



Charakterystyka bakterii rodzaju *Thermus* i ich przydatność w biotechnologii

Izabela Sinkiewicz, Józef Synowiecki

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Characterization of bacteria of the genus *Thermus* and their biotechnological importance

Summary

Gram-negative, aerobic bacteria of the genus *Thermus* which have been isolated from many natural and artificial, thermal environments are used as a source of thermostable restriction nucleases and DNA polymerase, as well as can be exploited for the production of many other enzymes with a great industrial importance. The strains belonging to the genus *Thermus* utilize carbohydrates, amino acids, carboxylic acids and peptides and their optimal growth temperatures ranged from 55 to 85°C. This review is focused on the adaptation of *Thermus* strains to thermostability and on characterisation and possible application of their enzymes.

Key words:

genus *Thermus*, thermozymes, thermophiles, peptydoglycan, glycosidases, trehaloze synthase.

Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,
Katedra Chemii,
Technologii
i Biotechnologii Żywności,
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska,
ul. Gabriela Narutowicza
11/12,
80-952 Gdańsk;
e-mail:
synowiec@chem.pg.pga.pl

1. Wstęp

Rozwój technologii enzymatycznych jest przyczyną poszukiwania nowych biokatalizatorów o właściwościach zapewniających zwiększenie wydajności oraz udoskonalenie wykorzystywanych aktualnie procesów lub umożliwiających zastosowanie nowych sposobów przetwarzania surowców. Niezbędne do tych celów enzymy o unikatowych niekiedy właściwościach można uzyskać z mało dotychczas zbadanych drobnoustrojów żyjących

w ekstremalnych warunkach środowiska (1). Jednakże, pomimo dużych nakładów pracy i poniesionych kosztów enzymy z ekstremofili znalazły do tej pory niewiele praktycznych zastosowań, między innymi ze względu na niewystarczający niekiedy postęp badań w tym zakresie.

Wśród ekstremofili drobnoustroje termofilne i ich enzymy, nazywane niekiedy termozymami wzbudzają zainteresowanie ze względu na dużą stabilność umożliwiającą prowadzenie reakcji w podwyższonej temperaturze. Skutkiem tego jest poprawa szybkości i wydajności reakcji, zwiększenie rozpuszczalności niektórych substratów oraz ograniczenie lub nawet wyeliminowanie możliwości zanieczyszczenia środowiska reakcji niepożądanymi drobnoustrojami rosnącymi niekiedy w dużych fermentorach i reaktorach przepływowych z unieruchomionym enzymem (2,3). Zaletą podwyższenia temperatury procesu jest też możliwość zwiększenia stężenia i obniżenia lepkości roztworów substratu. Przy użyciu takich enzymów należy się jednak liczyć ze wzrostem kosztu energii zużytej na prowadzenie procesu w podwyższonej temperaturze (4).

2. Występowanie bakterii rodzaju *Thermus*

Mało dotychczas wykorzystywanym źródłem termostabilnych enzymów są bakterie rodzaju *Thermus*, wyizolowane z obojętnych lub alkalicznych gorących źródeł i głębinowych, hydrotermalnych środowisk, jak również ze sztucznych zbiorników wodnych. Wiele szczepów uzyskano z Narodowego Parku Yellowstone (USA) i Nowej Zelandii, znaleziono je też w Japonii, w gorących, płytkich wodach Islandii, Kenii, na Azorach oraz na terenach rzecznych Portugalii, Wielkiej Brytanii, Rosji, Tajlandii i Czech. Szczepy *Thermus ruber* o optymalnej temperaturze rozwoju 60°C występują m. in. w gorących źródłach Kamczatki i Islandii (5).

Pierwszy gatunek rodzaju *Thermus*, który nazwano *Thermus aquaticus* odkryli w 1969 r. Brock i Freeze, w gorących źródłach Narodowego Parku Yellowstone w USA (6). Dwa lata później Oshima i Imahori wyizolowali bakterie *Thermus thermophilus* HB8 (7). Szczepy z gatunku *Thermus filiformis* pochodzą z Nowej Zelandii (8), natomiast *Thermus scotoductus* znaleziono najpierw w gorących, zawierających związki siarki źródłach Islandii (9). Bakterie należące do rodzaju *Thermus* są też często spotykane w obojętnych środowiskach wodnych o podwyższonej temperaturze, jak np. ciepła woda wodociągowa, przemysłowe systemy wodne i gorące ścieki.

3. Morfologia

Gatunki z rodzaju *Thermus* są gramujemnymi, bakteriami tlenowymi, które nie wytwarzają przetrwalników i nie mają zdolności poruszania się, bo nie posiadają rzęsek. Większość gatunków tworzy kolonie żółte, czerwone, pomarańczowe lub niekiedy



różowe, ale w miejscach pozbawionych światła można też spotkać szczepy rosnące w postaci bezbarwnych bądź brązowych kolonii. Charakterystykę niektórych gatunków tego rodzaju zamieszczono w tabeli. Barwa poszczególnych gatunków zależy od ich pochodzenia i dostępności światła. Bakterie *Thermus scotoductus* znalezione w Selfoss na Islandii, jak też w gorących ściekach w USA, odznaczają się brakiem pigmentu, podczas gdy inne szczepy tego drobnoustroju, mają brązowe zabarwienie (10). Bakterie rodzaju *Thermus* są pałeczkami o średnicy od 0,5 do 0,8 μm i długości 5-10 μm . Wyizolowane z naturalnych środowisk przybierają formę dość długich filamentów utworzonych przez połączenie pojedynczych komórek. Po przeniesieniu do pożywki, tendencja do tworzenia długich włókien zanika i bakterie występują jako pojedyncze komórki lub łączą się w krótkie włókniste agregaty (6). W starszych hodowlach znajdują się niekiedy kuliste agregaty (ang. *rotund bodies*) o średnicy 10-20 μm , zawierające kilka komórek otoczonych wspólną zewnętrzną błoną. Możliwość formowania takich struktur wykazują około 70% zbadanych dotychczas gatunków *Thermus* (6).

