mutanolityczną. Jednak, nie zaobserwowano takiej korelacji przy przeliczeniu aktywności enzymatycznej na gram α -(1→3)-glukanów, obecnych w poszczególnych CWP. Potwierdza to wcześniejsze wyniki zaobserwowane w hodowlach z użyciem w charakterze induktora mutanazy zróżnicowanych strukturalnie mutanów i wskazuje, że produkcja tego enzymu zależy nie tylko od ilości wiązań α -(1→3)-glukozydowych w cząsteczce induktora, ale również od wielu innych czynników. Dodatkowo stwierdzono, że z punktu widzenia technologii produkcji mutanazy, użycie CWP przygotowanego z mieszanki owocników żółciaka w różnym wieku jest jak najbardziej uzasadnione. Świadczy o tym fakt, że aktywność enzymatyczna uzyskana na takim CWP jest tylko nieznacznie niższa (0,71 U/cm³) od tej uzyskanej na najlepszym CWP z pojedynczego okazu (0,82 U/cm³).

Inna seria doświadczeń dotyczyła wykorzystania grzybni wegetatywnej żółciaka siarkowego w charakterze induktora syntezy mutanazy [International Journal of Molecular Sciences, 2012]. Łatwa do otrzymania na dużą skalę grzybnia, mogłaby uniezależnić produkcję mutanazy od zbieranych z natury owocników. W wyniku 5-tygodniowej hodowli wgłębnej *L. sulphureus* CBS 388.61, prowadzonej na dziewięciu różnych pożywkach, wybrano podłoże Sabouraud jako najlepsze medium do pozyskiwania biomasy tego grzyba. Stwierdzono, że 3-tygodniowa grzybnia natywna otrzymana na tym podłożu oraz przygotowane z niej CWP zawierały najwięcej α -(1→3)-glukanów (odpowiednio, 19,7 i 27,8%), a CWP użyte w hodowli wgłębnej *T. harzianum* indukowało najwyższą aktywność mutanolityczną (0,34 U/cm³). Poziom tej aktywności był ponad dwukrotnie niższy od aktywności uzyskanej w przypadku użycia najbardziej wydajnego CWP z owocników żółciaka. Biorąc jednak pod uwagę przeliczenie aktywności mutanazy na gram czystego biopolimeru w CWP, aktywność uzyskana na CWP z grzybni (3,06 U/g α -(1→3)-glukanów) w

większości przypadków przewyższała aktywność uzyskaną na CWP z owocników (2,34 – 3,38 U/g α -(1→3)-glukanów). Dlatego, stwierdzono, że grzybnia wegetatywna *L. sulphureus* jest równie efektywnym źródłem induktorów syntezy mutanazy jak jego owocniki i może być z powodzeniem użyta do produkcji enzymu w skali przemysłowej.

Z uwagi na okresowe pojawianie się owocników żółciaka siarkowego w środowisku naturalnym (późna wiosna i wczesna jesień), zapewnienie płynności dostaw tego grzyba jako źródła induktora do przemysłowej produkcji mutanazy, może stanowić pewien problem. Dlatego, we współpracy z Katedrą Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Farmą Grzybów Leczniczych Mycomed podjęto próbę jego hodowli na sztucznym podłożu w warunkach hali uprawowej [***World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013***]. Hodowlę grzyba prowadzono w workach polipropylenowych z zamontowanym filtrem dokładnym (30 μ m) i wypełnionych substratem składającym się z trocin drzew o drewnie twardym (dąb) i miękkim (brzoza, olsza, osika, topola), o wilgotności pomiędzy 40 a 65%, uzupełnionym mieszanką organiczną (mieszanka otrąb i ziarna zbóż) w ilości od 30 do 45% (w/w) w stosunku do suchej masy trocin oraz mieszanką substancji mineralnych (głównie gips, dolomit i kreda) w ilości stanowiącej 7,2% (w/w) w stosunku do suchej masy trocin. Tak przygotowane worki (3000 wariantów) szczepiono grzybnią ziarnistą *L. sulphureus* (jednym z 12 szczepów żółciaka wyizolowanych ze środowiska naturalnego) i szczelnie zamknięte inkubowano przez 40 dni w komorze o temperaturze w granicach 22-24°C i wilgotności względnej 65-70%, naświetlając światłem fluorescencyjnym o natężeniu oświetlenia 100–150 lx przez 8-10 godz./dobę, a także stosując wymianę powietrza w komorze raz na 4 do 8 godzin. Po tak przeprowadzonej kolonizacji podłoża, proces powstawania owocników indukowano metodą termiczno-tlenową wstrzykując do wnętrza opakowania, poprzez filtr dokładny, wodę o temperaturze 5-10°C w ilości 10-15% (w/w) lub w drugim wariancie metodą termiczną, schładzając podłoże z grzybnią do temperatury 2-4°C. Zawiązki owocników pojawiały się na powierzchni filtra już po 5-6 dniach od momentu indukcji, a po kolejnych 2 dniach zaczęły się rozwijać w owocniki, które ostatecznie dorastały do 200-300 g. Jak ustalono, w procesie owocnikowania kluczową rolę odgrywał stopień suplementacji organicznej oraz wilgotność podłoża. Przeprowadzone z sukcesem, próby hodowli owocników żółciaka siarkowego w dużej skali oraz brak takich doniesień w literaturze naukowej, dały podstawę do zastrzeżenia wyników badań w postaci zgłoszenia patentowego [**P.397668**]⁴. Otrzymanie owocników żółciaka w dużej skali jako źródła induktora syntezy mutanazy, dało również zielone światło dla opracowania przemysłowej technologii produkcji tego enzymu.