Tabela

Charakterystyka niektórych bakterii rodzaju *Thermus*

Cecha	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus filiformis</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermis ruber</i>	<i>Thermus silvanus</i>
barwa kolonii	żółta	żółta	ciemnożółta	czerwona	pomarańczowa
kształt komórek	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki
średnica komórek (μm)	0,5-0,8	0,5-0,8	0,5-0,8	0,5-0,8	0,5-0,8
rzęski	-	-	-	-	-
ruchliwość	-	-	-	-	-
ściana komórkowa	+	+	+	+	+
zakres temperatur wzrostu ($^{\circ}\text{C}$)	40-79	37-80	55-85	50-65	40-65
optymalna temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	70-72	73-74	70-75	55-60	54-55
zakres pH wzrostu	6,0-9,5	6,0-8,6	nie oznacz.	nie oznacz.	5,0-10
optymalne pH wzrostu	7,5-7,8	7,0-7,5	7,2	8,0	8,0-8,5
redukcja azotanów	-	-	+	+	-
hydroliza:					
arbutyny	-	+	+	+	-
elastyny	+	-	+	+	+
kazeiny	+	-	-	-	+
źródła literaturowe	(6)	(8)	(5)	(76)	(77)

Na podstawie analizy podobieństw sekwencji 16S rRNA doprowadzono do podziału gatunków zaliczonych do rodzaju *Thermus* na dwie grupy. Do jednej z nich (zachowującej nazwę *Thermus*) należą obecnie drobnoustroje charakteryzujące się optymalnymi temperaturami wzrostu w granicach 65-80 $^{\circ}\text{C}$, drugą grupę tworzą na-

tomiast zabarwione na czerwono i rozwijające się najlepiej w temp. 50-65°C bakterie *Thermus ruber*, *Thermus silvanus* i *Thermus chliarophilus*, które zaklasyfikowano do nowo utworzonego rodzaju *Meiothermus* (11).

4. Sposoby odżywiania i warunki wzrostu

Bakterie *Thermus* spp. różnią się znacznie optymalną temperaturą (55-85°C) i pH (6,5-10) wzrostu (tab.). Gatunki bytujące w temp. przekraczającej 70°C mają żółte zabarwienie kolonii, natomiast gatunki o optymalnej temperaturze wzrostu około 60°C wyróżniają się różowym lub pomarańczowym zabarwieniem (12). Kilka gatunków *Thermus* rozwija się najlepiej w 70-75°C przy pH 7,0-7,8. Wyjątek stanowi *Thermus thermophilus*, który zachowuje zdolność do wzrostu nawet w 80-85°C (5). Obniżenie temperatury do około 37°C prawie całkowicie hamuje wzrost bakterii rodzaju *Thermus* (30). Większość bakterii *Thermus* spp. pochodzi ze źródeł alkalicznych, przy czym optymalne pH ich wzrostu wynosi około 7,5 (13,14).

Drobnoustroje *Thermus* są zaliczane do ściśle tlenowych chemoorganotrofów korzystających w naturalnym środowisku z substancji organicznych wytwarzanych przez inne mikroorganizmy. W ostatnich latach odkryto bakterie *Thermus scotoductus* utleniające tiosiarczany do siarczanów (VI) i z tego powodu zaklasyfikowano je do fakultatywnych miksotrofów (12,15). Pomimo że bakterie rodzaju *Thermus* są tlenowcami to niektóre ekstremalnie termofilne gatunki mogą rosnąć bez dostępu tlenu, dzięki zdolności do przenoszenia elektronów na znajdujące się w podłożu jony azotanowe lub siarczanowe. Cechy tej nie posiada *Thermus aquaticus*, *Thermus filiformis* i inne gatunki nie redukujące azotanów (V) do azotanów (III) (16).

Źródłem węgla w hodowli *Thermus* spp. może być glukoza, sacharoza, maltoza oraz octany, cytryniany i bursztyniany, a źródłem azotu sole amonowe, pepton lub ekstrakt drożdżowy. Wymagania pokarmowe poszczególnych gatunków są zróżnicowane, ale wiele z nich dobrze przyswaja elastynę, fibrynę, kazeinę, żelatynę oraz prolinę i kwas glutaminowy. Przy nadmiernej zawartości substancji organicznych w pożywce następuje zahamowanie ich wzrostu (17). Procesy metaboliczne szczepów *Thermus* są podobne jak u innych drobnoustrojów tlenowych i składają się m. in. z cyklu kwasów trikarboksylowych. W przypadku dostępności w pożywce soli kwasów karboksylowych, niektórych aminokwasów lub innych substancji katabolizowanych do octanu wykorzystywany jest też cykl gliksalowy przebiegający z udziałem liazy izocytrynianowej i dehydrogenazy NADH (18).

Szczepy *Thermus* można przechowywać przez wiele lat w temp. -80°C lub w ciekłym azocie, w podłożu zawierającym 10-15% glicerolu. Komórki liofilizowane mogą być przechowywane przez 18 lat, a umieszczone na podłożu z agarem przeżywają około miesiąca w temp. 4°C (5). Podczas hodowli istotne jest dobre napowietrzanie podłoża ze względu na obniżenie rozpuszczalności tlenu w podwyższonej temperaturze wzrostu tych drobnoustrojów.



5. Budowa struktur powierzchniowych

Gatunki *Thermus* mogą żyć w biotopach o podwyższonej temperaturze m. in. dzięki zwiększonej odporności cieplnej struktur powierzchniowych. Ściana komórkowa *Thermus* spp. ma wielowarstwową strukturę o cechach wspólnych dla bakterii gramdodatnich i gramujemnych (19). Podobnie jak u gramujemnych drobnoustrojów do błony cytoplazmatycznej przylega cieńsza w porównaniu z bakteriami gramdodatnimi warstwa peptydoglikanu (mureiny) zbudowanego z naprzemianlegle ułożonych reszt N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego. Częsteczki mureiny są usieciowane mostkami utworzonymi z udziałem reszt glicyny lub ornityny występujących w tetrapeptydach przyłączonych do kwasu N-acetylmuraminowego. Peptydoglikan wszystkich gatunków *Thermus* zawiera ornitynę zamiast kwasu diaminopimelinowego występującego u gramujemnych drobnoustrojów i jest pod tym względem podobny do mureiny gramdodatnich bakterii z rodzaju *Deinococcus* (19).