⁴ **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., Siwulski, M., Biernacki, K., 2012, Sposób hodowli owocników żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*), P.397668, Polska, Urząd Patentowy RP.

Rośliny stanowią najuboższe źródło α -(1 \rightarrow 3)-glukanów i były ostatnim przebadanym przeze mnie rezerwuarem tych polisacharydów. Ich obecność stwierdzono jedynie w owocach mango i chlebowca bochenkowego oraz niektórych glonach. Brak jest doniesień na temat ich wykorzystania do indukcji syntezy mutanazy. Fakt, że mango (*Mangifera indica* L.) jest jednym z najczęściej uprawianych owoców na świecie, skłonił mnie do wykorzystania go jako potencjalnego źródła bezpiecznych dla człowieka α -(1 \rightarrow 3)-glukanów [***International Journal of Biological Macromolecules, 2013***]. Dane literaturowe wskazywały, że α -glukany z owoców mango należą do polisacharydów rozpuszczalnych w wodzie, dlatego do ich izolacji z miąższu użyto ekstrakcji wodnej. Analiza strukturalna wyizolowanych i oczyszczonych polisacharydów wykazała, że są to α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-glukany o masie cząsteczkowej 760 kDa, w których stosunek glukozydów połączonych wiązaniem α -(1 \rightarrow 4) i α -(1 \rightarrow 3) wynosi 1:2,4. α -Glukany z mango użyte w charakterze induktora syntezy mutanazy *T. harzianum* nie dały oczekiwanego rezultatu. Pomimo, stosunkowo wysokiego poziomu ekspresji genu mutanazy (5-krotny wzrost transkrypcji genu *mutAW* kodującego mutanazę *T. harzianum* CCM F-340), aktywność enzymatyczna uzyskana po 3 dniach hodowli w głębszej wyniosła zaledwie 34 mU/ml. Niski poziom indukcji przy użyciu α -glukanów z mango, nie wpłynął jednak na aktywność samej mutanazy. Enzym, użyty w trakcie 24-godzinnej hydrolizy natywnego mutanu (zawierającego 59,1% wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych) spowodował, że polimer uległ solubilizacji w 63%, a jego scukrzenie, w stosunku do ilości wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych, wyniosło 92%. Dodatkowo, jak zaobserwowano w obrazie z mikroskopu konfokalnego, grubość biofilmu (imitującego płytkę nazębną) osadzonego na krążkach szklanych, w trakcie 3-godzinnej hydrolizy przy użyciu mieszaniny mutanazy i komercyjnej dekstranazy, uległa redukcji z 400 do 80 μ m.

Podsumowując badania zmierzające do intensyfikacji wytwarzania mutanazy przez *T. harzianum* CCM F-340, należy stwierdzić, że poza odkryciem nowych efektywnych induktorów syntezy enzymu, żaden z testowanych sposobów nie spełnił zakładanych oczekiwań. Dlatego, wydaje się, że optymalnym rozwiązaniem, które otwiera drogę do przemysłowej produkcji mutanazy, jest użycie w charakterze jej induktora CWP z owocników lub grzybni wegetatywnej żółciaka siarkowego. Jego przewaga nad innymi, dotychczas stosowanymi, induktorami polega na tym, że jest bezpieczny dla ludzi, tani i łatwo dostępny. Dodatkowo w celu zabezpieczenia płynności produkcji przemysłowej mutanazy, opracowano również innowacyjną technologię hodowli owocników żółciaka siarkowego na sztucznym podłożu. Możliwość hodowli tego grzyba uniezależni ewentualnego producenta mutanazy od konieczności pozyskiwania go ze środowiska naturalnego.

Odkrycie bezpiecznego i efektywnego induktora oraz zabezpieczenie źródła jego otrzymywania w dużej skali, otworzyło drogę do opracowania pełnej technologii produkcji mutanazy na dużą skalę, co stwarza realną możliwość komercjalizacji tego enzymu. W tym