Błona zewnętrzna otoczona białkową warstwą S (ang. *surface crystalline layer*) jest wrażliwa na działanie EDTA i zawiera glikofosfolipid i dwa rodzaje glikolipidów zamiast lipopolisacharydu (LPS) występującego u innych gramujemnych bakterii (20). Pod nią znajduje się obszar o strukturze amorficznego żelu pełniący funkcję przestrzeni peryplazmatycznej (20). Warstwa S o regularnej, pseudokrystalicznej budowie, zróżnicowanej w zależności od gatunku i szczepu *Thermus* łączy się bezpośrednio z peptydoglikanem za pośrednictwem tzw. domen SLH, przenikających przestrzeń peryplazmatyczną (20). Występujące w ścianie komórkowej glikolipidy zawierają zamiast glicerolu długołańcuchowe alkilodiole (21). Zmiana ta jest przypuszczalnie jedną z przyczyn zwiększonej odporności struktur powierzchniowych na działanie podwyższonej temperatury.

Warstwa S u *Thermus thermophilus* zawiera identyczne podjednostki białkowe o masie cząsteczkowej około 100 kDa (22,23). Są one stabilizowane jonami wapnia oraz wiązaniami wodorowymi i oddziaływaniami hydrofobowymi, uzyskując wskutek tego dużą termostabilność. Składnikiem mureiny *Thermus thermophilus* HB8 niespotykanym u szczepu HB27 jest fenylooctan, którego funkcja nie została do tej pory jednoznacznie wyjaśniona. Przypuszcza się, że aryłowe grupy fenylooctanu intensyfikują oddziaływania hydrofobowe peptydoglikanu z warstwą S (6). Budowa ściany komórkowej determinuje charakterystyczny dla bakterii gramdodatnich brak odporności *Thermus* spp. na działanie penicyliny i niektórych innych antybiotyków (24).

Zwiększenie stabilności cieplnej błony cytoplazmatycznej u *Thermus* spp. zapewniają lipidy zawierające rozgałęzione, nasycone kwasy tłuszczowe, wśród których w największej ilości występują kwasy pentadekanowy (*iso*-C15) oraz heptadekanowy (*iso*-C17). Zawartość kwasu heptadekanowego w lipidach zwiększa się w wyższej temperaturze wzrostu mikroorganizmu i maleje w przypadku tych gatunków, które należą do umiarkowanych termofili (21). Po przekroczeniu optymalnej temperatury



hodowli następuje wzrost zawartości lipidów, która w poszczególnych szczepach mieści się w granicach 8-12% suchej masy komórek.

Dominującymi składnikami frakcji polarnych lipidów są: glikolipid [diacylodiglikozylo-(N-acetylo)-glikozoaminylo-glikozylo-glicerol] o zmiennej w różnych gatunkach zawartości glukozy, galaktozy, glukozaminy i galaktozaminy oraz fosfolipid zawierający glukozoaminę (25). W błonie cytoplazmatycznej zgromadzone są karotenoidy pełniące funkcję fotoprotektorów zabezpieczających błonę przed zmianami oksydacyjnymi inicjowanymi naświetleniem (5). Występowanie tych substancji jest przyczyną zróżnicowanego zabarwienia kolonii gatunków *Thermus*, zależnego od rodzaju i zawartości karotenoidów.

6. Porównanie genomów *Thermus thermophilus* HB8 i HB27

Obecnie znane są sekwencje nukleotydowe materiału genetycznego szczepów: *Thermus thermophilus* HB8 i HB27. Na podstawie ich analizy potwierdzono przydatność wymienionych drobnoustrojów jako źródła termostabilnych proteaz, hydrolaz glikozydów, esteraz, lipaz, dehydrogenaz, a także innych użytecznych substancji, np. witaminy B12 lub karotenoidów (26). Genomy szczepu HB8 są złożone z nukleoidu zawierającego 1973 geny i megaplazmidu w którym znajduje się 251 genów (27). Szczep HB27 różni się wielkością nukleoidu (1988 genów) oraz megaplazmidu (230 genów) i ma nie występujący u HB8 drugi plazmid o wielkości 9322 par zasad. Megaplazmid szczepu HB8 zawiera około 257 tys. p.z. jest o ponad 25 tys. p.z. większy od megaplazmidu pochodzącego z HB27 (27). Podwyższenie temperatury topnienia helisy DNA u szczepów HB8 i HB27, zachowujących zdolność wzrostu do około 85°C, zapewnia wynoszący 69,4% udział par G+C (28).

Do tej pory nie udało się określić funkcji około 40% sekwencji nukleotydowych u szczepów HB8 i HB27 i prowadzone są dalsze badania w tym zakresie. Geny odpowiedzialne za adaptację *Thermus thermophilus* do życia w podwyższonej temperaturze występują na megaplazmidzie. Znajdują się tam powtórzenia sekwencji kodujących mechanizmy naprawcze DNA, m. in. chaperonów i białek SSB (ang. *Single Stranded DNA Binding Proteins*), stabilizujących strukturę kwasów nukleinowych oraz nukleaz, ligaz i polimeraz likwidujących uszkodzenia ich cząsteczek. Megaplazmid obu szczepów zawiera też gen specyficznej endonukleazy usuwającej uszkodzenia DNA spowodowane wpływem promieniowania UV, które inicjuje tworzenie się dimerów zasad pirymidynowych (27). Jego sekwencja nukleotydowa wykazuje znaczny poziom identyczności z homologicznym genem znajdującym się w *Deinococcus radiodurans*. Występujące u obu szczepów mechanizmy naprawcze nie są identyczne. Jedną z różnic jest stwierdzona u *Thermus thermophilus* HB27 delekcja części genu kodującego odwrotną gyrazę (ang. *reverse gyrase*), która wskutek wprowadzania dodatknych superskręceń zwiększa odporność cieplną helisy DNA (29). Brak aktywnej formy tego enzymu nie skutkuje jednak obniżeniem temperatury wzrostu HB27.



Na megaplazmidach znajdują się też zgrupowania genów odpowiedzialnych za katabolizm węglowodanów (27). Geny poszczególnych enzymów niektórych szlaków metabolicznych *Thermus thermophilus* są rozproszone. Przykładem jest synteza karotenoidów, których prekursorzy są wytwarzane z udziałem biokatalizatorów kodowanych chromosomalnym DNA, a gen enzymu katalizującego końcowy etap szlaku jest zlokalizowany na megaplazmidzie (27). W badanym genomie *Thermus thermophilus* HB8 nie zidentyfikowano genu reduktazy azotanowej, pomimo stwierdzonej u tego szczepu zdolności do przyswajania azotanów (30). Świadczy to o łatwej delecji tego genu, zainicjowanej np. warunkami wzrostu mikroorganizmu. Materiał chromosomowy szczepu HB27 zawiera natomiast geny odpowiedzialne za przyswajanie związków siarki w warunkach beztlenowego wzrostu. Na podstawie analizy genomu wykazano występowanie sekwencji kodującej reduktazę tiosiarcznanową o dużej identyczności z enzymem pochodzącym z *Salmonella* sp. (31).

7. Niektóre sposoby adaptacji do wzrostu w podwyższonej temperaturze

Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że mechanizmy umożliwiające życie bakterii *Thermus* w podwyższonej temperaturze są zróżnicowane i zależą od gatunku mikroorganizmu oraz od temperatury jego wzrostu (32). Nie wiadomo jeszcze dokładnie, które ze znanych już sposobów zapewnienia termostabilności białek występują w poszczególnych gatunkach *Thermus*. Częściczki dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego z *Thermus aquaticus* są np. stabilizowane zwiększoną w porównaniu z analogicznymi enzymami mezofili liczebnością wiązań wodorowych i oddziaływań jonowych, zmniejszeniem powierzchni cząsteczek wskutek wzrostu stopnia ich upakowania oraz występowania mostków solnych wzmacniających wiązania pomiędzy podjednostkami białka (33).

Badania β -glikozydazy z *Thermus nonproteolyticus* HG102 o optymalnej aktywności w temp. 90°C wykazały natomiast, że termostabilność tego enzymu zapewnia wzrost zawartości proliny w pętlach struktury α/β , zwiększenie udziału par jonowych tworzonych z udziałem argininy, zmniejszenie liczebności termolabilnych reszt asparaginy, glutaminy i metioniny oraz stabilizacja α -helisy za pomocą alaniny (34). Enzym ten jest białkiem monomerycznym w przeciwieństwie do β -glikozydaz pochodzących z mezofili, które są dimerami (34).

Centra aktywne termostabilnych enzymów mają zazwyczaj zakonserwowaną budowę. Jednym z wyjątków jest katalaza występująca u *Thermus thermophilus* zawierająca zamiast żelaza jony manganu umiejscowione pomiędzy czterema grupami prostetycznymi (35).

Oprócz zwiększenia termostabilności enzymów i innych białek, istotne jest zabezpieczenie transkrypcji, translacji i szlaków metabolicznych przed dezorganizacją spowodowaną podwyższeniem temperatury. Przyczyną wzrostu termostabilności tRNA jest np. zwiększenie ilości par G+C, stabilizowanie jego struktury oddziaływa-

niami jonowymi wytworzonymi z udziałem Mg^{2+} oraz zastąpienie tymidyny 5-metylo-2-tiourydyną (36). Duże znaczenie ma synteza chaperonów i innych substancji ochronnych. Jednym z białek Hsp (ang. *Heat shock proteins*), wytwarzanym przez *Thermus thermophilus* HB8 jest aktywowana ATP proteaza serynowa degradująca zde-naturowane białka (37). Enzym ten jest kodowany sekwencjami nukleotydowymi podobnymi jak w genomach innych gatunków *Thermus*. Zwiększenie stabilności cieplnej rybosomów i innych cząsteczek zapewnia m. in. spermina i termina. Termina jest poliaminą charakterystyczną dla ekstremalnie termofilnych *Thermus* spp. i różniącą się od sperminy brakiem jednej grupy metylenowej (36).

Oprócz poliamin i chaperonów funkcję stabilizatora cząsteczek w komórkach *Thermus* spełnia też przypuszczalnie trehaloza (1- α -D-glukopiranozylo-1,1- α -D-glukopiranozyd), bowiem występowanie syntazy trehalozy (EC 5.4.99.16) stwierdzono zarówno w przypadku *Thermus thermophilus* HB-8, jak też w *Meiothermus ruber* należącym do umiarkowanych termofili (38,39). Wymieniony disacharyd ma zdolność „uszczelniania” i zabezpieczania błon biologicznych, chroni lipidy przed utlenianiem oraz stabilizuje wiązania wodorowe utrzymujące strukturę białek (40,41).

Jednym z dotychczas zbadanych sposobów przystosowania szlaków metabolicznych *Thermus* spp. do podwyższonej temperatury jest modyfikacja cytochromów oraz zastąpienie koenzymu Q menachinonem, będącym pochodną chinonu różniącą się od koenzymu Q długością łańcucha izoprenowego (42). Uczestniczący w końcowym etapie transportu elektronów podczas reakcji hydroksylacji cytochrom P450 z *Thermus thermophilus* HB27 ma o 30°C wyższą temperaturę cieplnej degradacji od analogicznego białka znajdującego się w mezofilach (43). Jego cząsteczki zawierają 17 α -helis oraz 11 domen o strukturze β -kartki i znajduje się w nich hem związany za pośrednictwem reszt cysteiny. Przyczyną podwyższonej termostabilności tego białka jest m. in. skrócenie pętli łączących α -helisy, wyeliminowanie niektórych termolabilnych reszt asparaginy, glutaminy i cysteiny, wzrost ilości mostków solnych i par jonowych oraz zmniejszenie wielkości cząsteczek (43).

8. Znaczenie biotechnologiczne bakterii rodzaju *Thermus*

W dotychczasowych badaniach wykazano, że bakterie rodzaju *Thermus* mogą służyć jako źródło rozmaitych enzymów, karotenoidów, witaminy B12 i użytecznych białek, jak np. chaperonów stabilizujących preparaty enzymatyczne lub białek warstwy S przydatnych w nanobiotechnologii. Enzymy pochodzące z *Thermus* spp. można wykorzystać m. in. w inżynierii genetycznej oraz do produkcji żywności, kosmetyków, farmaceutyków, chemikaliów, detergentów, tekstyliów i wyrobów papierniczych.

Obecnie produkowane są polimerazy DNA (EC 2.7.7.7) z *Thermus aquaticus* i *Thermus thermophilus* HB8 oznaczone symbolami *Taq* lub *Tth*. Ich zastosowanie pozwoliło na usprawnienie reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), poprzez wyeliminowanie



konieczności dodawania świeżego enzymu po każdym wysokotemperaturowym cyklu amplifikacji DNA (44). Polimeraza Tth, której temperaturowe optimum aktywności wynosi 75°C posiada w obecności jonów Mn^{2+} aktywność odwrotnej transkryptazy, umożliwiającej przeprowadzenie reakcji syntezy DNA na matrycy RNA, a następnie powielenie produktu w reakcji PCR (45). Do dalszego usprawnienia tej reakcji posłużyły pochodzące z niektórych gatunków *Thermus* termostabilne helikazy, ligazy DNA i endonukleazy restrykcyjne, których zalety przedstawiono w przeglądowym artykule opracowanym przez Pantazaki i wsp. (46).