celu, w oparciu o metodę odpowiedzi płaszczyzny RSM (ang. *Responce Surface Methodology*), zoptymalizowano warunki hodowli *T. harzianum* CCM F-340, a następnie we współpracy ze Stacją Doświadczalną Doskonalenia Technologii w Dziedzinie „Żywność i Zdrowie” Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, przeprowadzono powiększenie skali produkcji mutanazy, poprzez zwiększenie objętości stosowanych zbiorników hodowlanych z jednoczesnym zachowaniem parametrów decydujących o wydajności procesu. Produkcję enzymu w skali półtechnicznej, przeprowadzono z wykorzystaniem bioreaktora o pojemności całkowitej 150 l (New Brunswick Sciences). Podsumowaniem całego etapu prac było opracowanie innowacyjnej w skali Europy instrukcji technologicznej (Nr IT01-UMCS-12) pt. „Postępowanie normalizacyjne oraz sporządzenie dokumentacji technicznej dla mutanazy, substancji czynnej dla przyszłego produktu w postaci płynu do płukania ust, mającej być przedmiotem wdrożenia i będącej wynikiem prac B+R”. Ze względu na klauzulę tajności (Dokument „Know-How” poz. Z/16/12 z dnia 11.12.2012 r., UMCS, Lublin), którą objęta jest instrukcja, jej treść nie jest opublikowana. Instrukcja zawiera charakterystykę substancji czynnej, materiałów wyjściowych do produkcji, wielkości serii i zużycia surowców i materiałów, procesu technologicznego, badań kontrolnych substancji czynnej, odchyleń w procesie technologicznym i wpływu parametrów na jakość substancji czynnych, nadzoru i kwalifikacji personelu, wpływu czynników energetycznych na przebieg procesu technologicznego, transportu wewnętrznego, higieny pomieszczeń, urządzeń i załogi, odpadów i ścieków, BHP i ochrony przeciwpożarowej. Opracowano też procedury normalizacyjne dla produkcji mutanazy, tj. szczegółowe specyfikacje dotyczące materiału opakowaniowego, produktu pośredniego, materiału wyjściowego pochodzenia biologicznego, podłoża hodowlanego, substancji czynnej (mutanaza - produkt końcowy) i substancji pomocniczej.

Przedstawiona powyżej technologia zamyka cały cykl pionierskich badań nad mutaną *T. harzianum* CCM F-340 i jest wynikiem prac badawczych prowadzonych w ramach grantu zarządzanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (Inicjatywa Technologiczna I) pt. „Opracowanie technologii produkcji preparatów enzymatycznych efektywnych w profilaktyce próchnicy zębów i oczyszczaniu protez zębowych u ludzi oraz utrzymaniu właściwej higieny jamy ustnej u zwierząt”, którego byłem głównym wykonawcą. Należy tutaj nadmienić, że zakończony w 2012 r. projekt został bardzo wysoko oceniony, szczególnie pod względem merytorycznym. W ramach grantu IT 1, wykonano również badania rynku obejmujące ocenę szans i zagrożeń zastosowania mutanazy w stomatologii, badanie wymogów i ograniczeń regulacyjnych dla komercjalizacji enzymu oraz badanie potencjału, analizę regulacyjną, wycenę i prognozę sprzedaży dla dwóch produktów docelowych w procesie komercjalizacji. Obecnie trwają poszukiwania kontrahentów

zainteresowanych wdrożeniem technologii produkcji mutanazy *T. harzianum* do celów stomatologicznych oraz jako odczynnika w badaniach biochemicznych.

Kolejnym etapem badań przeprowadzonych w ramach zgłaszanego osiągnięcia naukowego była charakterystyka biochemiczna mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 i genu kodującego ten enzym oraz ocena jej potencjalnego wykorzystania do usuwania i zapobiegania powstawaniu biofilmów jamy ustnej *in vitro* i *in vivo*.

W wyniku czterostopniowej procedury oczyszczania mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 (ultrafiltracja, chromatografia jonowymienna, chromatografia hydrofobowa, chromatogniskowanie) otrzymano homogenne białko o masie cząsteczkowej 67 kDa i punkcie izoelektrycznym 7,1 [***Acta Biochimica Polonica*, 2013**]. Podstawowe parametry biochemiczne oczyszczonej mutanazy wskazywały, że jest ona typową grzybową α -(1 \rightarrow 3)-glukanazą. Ilość składnika węglowodanowego w cząsteczce enzymu kształtował się na poziomie 3%. Optymalne wartości pH i temperatury dla jego działania, wyniosły odpowiednio 5,5 i 45°C, natomiast stałe kinetyczne K_m i V_{max} , odpowiednio 0,73 mg/ml i $11,39 \times 10^{-2}$ μ mol/min/mg białka. Aktywność enzymatyczna mutanazy była stymulowana obecnością jonów Mg^{2+} i Na^+ , natomiast całkowicie hamowana przez jony Hg^{2+} . Dodatkowo, wykazano, że N-końcowa sekwencja oczyszczonego białka (ASSADRLVFCHFMIGIVGDR) jest identyczna z sekwencją mutanaz *T. harzianum* oraz bardzo podobna do wytwarzanych przez inne grzyby strzępkowe. Oczyszczony enzym wykazywał wysoką specyficzność substratową wobec wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych. Mutanaza hydrolizowała zarówno rozgałęzione paciorkowcowe mutany, jak i liniowe α -(1 \rightarrow 3)-glukany grzybowe, przy czym stopień hydrolizy nie zależał tylko od ilości tych wiązań, ale również od struktury α -glukanów.

Równolegle do charakterystyki enzymu przeprowadzono również badania dotyczące identyfikacji i analizy funkcjonalnej genu *mutAW*, kodującego mutanazę *T. harzianum* CCM F-340 [***Polish Journal of Microbiology*, 2011**]. Ustalono, że gen *mutAW* o długości 2000 nt, zawiera 2 introny o 52 nt i 43 nt, a jego cDNA koduje białko o masie 68 kDa (634 aa). Ponadto, 111 nukleotydów od końca 5' genu koduje peptyd sygnałowy o długości 37 aminokwasów. Sekwencja genu *mutAW* została wprowadzona do bazy danych GenBank (HQ871941). Stwierdzono, że mutanaza jest wysoce konserwatywnym białkiem i zawiera dwie funkcjonalne domeny: N-terminalną domenę katalityczną (38-490 aa) i C-terminalną domenę wiążącą polisacharyd (551-634 aa). Analiza sekwencji *mutAW* na poziomie DNA i białka oraz analiza filogenetyczna tego genu, wykazała wysoką homologię sekwencji do genu mutanazy *Hypocrea lixii* (96,2% identyczności), *T. asperellum* (82,8%) oraz genu *mutA* *Penicillium purpurogenum* (72,7%).