Innymi użytecznymi enzymami wytwarzanymi przez bakterie rodzaju *Thermus* są m.in. β -galaktozydazy o różnych właściwościach zależnych od gatunku drobnoustroju. Są one przydatne do wytwarzania bezlaktozowych produktów mlecznych np. dietetycznego mleka i jego przetworów, syropów glukozowo-galaktozowych, bezlaktozowej serwatki wykorzystywanej do produkcji lodów, fermentowanych napojów oraz paszy dla zwierząt. Laktoza utrudnia różne procesy technologiczne i wywołuje u niektórych ludzi zaburzenia pokarmowe zwane nietolerancją laktozy. Poprzez hydrolizę enzymatyczną katalizowaną β -galaktozydazą można zapobiec skutkom nietolerancji laktozy oraz trudnościom technologicznym spowodowanym występowaniem tego cukru w mleku i serwatce. Zastosowanie termostabilnych β -galaktozydaz zmniejsza ryzyko wzrostu niepożądanych drobnoustrojów podczas długotrwałego procesu przeprowadzanego w reaktorze z unieruchomionym enzymem (47). Termostabilne β -galaktozydazy są w przeciwieństwie do analogicznych enzymów z mezofili mniej podatne na hamowanie reakcji wytwarzaną podczas hydrolizy galaktozą, a glukoza jest niekiedy ich aktywatorem (48). Enzym o aktywności β -galaktozydazy wytwarzany przez *Thermus* sp. T2 osiąga największą aktywność w 80°C przy pH 5,0 (49). Termostabilną β -galaktozydazę wyizolowano też z uzyskanego z Nowej Zelandii szczepu *Thermus* sp. 4-1A. Jest ona enzymem o dużej termostabilności i po 20 godz. inkubacji w 80°C zachowuje 83% początkowej aktywności (50). Podobnymi właściwościami charakteryzuje się enzym wyizolowany z komórek termofilnej bakterii *Thermus* sp. A4 pochodzącej z gorących źródeł Atagawa w Japonii, który przy optymalnym pH 6,5 zachowuje początkową aktywność nawet po 20 godz. inkubacji w temp. 70°C (51). Termostabilne β -galaktozydazy są ponadto użyteczne w wytwarzaniu laktulozy i innych prebiotyków. Ich zastosowanie umożliwia prowadzenie reakcji w temperaturze zapewniającej wzrost wydajności transgalaktozylacji oraz pozwala na zwiększenie stężenia laktozy w roztworach. Źródłem enzymu przydatnego do tego celu jest *Thermus aquaticus* YT-I wytwarzający β -galaktozydazę o dużej aktywności transgalaktozylacyjnej w temp. 80°C i pH 5,5 (52). Aktywność β -galaktozydazy przejawia też β -glikozydaza ze szczepu *Thermus* Z1 osiągająca maksymalną aktywność w temp. 80°C w szerokim zakresie pH od 4,5 do 6,5 (53). Można ją użyć do katalizowania hydrolizy celobiozy, której nagromadzenie się w środowisku reakcji ogranicza aktywność innych enzymów kompleksu celulolitycznego.

Termostabilne α -amylazy (EC 3.2.1.1) są obecnie stosowane do upłynniania skrobi podczas wytwarzania maltodekstryn i syropów skrobiowych, maltotetraozowych,



maltozowych i glukozy, stosowanych powszechnie w browarnictwie, gorzelnictwie oraz w produkcji wyrobów cukierniczych i piekarskich, mleka w proszku, napojów, keczupów, mrożonej żywności, maltozy, glukozy i alkoholi wielowodorotlenowych, stosowanych jako zamienniki cukru (54). Szczep *Thermus filiformis* Ork A2 wytwarza α -amylazę o optymalnej temperaturze działania 95°C, której czas połowicznej inaktywacji w 85°C wynosi około 8 godz. (55). Enzym ten można wykorzystać na etapie upłynniania skrobi. Zastosowanie termostabilnej α -amylazy redukuje utrudniający prowadzenie procesu wzrost lepkości (30-40%) zawiesiny ziaren skrobiowych spowodowany ich intensywnym kleikowaniem oraz zapewnia strącenie pozostałości białek wywołujących zmętnienie wytwarzanych syropów (56). Wykorzystanie tej α -amylazy jest jednak wątpliwe ze względu na powszechne stosowanie preparatu Termamyl[®], którego substancją aktywną jest termostabilna α -amylaza z *Bacillus subtilis* lub *Bacillus licheniformis*, charakteryzująca się podobnymi właściwościami (57).

Właściwości α -glukozydazy wytwarzanej przez *Thermus thermophilus* wskazują na jej użyteczność w procesie scukrzania skrobi, katalizowanego obecnie glukoamylazą (EC 3.2.1.3) z *Aspergillus niger* lub β -amylazą (EC 3.2.1.2) pochodzącą z jęczmienia. Inaktywacja tych enzymów następuje w temp. 60-65°C i przed rozpoczęciem scukrzania konieczne jest oziębienie roztworu maltodekstryn wytworzonych z udziałem α -amylazy. Można tego uniknąć zastępując glukoamylazy termostabilnymi α -glukozydazami (EC 3.2.1.20) działającymi w podobnych warunkach jak α -amylazy (58). Zaletą α -glukozydazy z *Thermus thermophilus* jest prawie taka sama wartość optymalnego pH, jak w przypadku preparatu Termamyl[®], stosowanego obecnie do upłynniania skrobi oraz zachowanie przez wymieniony enzym około 80% maksymalnej aktywności w zakresie pH od 5,8 do 6,9. Stwarza to możliwość jego współdziałania z rekombinowaną α -amylazą z *Pyrococcus woesei* (59).