Celem ostatniego etapu badań, była ocena skuteczności mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 w rozkładzie biofilmów jamy ustnej, *in vitro* i *in vivo*. W początkowej fazie badań przeprowadzono doświadczenie, w którym określono wpływ mutanazy na formowanie się

wieloskładnikowego biofilmu, w symulowanych warunkach jamy ustnej [**Acta Biochimica Polonica, 2013**]. W eksperymencie wykorzystano bioreaktor do hodowli biofilmów (CBR 90 CDC Biofilm Reactor, BioSurface Technologies Corp., USA), umożliwiający osadzanie sztucznej płytki nazębnej na twardych powierzchniach (np. krążkach szklanych) w warunkach stresu wywołanego przez siły ścinające, symulujące warunki panujące w jamie ustnej. Siły te mogą mieć istotny wpływ na skład, strukturę, a przez to i oporność biofilmu. Krążki szklane, imitujące powierzchnię zęba, opłaszczano sztuczną śliną, a następnie umieszczano w naczyniu bioreaktora zawierającym podłoże BHI zaszczerpione 12-godziną hodowlą paciorkowców próchnicotwórczych. Krążki z wyhodowaną sztuczną płytką nazębną zanurzano 3 razy dziennie na 30 min w BHI z dodatkiem 3% sacharozy, co symulowało przyjmowanie regularnych posiłków przez człowieka. Następnie krążki przenoszono na 3 min do roztworów mutanazy lub buforu (co symulowało właściwą higienę jamy ustnej poprzez stosowanie płukanki z mutanazą lub placebo) i po przepłukaniu buforem przenoszono z powrotem do podłoża BHI zaszczerpionego bakteriami. Doświadczenie prowadzono przez 4 dni. Po tym czasie, stosując metodę barwienia erytrozyną, oceniono ilość osadzonej na krążkach sztucznej płytki nazębnej. Doświadczenie wykazało, że mutanaza *T. harzianum* CCM F-340, po relatywnie krótkim kontakcie z biofilmem (3 x 3 min/24 godz.) zredukowała jego wielkość o blisko 30%, potwierdzając tym samym zasadność jej użycia jako substancji czynnej w środkach higieny jamy ustnej.

Kolejnym etapem weryfikującym skuteczność mutanazy z *T. harzianum* CCM F-340 w zapobieganiu próchnicy zębów, były badania *in vivo* przeprowadzone we współpracy z Zakładem Stomatologii Zachowawczej Uniwersytetu Warszawskiego [**Polish Journal of Environmental Study, 2011**]. Do oceny skuteczności działania przeciwpróchnicowego użyto również preparatu mutanazy bakteryjnej z *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1. Oba preparaty zostały pozytywnie zweryfikowane w badaniach toksykologicznych (badanie działania drażniącego po wielokrotnym podaniu naskórnym wykonane na królikach, badanie działania drażniącego na błonę śluzową i pozostałe struktury anatomiczne oka królika oraz badanie działania uczulającego wykonane na świnkach morskich) przeprowadzonych przez Narodowy Instytut Leków w Warszawie, a następnie uzyskały pozytywną rekomendację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Warszawskiego.

Badania przedkliniczne składały się z dwóch etapów i zostały przeprowadzone z zastosowaniem zasady podwójnie ślepej próby. Czterdziestu dwóch ogólnie zdrowych ochotników w wieku od 18 do 40 lat z zachowanym uzębieniem w odcinku przednim bez widocznych wypełnień oraz uzupełnień protetycznych zostało losowo podzielonych na trzy 14-osobowe grupy (dwie badane, które używały mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 lub *P. curdlanolyticus* MP-1 i jedną kontrolną). W pierwszym etapie dwie grupy badane płukały jamę ustną płukanką (2x po 1 min/ 3x/dobę) zawierającą enzym natomiast grupa kontrolna

używała placebo. W drugim etapie wszystkie trzy grupy używały placebo. Przed i po każdym etapie, u ochotników wykonywano profesjonalny zabieg oczyszczania zębów, tj. całkowite usunięcie płytki nazębnej i fluoryzację oraz zestaw badań kontrolnych. Na podstawie badania klinicznego zostały ocenione następujące wskaźniki: agregacji płytki nazębnej oznaczony metodą kolorymetryczną oraz Quigley Hein Indeks (QHI), krwawienia (BI) oraz stanu dziąseł i przyzębia (PSI). Ponadto, w celu oceny poziomu cytokin (IL-6 i IL-10) oraz miana flory bakteryjnej (*Streptococcus mutans* i *Lactobacillus*) pobrano od pacjentów próbki śliny. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła zauważyć następującą tendencję. W grupie stosującej mutanazę *T. harzianum* CCM F-340 zaobserwowano mniejszą akumulację płytki nazębnej ocenianej za pomocą wskaźnika QHI i metodą kolorymetryczną w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki ekspertyzy potwierdzają skuteczność tej mutanazy w hamowaniu agregacji biofilmu bakteryjnego na powierzchni zębów i dają nadzieję na jej potencjalne wykorzystanie w produktach higieny jamy ustnej. Jednak z uwagi na małą liczebność grup obserwowane różnice nie były znamienne statystycznie. Dlatego wskazane wydaje się kontynuowanie badań klinicznych nad preparatem grzybowej mutanazy na bardziej reprezentatywnej grupie pacjentów.