Alternatywnym rozwiązaniem jest wykorzystanie synergistycznego oddziaływania α -glukozydazy z *Thermus ruber* i stosowanego aktualnie w skali przemysłowej preparatu glukoamylazy z *Aspergillus niger*. Oba enzymy osiągają największą aktywność w podobnej temperaturze, ale różnią się specyficznością działania. α -Glukozydazy charakteryzują się większą aktywnością wobec niskocząsteczkowych substratów. Aktywność glukoamylaz jest natomiast największa względem polisacharydów i dość szybko maleje w miarę zmniejszania się masy cząsteczkowej hydrolizowanego oligosacharydu. W przeprowadzonych badaniach jednoczesnego wykorzystania glukoamylazy oraz α -glukozydazy do katalizowania scukrzania skrobi wykazano, że współdziałanie handlowego preparatu glukoamylazy oraz α -glukozydazy z *Thermus ruber* zwiększało wydajność wytwarzania glukozy w porównaniu z działaniem takiej samej ilości jednostek aktywności samej glukoamylazy (60). Podczas procesu katalizowanego mieszaniną enzymów nie zaobserwowano spadku zawartości glukozy w mieszaninie reakcyjnej spowodowanego reakcjami rewersji, którym przeciwdziała obecność α -glukozydazy.

Do usuwania rozgałęzień cząsteczek amylopektyny podczas zaawansowanej hydrolizy skrobi katalizowanej termostabilnymi enzymami można wykorzystać pulula-

nazę EC 3.2.1.41) z *Thermus aquaticus* YT1, której okres połowicznej inaktywacji w temp. 95-98°C wynosi 4,5 godz. lub analogiczny enzym z *Thermus caldophilus* GK-24 o maksymalnej aktywności w 75°C (61).

Warunkiem poprawy wydajności enzymatycznej izomeryzacji glukozy podczas wytwarzania syropów fruktozowych jest zwiększenie temperatury reakcji. Można to osiągnąć zastępując stosowane dotychczas izomeryzy ksylozowe (5.3.1.5) wytwarzane przez *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter* lub *Actinoplanes* analogicznymi enzymami z *Thermus thermophilus* lub *Thermus caldophilus*, które wykazują największą aktywność w temp. 90°C (46,54,62).

Enzymem dość rzadko spotykanym u innych drobnoustrojów jest syntaza trehalozy umożliwiająca przemysłową produkcję tego użytecznego cukru w jednoetapowej reakcji konwersji maltozy (63,64). Występowanie wymienionego enzymu, charakteryzującego się prawie identycznymi optymalnymi warunkami działania (65°C, pH około 6,5) stwierdzono w przypadku szczepów *Thermus thermophilus* HB-8 i *Meiothermus ruber* (38,39). Fakt, że optymalna temperatura działania syntazy trehalozy wyizolowanej z *Thermus thermophilus* jest niższa od temperatury rozwoju drobnoustroju potwierdza istnienie w cytozolu oddziaływań stabilizujących enzym.

Gatunki *Thermus* wytwarzają enzymy proteolityczne, wśród których występują m. in. metaloproteinazy i proteinazy serynowe należące do subtilyzyn. Różnią się one specyficznością substratową, termostabilnością, odpornością na działanie chelatorów oraz optymalnymi warunkami reakcji. Enzymy te mogą być np. przydatne w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, skórzanym i tekstylnym oraz w produkcji detergentów. Jednym z nich jest pochodząca z *Thermus thermophilus* HB8 i działająca w obecności ATP metaloproteinaza, która zawiera w kieszeni katalitycznej atomy cynku (65). Wykazuje ona aktywność tylko wobec zdenaturowanych białek, rozszczepiając wiązania peptydowe utworzone z udziałem hydrofobowych aminokwasów i uwalnia niewielkie peptydy o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 30 kDa.

Szczep *Thermus* sp. Rt41A produkuje natomiast pozakomórkową, alkaliczną proteinazę zachowującą 75% maksymalnej aktywności w zakresie pH 7,0-10,0. Enzym ten przejawia największą aktywność w temp. 90°C w pH 8,0, ale pod wpływem chelatorów usuwających Ca^{2+} następuje obniżenie optymalnej temperatury działania do 60°C i znaczne skrócenie okresu zachowania połowicznej aktywności (z kilku godz. w temp. 70°C do około 3 min). Wymieniona proteinaza jest glikoproteiną o dużej odporności na zmiany siły jonowej i oddziaływanie rozpuszczalników organicznych (66). Proponowanymi sposobami zastosowania tego enzymu jest produkcja detergentów i regeneracja membran ultrafiltracyjnych wykorzystywanych do odzyskiwania białek serwatkowych.

Innymi użytecznymi enzymami są: alkaliczna proteinaza z *Thermus aquaticus* oraz pochodząca z tego mikroorganizmu aminopeptydaza o optymalnej temperaturze działania 75-80°C i lepszej termostabilności od analogicznego enzymu z *Bacillus stearothermophilus* (67,68).

Niektóre enzymy można wykorzystać w chemoterapii lub kosmetyce. Ich przykładem jest aminohydrolaza L-asparaginy (EC 3.5.1.1) z *Thermus thermophilus* HB8. Przekształca ona L-asparaginę w amoniak i kwas L-asparaginowy, powodując letalny dla komórek nowotworowych deficyt L-asparaginy, które nie są zdolne do syntezy tego aminokwasu (69). Przykładem przydatności w kosmetyce jest zastosowanie pełniących rolę antyoksydantów ekstraktów białek z *Thermus thermophilus* jako składnika maści i kremów aktywowanych cieplnie, np. podczas mycia lub masażu. Ich działanie regenerujące jest spowodowane m. in. oksydoreduktazami znajdującymi się w komórkach tego drobnoustroju. Zastosowanie termostabilnej katalazy, np. z *Thermus thermophilus* w układzie enzymatycznym biosensorów używanych do oznaczania glukozy lub sacharozy pozwala na przeprowadzanie tych pomiarów w podwyższonej temperaturze.

Duże znaczenie przemysłowe mają lipazy, katalizujące hydrolizę lipidów i wytwarzanie różnych produktów w reakcjach estryfikacji i transestryfikacji. Zastosowanie termostabilnych lipaz/esteraz wytwarzanych np. przez niektóre gatunki *Thermus* umożliwi przeprowadzenie tych reakcji w temperaturze przekraczającej punkt topnienia substratu, co pozwoli na zrezygnowanie ze stosowania rozpuszczalników organicznych (70). Wśród znanych gatunków *Thermus*, najlepiej obecnie zbadanymi producentami wewnątrzkomórkowych i pozakomórkowych lipaz są *Thermus aquaticus* i *Thermus thermophilus* HB27. Wymienione bakterie wytwarzają lipazy z wydajnością 57 i 33 U/L podłoża (70).

Wartość użytkową mają nie tylko enzymy, ale też białka warstwy S występujące m.in. u wszystkich gatunków *Thermus*. Niektóre z tych białek są glikoproteinami i zależnie od pochodzenia charakteryzują się masą cząsteczkową od 40 do 200 kDa (71,72). Tworzą one supramolekularne, czworoboczne lub heksagonalne struktury na ścianach komórkowych wielu bakterii i archeonów. Białka te łączą się wiązaniami niekowalencyjnymi i mogą być rozpuszczone pod wpływem substancji niszczących wiązania wodorowe, po których usunięciu, np. przez dializę wykazują tendencję do tworzenia monomolekularnej warstwy o uporządkowanej budowie na stałych nośnikach (np. płytki silikonowe, polimery), filmach lipidowych, liposomach oraz na powierzchni cieczy (73). Tak wytworzona warstwa ma właściwości amfipatyczne i charakteryzuje się ładunkiem powierzchniowym oraz zależną od gatunku drobnoustroju wielkością porów (2-6 nm), występujących pomiędzy regularnie ułożonymi cząsteczkami białek (73). Właściwości i uporządkowana budowa błon utworzonych przez białka warstwy S jest przyczyną ich przydatności w bionice oraz do formowania monomolekularnej powłoki enzymów, przeciwciał i antygenów, wykorzystywanej np. do produkcji biosensorów. Jednym z przykładów stosowania białek warstwy S jest stabilizowanie dwuwarstwowych błon lipidowych w które wbudowano różne aktywne biologicznie makrocząsteczki. Błony te mają niestety niewielką trwałość i są podatne na mechaniczną destrukcję. Znaczne zwiększenie ich wytrzymałości następuje w przypadku formowania błon lipidowych na powierzchni białkowej warstwy S, immobilizowanej na stałym nośniku (74,75).



Charakteryzujące się jednakowymi rozmiarami porów błony z białek warstwy S nadają się do formowania membran ultrafiltracyjnych o ściśle określonej wartości obciążenia (*cut-off*) oraz do selektywnego pułapkowania cząsteczek we wnętrzu heksagonalnych lub czworobocznych agregatów tych białek.

Powłoki z białek warstwy S wytworzone np. na płytkach kwarcowych są wykorzystywane w mikrolitografii. Naniesione cząsteczki białek są degradowane pod wpływem promieniowania lasera UV w miejscach nie osłoniętych metalową maską (73).

Pory regularnie rozmieszczone w powłoce z białek warstwy S są też wykorzystywane jako matryca do formowania nanocząstek złota i innych metali. Odbywa się to przez poddanie cienkiej folii umieszczonej na warstwie białek oddziaływaniu strumienia elektronów. Tak wytworzone nanocząstki metalu mają krystaliczną strukturę i równoboczny lub heksagonalny przekrój.

9. Uwagi końcowe

Przedstawiony przegląd danych literaturowych świadczy o przydatności termofili rodzaju *Thermus* nie tylko do produkcji polimeraz DNA, ale też wielu innych termostabilnych enzymów, użytecznych m. in. w inżynierii genetycznej, kosmetyce, farmacji i wytwarzaniu artykułów spożywczych. W dotychczasowych badaniach wykazano, że wymienione drobnoustroje mogą służyć jako źródło karotenoidów, witamin, poliamin i białek stosowanych w nanoelektronice. Wiele gatunków *Thermus* nie zostało jednak dokładnie zbadanych i konieczne są dalsze prace, mające na celu dokonanie pełnej charakterystyki enzymów i metabolizmu tych bakterii, opracowania warunków wydajnej hodowli w bioreaktorach, określenie sekwencji nukleotydowej genomów nie zbadanych dotychczas gatunków oraz zbadanie nie rozpoznanych jeszcze funkcji niektórych genów.

Literatura

1. Adams M. W. W., Perler F. B., Kelly R. M., (1995), *Bio/Technology*, 13, 662-668.
2. van den Burg B., (2003), *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 213-218.
3. Haki G. D., Rakshit S. K., (2003), *Bioresour. Technol.*, 89, 17-34.
4. Synowiecki J., (1998), *Biotechnologia*, 42, 98-105.
5. Williams R. A. D., da Costa M. S., (1992), *The genus Thermus and related microorganismus. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, application*, Ed. A. Balows. NY, Springer, 3745-3753.
6. Brock T. D., Freeze H., (1969), *J. Bacteriol.*, 98, 289-297.
7. Manaia C. M., Hoste B., Gutierrez C., Gillis M., Ventosa A., Kersters K., da Costa M. S., (1994), *Syst. Appl. Microbiol.*, 17, 526-532.
8. Hudson J. A., Morgan H. W., Daniel R. M., (1987), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 431-436.
9. Skirnisdottir S., Hreggvidsson G. O., Holst O., Kristjansson J. K., (2001), *Extremophiles*, 5, 45-51.
10. Tenreiro S., Nobre M. F., Hoste B., Gillis M., Kristjansson J. K., da Costa M. S., (1995), *Res. Microbiol.*, 146, 315-324.