Możliwości wykorzystania mutanazy w praktyce stomatologicznej nie ograniczają się jedynie do usuwania płytki nazębnej, ale też innych biofilmów powstających w jamie ustnej, np. płytki protez (ang. *denture plaque*) gromadzącej się na ruchomych uzupełnieniach protetycznych. W tym celu, w doświadczeniach prowadzonych *in vitro*, przetestowano działanie trzech enzymów glukanolitycznych, mutanazy *T. harzianum* CCM F-340, bakteryjnej mutanazy z *P. curdlanolyticus* MP-1 oraz handlowego preparatu dekstranazy firmy Sigma-Aldrich [**Dental and Medical Problems, 2005**]. Specjalnie przygotowane płytki akrylowe, imitujące aparaty protetyczne, opłaszczano jałową śliną, a następnie osadzano na nich biofilm utworzony przez 9 gatunków bakterii izolowanych z jamy ustnej oraz jeden gatunek drożdży *C. albicans*. Płytki akrylowe pokryte biofilmem umieszczano na okres 12 godzin w roztworach buforowych zawierających mieszaniny poszczególnych mutanaz i dekstranazy lub mieszaninę wszystkich trzech enzymów. Kontrolę stanowiły płytki akrylowe zanurzone w samym buforze lub w wodzie z dodatkiem handlowego środka do czyszczenia ruchomych uzupełnień protetycznych (kontrola pozytywna). Działanie poszczególnych mutanaz (w tym mutanazy *T. harzianum* CCM F-340) w połączeniu z dekstraną spowodowało wyraźne naruszenie struktury biofilmu (mutan będący jego spoiwem został rozłożony), natomiast mieszanina wszystkich trzech enzymów zhydrolizowała mutan całkowicie (co obserwowano w postaci bardzo cienkiej warstwy osadu). Pozostałości biofilmu, które stanowiły przede wszystkim wolne komórki drobnoustrojów, można było łatwo usunąć przez delikatne splukanie płytek akrylowych wodą. Preparat handlowy, użyty w

badaniach jako kontrola pozytywna, był nieskuteczny, tzn. struktura mutanu w biofilmie po jego działaniu pozostała nienaruszona.

Zastosowanie mutanaz, charakteryzujących się selektywnym i łagodnym działaniem, w preparatach higieny jamy ustnej, jest rozwiązaniem biotechnologicznym będącym konkurencją dla innych metod. Ze wstępnego rozeznania wynika, że w naszym kraju istnieje duże zapotrzebowanie na tego typu preparaty, a szczególnie byłoby nimi zainteresowani producenci gum do żucia, płynów do płukania jamy ustnej, żeli stosowanych na dziąsła i past do zębów. Enzym może być także dodawany do płynów do mycia i przechowywania protez i aparatów nazębnych w celu usunięcia osadu mikrobiologicznego, który jest przyczyną uciążliwych zakażeń drożdżakowych. Preparatów takich nie ma jeszcze na polskim rynku, a w krajach zachodnich istnieją jedynie pojedyncze wzmianki na temat patentów receptur środków higieny jamy ustnej zawierających oprócz mutanazy pochodzącej z drożdży, dodatkowo inne enzymy. Wydaje się więc, że nadszedł odpowiedni moment na rozwinięcie tego typu badań w kraju, a uzyskane wyniki należałoby jak najszybciej praktycznie wykorzystać.

Najważniejsze wyniki badań związane z opisanym powyżej nurtem badawczym, zawarte w monotematycznym cyklu 14 oryginalnych prac eksperymentalnych:

- wyselekcjonowanie wysokowydajnego producenta grzybowej mutanazy - *Trichoderma harzianum* CCM F-340, którego aktywność enzymatyczna (ustalona w wyniku hodowlanych procedur optymalizacyjnych) jest obecnie najwyższą z opisanych w literaturze,
- otrzymanie mutanta, *T. harzianum* F-340-48 o ponad dwukrotnie wyższej aktywności mutanolitycznej w stosunku do kultury rodzicielskiej,
- opracowanie homo- i heterologicznych układów ekspresyjnych do nadprodukcji mutanazy,
- otrzymanie i scharakteryzowanie 76 strukturalnie zróżnicowanych mutanów, w tym czterech polimerów o unikatowej, nie opisanej dotychczas w literaturze strukturze chemicznej i właściwościach fizykochemicznych. Ponadto, użycie tych mutanów w charakterze induktorów mutanazy i wykazanie braku korelacji między produkcją enzymu a ilością wiązań α -(1 \rightarrow 3)-glukozydowych w cząsteczce biopolimeru, co świadczy o tym, że jej poziom zależy nie tylko od ilości wiązań, ale również od wielu innych czynników,

- zoptymalizowanie warunków dwustopniowej biosyntezy mutanu, wynikiem czego było 12-krotne, w porównaniu z danymi literaturowymi, zwiększenie produkcji tego polimeru,
- opracowanie wydajnej i zdecydowanie najtańszej, w stosunku do procedur dostępnych w literaturze przedmiotowej, metody izolacji α -(1→3)-glukanów ze ściany komórkowej żółciaka siarkowego,
- wykorzystanie po raz pierwszy do indukcji grzybowej mutanazy, bogatych w α -(1→3)-glukany, owocników i grzybni żółciaka siarkowego jako nowych, alternatywnych w stosunku do paciorkowcowego mutanu, źródeł induktora tego enzymu,
- opracowanie i zgłoszenie do opatentowania innowacyjnej technologii hodowli owocników żółciaka siarkowego (*L. sulphureus*) na sztucznym podłożu,
- wykorzystanie po raz pierwszy roślinnego α -glukanu izolowanego z owoców mango w charakterze nowego induktora mutanazy i ocena jego skuteczności w reakcji Real-Time RT-PCR,
- opracowanie innowacyjnej w skali Europy instrukcji technologicznej produkcji mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 w oparciu o częściowo oczyszczony materiał ściany komórkowej (CWP) z żółciaka siarkowego (Dokument „Know-How”, UMCS, Lublin) oraz procedur normalizacyjnych dla produkcji tego enzymu,
- oczyszczenie i określenie właściwości biochemicznych mutanazy *T. harzianum* CCM F-340 oraz genu kodującego ten enzym,
- ocena aktywności przeciwpróchnicznej mutanazy w badaniach *in vitro*: z użyciem sztucznej płytki nazębnej osadzonej na krążkach szklanych w bioreaktorze do hodowli biofilmów w warunkach stresu wywołanego przez siły ścinające, symulujące warunki panujące w jamie ustnej; oraz biofilmów osadzonych na płytkach akrylowych, imitujących aparaty protetyczne,
- przeprowadzenie badań przedklinicznych i pozytywne zweryfikowanie hipotezy o hamowaniu agregacji płytki nazębnej na powierzchni zębów u ludzi przez mutanazę *T. harzianum* CCM F-340 dostarczaną do jamy ustnej w postaci płukanki.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałem, 1 października 2002 roku, zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej UMCS, w którym pracuję do dnia dzisiejszego. Głównym przedmiotem moich zainteresowań w tym okresie, była

kontynuacja pionierskich badań nad grzybowymi mutanazami, które opisałem w punkcie 4. Równocześnie jednak poszukiwałem nowych tematów badawczych, do których należą:

a) Charakterystyka strukturalna grzybowych α -(1→3)-glukanów oraz ocena aktywności biologicznej ich karboksymetylowanych pochodnych

Od wielu lat dużo uwagi poświęca się badaniom grzybów jako rezerwuaru substancji przeciwnowotworowych i immunomodulujących. Właściwości te potwierdzono już dla wielu polisacharydów izolowanych z grzybów, szczególnie β -(1→3)- i β -(1→6)-glukanów. Jak dotąd, najmniej poznaną i przebadaną grupę polisacharydów grzybowych stanowią α -(1→3)-glukany. Poza doniesieniami dotyczącymi ich wykorzystania jako induktorów syntezy mutanazy, piśmiennictwo z zakresu oceny potencjału przeciwnowotworowego α -(1→3)-glukanów to zaledwie kilka pozycji. Dlatego, we współpracy z Zakładem Wirusologii i Immunologii oraz Zakładem Genetyki i Mikrobiologii UMCS i Katedrą Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, oceniono możliwość zastosowania karboksymetylowanych pochodnych α -(1→3)-glukanów jako potencjalnych leków w terapii przeciwnowotworowej.

W ramach przeprowadzonych badań wyizolowywano, oczyszczono i określono strukturę oraz podstawowe właściwości fizyko-chemiczne α -(1→3)-glukanów z wybranych owocników grzybów hodowlanych (*Laetiporus sulphureus*, *Piptoporus betulinus*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. erynii*, *P. precoce*) oraz grzybni vegetatywnej grzybów z rodzaju *Aspergillus* (*A. niger*, *A. wentii*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*). W celu zwiększenia reaktywności, nierozpuszczalne w wodzie α -glukany przeprowadzono, w wyniku karboksymetylacji, w formy rozpuszczalne. Następnie, w oparciu o metody MTT (aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej), NR (wchłanianie czerwieni obojętnej), DPPH (zmiatanie wolnych rodników tlenowych) oraz barwienia fluorescencyjnego z użyciem mieszaniny bromku etydyny (BE) z oranżem akrydyny (OA), Hoechst 33342 (H) z jodkiem propidyny (JP) oraz barwienia z rodaminą-falloidyną oceniono wpływ karboksymetylo- α -(1→3)-glukanów na żywotność i proliferację komórek prawidłowych: CCD 841 CoTr (komórki nabłonkowe jelita), CCD-18Co (fibroblasty jelita) i HSF (Human Skin Fibroblasts), oraz komórek nowotworowych: HeLa (rak szyjki macicy) i Jurkat klon E6-1 (ludzkie limfocyty T linii białaczkowej). W większości przypadków, badane polisacharydy powodowały spadek intensywności metabolizmu, zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych, natomiast nie uszkadzały błony tych komórek oraz nie powodowały zmiatania wolnych rodników tlenowych. Przeprowadzone badania były tematem 5 doniesień konferencyjnych oraz zostały częściowo opublikowane:

- **Wiater, A.**, Paduch, R., Pleszczyńska, M., Próchniak, K., Choma, A., Kandefer-Szerszeń, M., Szczodrak, J., 2011: α -(1→3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnology Letters*. 33, 787-795.
- **Wiater, A.**, Paduch, R., Choma, A., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Dominik, J., Janusz, G., Tomczyk, M., Szczodrak, J., 2012: Biological study on carboxymethylated (1→3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51, 1014-1023.

b) Charakterystyka fitochemiczna i ocena aktywności przeciwpróchnicznej ekstraktów z wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla*

Okres po obronie pracy doktorskiej to czas kiedy poszukiwałem również nowych, innych niż enzymy glukanolityczne, źródeł i sposobów zapobiegania próchnicy zębów. Zainteresowałem się wówczas naturalnymi ekstraktami roślinnymi, które jak wynikało z literatury przedmiotowej działają poprzez redukcję istniejącej płytki nazębnej oraz chronią przed powstawaniem nowej. Ponadto, potwierdzono bezpośredni wpływ wyciągów roślinnych na główne czynniki wirulencji tj. wzrost bakterii próchnicotwórczych, aktywność glukozylotransferaz (GTF-az) odpowiedzialnych za syntezę glukanów płytki nazębnej oraz produkcję kwasu mlekowego.

Badania rozpoczęto od skringingu wybranych surowców zielarskich (ziele jemioli, skrzypu, glistnika, macierzanki i tymianku, liść pokrzywy, porzeczeki czarnej, orzecha włoskiego, szalwii i mięty pieprzowej, kłącze pięciornika i tataraku, korzeń mydlnicy lekarskiej, prawoślazu lekarskiego i Żeń-szenia, kora dębu, owoc dzikiej róży) w kierunku hamowania aktywności GTF-az paciorkowców zmiennych (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* i *S. sobrinus/downei*). Spośród badanych surowców najsilniejszym inhibitorem aktywności GTF-az okazał się wyciąg z kłącza pięciornika kurze ziele (*Potentilla erecta*). Związki zawarte w ekstrakcie silnie hamowały ogólną aktywność GTF-az, aktywność enzymów syntetyzujących nierozpuszczalny w wodzie mutan oraz redukowały przyczepność tego glukanu do twardych powierzchni. Wyniki tych badań skłoniły nas do nawiązania współpracy z Zakładem Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, który jest znanym w Polsce ośrodkiem specjalizującym się w badaniach fitochemicznych roślin z rodzaju *Potentilla*. Współpraca zaowocowała otrzymaniem grantu zespołowego MNiSW (Nr N N405 621638, 2009-2013) pt. „Badania fitochemiczne wybranych gatunków z rodzaju *Potentilla* L. oraz ocena ich aktywności przeciwpróchnicznej”, którego jestem głównym wykonawcą.

W ramach realizowanego projektu przebadano dwanaście gatunków roślin z rodzaju *Potentilla*, określając skład fitochemiczny oraz właściwości przeciwpróchnicze ich wodnych ekstraktów. W przypadku *P. recta* i *P. rupestris* scharakteryzowano również ekstrakty przygotowane z użyciem 50% etanolu, eteru dietylowego, octanu etylu i *n*-butanolu. Stwierdzono, że wszystkie ekstrakty skutecznie ograniczały syntezę nierozpuszczalnych w wodzie glukanów (mutanów) i tworzenie się biofilmu bakteryjnego *in vitro*. Natomiast jedynie wodny ekstrakt z *P. fruticosa*, który zawierał najwięcej związków polifenolowych (116,3 mg/g s.m.), wykazywał szczególnie silne hamowanie wzrostu *Streptococcus* spp (MIC i MBC – 3,2 mg/ml). Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakty z *Potentilla*, a szczególnie z *P. fruticosa*, mogą stać się nowym użytecznym źródłem związków aktywnych w profilaktyce próchnicy zębów. Rezultaty w/w badań opublikowano w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym:

- Pleszczyńska, M., **Wiater, A.**, Szczodrak, J., Bachanek, T., 2003: Poszukiwanie naturalnych inhibitorów aktywności glukozylotransferaz paciorkowców zmiennych. *Nowa Stomatologia*. 26, 163-168.
- **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., Próchniak, K., Szczodrak, J., 2008: Anticariogenic activity of the crude ethanolic extract of *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. *Herba Polonica*. 54 (2), 41-45.
- Tomczyk, M., Pleszczyńska, M., **Wiater, A.**, 2010: Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity. *Molecules*. 15, 4639-4651.
- Tomczyk, M., **Wiater, A.**, Pleszczyńska, M., 2011: *In vitro* Anticariogenic Effects of aerial parts of *Potentilla recta* and its phytochemical profile. *Phytotherapy Research*. 25, 343-350.

c) Badania nad mutanazą bakteryjną z *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1