11. Nobre M. F., Trüper H. G., da Costa M. S., (1996), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 604-606.
12. Hudson J. A., Morgan H. W., Daniel R. M., (1989), *Syst. Appl. Microbiol.*, 11, 250-256.
13. Kristjansson J. K., Alfredsson G. A., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1785-1789.
14. Munster M. J., Munster A. P., Woodrow J. R., Sharp R. J., (1986), *J. Gen. Microbiol.*, 132, 1677-1683.
15. Tenreiro S., Nobre M. F., Hoste B., Gillis M., Kristjansson J. K., da Costa M. S., (1995), *Res. Microbiol.*, 146, 315-324.
16. Munster M. J., Munster A. P., Woodrow J. R., Sharp R. J., (1986), *J. Gen. Microbiol.*, 132, 1677-1683.
17. Alfredsson G. A., Baldursson S., Kristjansson J. K., (1985), *Syst. Appl. Microbiol.*, 6, 308-311.
18. Pask-Hughes R. A., Williams R. A. D., (1977), *J. Gen. Microbiol.*, 102, 375-383.
19. Quintela J. C., Pittenauer E., Allmaier G., Arán V., de Pedro M. A., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 4947-4962.
20. Castan P., Zafra O., Moreno R., de Pedro M.A., Valles K., Cava F., Caro E., Schwarz H., Berenguer J., (2002), *Extremophiles*, 6, 225-232.
21. Leone S., Molinaro A., Lindner B., Romano I., Nicolaus B., Parrilli M., Lanzetta R., Holst O., (2006), *Glycobiology*, 16, 766-775.
22. Williams R. A. D., Smith K. E., Welch S. G., Micallef J., Sharp R. J., (1995), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 495-499.
23. Fardo M. M., de Pedro M. A., Berenguer J., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 7458-7462.
24. Marteinsson V. T., Birrien J. L., Raguene G., Costa M., (1999), *Extremophiles*, 3, 247-251.
25. Prado A., da Costa M. S., Madeira V. M. C., (1988), *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1653-1660.
26. Liolio E. E., Pantazaki A., Kyriakidis D. A., (2004), *Microb. Cell Factories*, 3, 5, 1, 3.
27. Brügemann H., Chen C., (2006), *J. Biotechnol.*, 124, 654-661.
28. Zeikus J. G., Taylor M. W., Brock T. D., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, 204, 512-520.
29. Rodriguez A. C., Stock D., (2002), *EMBO J.*, 21, 418-426.
30. Ramirez-Arcos S., Fernandez-Herrero L. A., Berenguer J., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1396, 215-227.
31. Heinzinger N. K., Fujimoto S. Y., Clark M. A., Moreno M. S., Barren E. L., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 2813-2820.
32. Madigan M. T., Oren A., (1999), *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 265-269.
33. Tanner J. J., Hecht R. M., Krause K. L., (1996), *Biochem.*, 35, 2597-2609.
34. Wang X., He X., Yang S., An X., Chang W., Liang D., (2003), *J. Bacteriol.*, 185, 4248-4255.
35. Nordlund P., Sjöberg B. M., Eklund H., (1990), *Nature*, 345, 593-598.
36. Brock T. D., (1978), *Thermophilic organisms and life at high temperatures*, Ed. Starr M. P., Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 72-91.
37. Watanabe S., Muramatsu T., Ao T., Hirayama Y., Takahashi K., Tanokura M., Kuchino Y., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 266, 811-819.
38. Zdziebło A., Synowiecki J., (2006), *Food Chem.*, 96, 8-13.
39. Sinkiewicz I., Synowiecki J., (2008), *Biotechnologia*, 1, 168-176.
40. Wolska-Mitaszko B., (2001), *Biotechnologia*, 2, 36-53.
41. Roser B., (1991), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 166-169.
42. McKay A., Quiller J., Jones C. W., (1982), *Arch. Microbiol.*, 131, 43-50.
43. Fee J. A., Chen Y., Todaro T. R., Bren K. L., Patel K. M., Hill M. G., Gomez-moran E., Loehr T. M., Ai J., Thony-Meyer L., Williams P. A., Stura E., Sridhar V., McRee D. E., (2000), *Protein Sci.*, 9, 2074-2084.
44. Vieille C., Zeikus G., (2001), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 1-43.
45. Bruins M. E., Janssen A. E. M., Boom R. M., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 155-186.
46. Pantazaki A. A., Pritsa A. A., Kyriakidis D. A., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 1-12.
47. Wołosowska S., Synowiecki J., (2004), *Food Chem.*, 85, 181-187.
48. Wołosowska S., Synowiecki J., (2003), *Biotechnologia*, 2, 268-279.
49. Ulrich J. T., McFeters G. A., Temple K. L., (1972), *J. Bacteriol.*, 110, 691-698.
50. Cowan D. A., Daniel R. M., Martin A. M., Morgan H. W., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1141-1145.
51. Ohtsu N., Motoshima H., Goto K., Tsukasaki F., Matsuzawa H., (1998), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1539-1545.
52. Berger J.-L., Lee B. H., Lacroix C., (1997), *Appl. Biochem.*, 25, 29-41.



53. Synowiecki J., Maciuńska J., (2000), *Biotechnologia*, 1, 117-123.
54. Bryjak J., (1999), *Biotechnologia*, 1, 181-225.
55. Egas M. C., da Costa M. S., Covan D. A., Pires E. M. V., (1998), *Extremophiles*, 2, 23-32.
56. Synowiecki J., Grzybowska B., (2001), *Biotechnologia*, 2, 26-35.
57. Crabb W. D., Shetty J. K., (1999), *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 252-256.
58. Legin E., Copinet A., Duchiron F., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 363-367.
59. Grzybowska B., Szweđa P., Synowiecki J., (2004), *Mol. Biotechnol.*, 26, 101-109.
60. Sinkiewicz I., Synowiecki, (2009), *Biotechnologia*, (w druku).
61. Kim C. H., Nashiru O., Ko J. H., (1996), *FEMS Microbiol. Lett.*, 138, 147-152.
62. Park B. C., Koh S., Chang C., Suh S. W., Lee D. S., Byun S. M., (1997), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 62, 15-27.
63. Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y., (1996), *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 835-839.
64. Nishimoto T., Nakano M., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y., (1996), *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 640-644.
65. Asahara Y., Atsuta K., Motohashi K., Taguchi H., Yohda M., Yoshida M., (2000), *J. Biochem.*, 127, 931-937.
66. Peek K., Daniel R.M., Monk C., Parker L., Coolbear T., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 207, 1035-1044.
67. Matsuzawa H., Hamaoki M., Ohta T., (1983), *Agr. Biol. Chem.*, 47, 25-28.
68. Minagawa E., Kaminogawa S., Matsuzawa H., Ohta T., Yamauchi K., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1755-1763.
69. Pritsa A. A., Papazisis K. T., Kortsaris A. H., Geromichalos G. D., Kyriakidis D. A., (2001), *Anti-Cancer Drugs*, 12, 137-142.
70. Domínguez A., Pastrana L., Longo M. A., Rua M. L., Sanroman M. A., (2005), *Biochem. Engineer. J.*, 26, 95-99.
71. Sleytr U. B., Huber C., Ilk N., Pum D., Schuster B., Egelseer E. M., (2007), *FEMS Microbiol. Lett.*, 267, 132-144.
72. Schäffer C., Messner P., (2004), *Glycobiology*, 14, 31R-42R.
73. Pum D., Sleytr U. B., (1999), *Trends in Biotech.*, 17, 8-13.
74. Schuster B., Sleytr U. B., (2006), *Curr. Nanoscience*, 2, 143-152.
75. Gufler P. C., Pum D., Sleytr U. B., Schuster B., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1661, 154-165.
76. Loginova L. G., Egorova L. A., Golovacheva R. S., Seregina L. M., (1984), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 498-499.
77. Tenreiro S., Nobre M. F., da Costa M. S., (1995), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 633-639.