Równolegle z badaniami nad mutanazą z *Trichoderma harzianum* CCM F-340, które stanowiły podstawę prezentowanego osiągnięcia, uczestniczyłem również w pracach dotyczących szeroko zakrojonej selekcji drobnoustrojów dla pozyskania nowych szczepów zdolnych do rozkładu paciorkowcowego mutanu. W celu izolacji ze środowiska naturalnego (50 próbek gleby zebranych w 15 regionach świata) mikroorganizmów wytwarzających pozakomórkowo mutanazę zastosowano kompleksowe metody przesiewowe obejmujące pobranie próbek, hodowle wzbogacające, testy selekcyjne i hodowlane oraz identyfikację taksonomiczną (testy API oraz sekwencjonowanie fragmentu 16S rRNA) wybranych kultur. Efektem skriningu było wyselekcjonowanie kilkudziesięciu kultur wykazujących aktywność

mutanolityczną. W Polsce jesteśmy obecnie jedynymi, a na świecie należymy do nielicznych posiadaczy tak bogatej kolekcji drobnoustrojów wytwarzających mutanazy. Szczególną uwagę poświęciliśmy jednak wysokowydajnemu szczepowi *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1, który po wstępnej charakterystyce zdeponowano w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS w Warszawie pod numerem KKP 2017 p. Szczep ten stanowi nowe, nie opisane dotychczas w literaturze źródło endomutanazy bakteryjnej.

Dalsze badania nad mutanazą z *P. curdlanolyticus* MP-1 wykonywano już w ramach wysokonakładowego projektu badawczego Nr KB/46/13110/IT1-B/U/08 pt. „Opracowanie technologii produkcji preparatów enzymatycznych efektywnych w profilaktyce próchnicy zębów i oczyszczaniu protez zębowych u ludzi oraz utrzymaniu właściwej higieny jamy ustnej u zwierząt”, zarządzanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju i realizowanego w ramach przedsięwzięcia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Inicjatywa Technologiczna I), którego byłem głównym wykonawcą. W ramach projektu przeprowadzono optymalizację hodowli *P. curdlanolyticus* oraz opracowano nowy sposób wytwarzania bakteryjnej mutanazy w oparciu o alternatywny do paciorkowcowego mutanu, tani i bezpieczny α -(1→3)-glukan, pochodzący z żółciaka siarkowego; oczyszczono i opisano właściwości biochemiczne tego enzymu; zidentyfikowano gen mutanazy z *P. curdlanolyticus*, sklonowano w *E. coli* oraz scharakteryzowano rekombinowany enzym; oceniono efektywność działania badanej glukanazy na mutan oraz jej skuteczność przeciwpróchniczą *in vitro* oraz *in vivo* w badaniach przedklinicznych na ludziach. Wyniki w/w badań stały się podstawą do opracowania 3 zgłoszeń patentowych, 12 doniesień konferencyjnych oraz zostały opisane w 5 publikacjach o zasięgu międzynarodowym:

- Pleszczyńska, M., Marek-Kozaczuk, M., **Wiater A.**, Szczodrak, J., 2007: *Paenibacillus* strain MP-1: a new source of mutanase. *Biotechnology Letters*. 29, 755-759.
- Pleszczyńska, M., **Wiater, A.**, Szczodrak, J., 2008: Methods for obtaining active mutanase preparations from *Paenibacillus curdlanolyticus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 38, 389-396.
- Pleszczyńska, M., **Wiater, A.**, Szczodrak, J., 2010: Mutanase from *Paenibacillus* sp. MP-1 produced inductively by fungal α -1,3-glucan and its potential for the degradation of mutan and *Streptococcus mutans* biofilm. *Biotechnology Letters*. 32, 1699–1704.
- Pleszczyńska, M., **Wiater, A.**, Skowronek, M., Szczodrak, J., 2012: Purification and characterization of mutanase produced by *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 42, 335-347.
- Pleszczyńska, M., Boguszewska, A., Tchórzewski, M., **Wiater, A.**, Szczodrak, J., 2012: Gene cloning, expression, and characterization of mutanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1. *Protein Expression and Purification*. 86, 68-74.

Plany na przyszłość

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące komercjalizacji mutanazy *T. harzianum* CCM F-340. Szczególnie, że enzym ten nie figuruje jeszcze w ofercie żadnej z firm biotechnologicznych na świecie i poza potencjalnym zastosowaniem (jako substancja aktywna) w środkach higieny jamy ustnej, może być użyty jako odczynnik chemiczny. Mutanaza hydrolizuje α -(1→3)-glukany w jamie ustnej, ale również występujące w ścianie komórkowej grzybów. Dlatego może stać się użytecznym narzędziem do otrzymywania protoplastów grzybowych (wykorzystywanych, m.in. w badaniach genetycznych), do badania struktury polisacharydów (biologia i chemia), jako biopreparat dla rolnictwa (zwalczanie fitopatogenów grzybowych), a także środek do zwalczania próchnicy i odoru z jamy ustnej psów i kotów. W swoich badaniach, zamierzam również poświęcić uwagę potencjalnemu użyciu mutanazy do usuwania biofilmów tworzonych w płucach przez kolonizującego drogi oddechowe grzyba *Aspergillus fumigatus*.

Planuję również, kontynuowanie badań związanych z charakterystyką grzybowych α -(1→3)-glukanów i wykorzystaniem ich rozpuszczalnych w wodzie pochodnych do badania odpowiedzi immunologicznej, prawidłowych i nowotworowych komórek wybranych odcinków układu pokarmowego. Ponadto, jestem obecnie zaangażowany w badania dotyczące oceny odpowiedzi immunologicznej barciaka większego (*Galleria mellonella*) na α - i β -glukany grzybowe.

Witold Adam