

Izolowanie i niektóre właściwości pozakomórkowych amylaz *Fusarium martii* App. et Wr. var. minus f. 2

JOANNA BOGUSZEWSKA

Instytut Biochemii i Fizjologii Uniwersytetu w Łodzi

Boguszewska J.: (Institute of Biochemistry and Physiology University of Lodz, Banacha 12/6, 90-237 Łódź, Poland). *Isolation and some properties of extracellular amylases from Fusarium martii var. minus f.2*. Acta Mycol. 16(2): 237-245, 1980.

α -amylase and glucoamylase were isolated from the liquid culture medium of *Fusarium martii*. At 10^{-3} M concentrations PCMB inhibited the activity of both enzymes, which indicated that they require SH groups for enzymatic activity. α -amylase was also inhibited by DFP at 10^{-3} M. One may thus assume that serine is present in the active center of the examined amylase.

WSTĘP

Z płynu nadosadowego kultury *Fusarium martii* var. minus f.2 wyizolowano dwa enzymy amylolityczne, które zidentyfikowano jako α -amylazę i glucoamylazę. Oczyszczanie i rozdzielanie enzymów prowadzono metodami chromatografii kolumnowej przy użyciu DEAE-Sefadeksu A-50, Sefadeksu G-100 i DEAE-celulozy. Jednorodność enzymów sprawdzono metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym. Określono wpływ pH i temperatury na aktywność i stabilność enzymów. Zbadano wpływ jonów metali i specyficznych inhibitorów centrum aktywnego na aktywność enzymów.

Wykorzystanie grzybów do produkcji przemysłowej preparatów amylolitycznych spowodowało poszukiwanie szczepów wydzielających do podłoża znaczne ilości enzymów amylolitycznych. Dotychczas najbardziej szczegółowo zostały zbadane amylazy różnych gatunków z rodzaju *Aspergillus* i *Rhizopus* (Lineback, Baumann 1970; Minoda, Arai, Yamada 1969; Pazur, Okada 1967). W naszym laboratorium w kulturach *Fusarium martii* var. minus f.2 stwierdzono wysoką aktywność amylolityczną. Wyniki wstępnych badań sugerowały obecność α -amylazy i glucoamylazy. Za użyciem w niniejszej pracy do badań *F. martii* przemawiał ponadto fakt, że amylazy tego mikroorga-

nizmu nie były dotąd badane. Celem pracy było wyodrębnienie i oczyszczenie do jednorodnej postaci pozakomórkowych amylaz, jak również zbadanie niektórych własności otrzymanych enzymów.

MATERIAŁ I METODY

Warunki hodowli. Szczep *Fusarium martii* var. *minus* f.2 otrzymano z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy. W celu otrzymania inoculum grzyby hodowano na skosach sporządzonych z brzeczki słodowej i 2% agaru w 28°C w ciągu 96 godzin. Hodowlę zmywano 5 ml wody, otrzymaną zawiesinę wprowadzano do kolb Erlenmeyera zawierających 95 ml pożywki o składzie (g/l): NaNO₃—9,0; MgSO₄—0,5; KH₂PO₄—1,0; KCl—0,5; FeSO₄—0,001; skrobia—30,0. Inkubację prowadzono w temp. 28°C na wstrząsarkach w ciągu 72 godz. Grzybnię oddzielano od podłoża za pomocą wirowania, a uzyskany płyn nadosadowy stanowił materiał wyjściowy do badania enzymów.

Izolowanie i oczyszczanie enzymów. Płyn nadosadowy traktowano 3 obj. acetonu (-20°C). Wytrącony osad odwirowywano, rozpuszczano w wodzie destylowanej, zagęszczano przez liofilizację i przeprowadzano przez 5 cm warstwę DEAE-Sefadeksu A-50 w celu usunięcia zanieczyszczeń pochodzenia węglowodanowego. Enzymy eluowano z Sefadeksu 0,02 M buforem fosforanowym o pH 6. Zawartość węglowodanów oznaczano metodą fenolową (Dubois i in. 1956). Roztwór enzymatyczny dializowano wobec wody destylowanej, zagęszczano przez liofilizację, dializowano wobec 0,02 M buforu fosforanowego o pH 6 i sączono przez kolumnę z Sefadeksem G-100 (2×40 cm). Zbierano 6 ml frakcje, szybkość elucji wynosiła 0,5 ml/min. Frakcje wykazujące aktywność amylolytyczną dializowano wobec wody, zagęszczano przez liofilizację, dializowano wobec 0,005 M buforu fosforanowego o pH 6 i poddawano chromatografii na DEAE-celulozie (2×45 cm). Eluowano gradientem stężeń buforu fosforanowego o pH 6 (od 0,005 M do 0,2 M). Zbierano 6 ml frakcje, szybkość elucji wynosiła 0,6 ml/min. W poszczególnych frakcjach oznaczano aktywność enzymatyczną i zawartość białka. Roztwory enzymatyczne z dwóch uzyskanych aktywnych szczytów dializowano wobec wody, liofilizowano, dializowano wobec 0,005 M buforu fosforanowego o pH 6 i poddawano rechromatografii na DEAE-celulozie.

Oznaczanie aktywności enzymatycznej. Podczas kolejnych etapów oczyszczania enzymów aktywność amylolytyczną określano metodą Nelsona (Nelson 1944). Polega ona na oznaczeniu w mieszaninie inkubacyjnej zawartości cukrów redukujących uwolnionych w trakcie hydrolytycznego rozpadu skrobi (lub innych

substratów węglowodanowych). Również metodą Nelsona oznaczano aktywność glikoamylazy przy charakterystyce oczyszczonego enzymu. Przy charakterystyce oczyszczonego preparatu α -amylazy oznaczano aktywność enzymu na podstawie zabarwienia z jodem skrobi nie rozłożonej, pozostającej po okresie inkubacji, metodą Heinkela (Heinkel 1956). W metodzie Nelsona mieszanina inkubacyjna zawierała 1 ml roztworu enzymu i 1 ml 1% roztworu skrobi w 0,02 M buforze fosforanowym o pH 6. Inkubacja trwała 10 min w 30°C. Za jednostkę aktywności enzymów amylolitycznych przyjęto taką ich ilość, która w ciągu 1 min. w temp. 30°C powodowała uwolnienie cukrów redukujących w ilości równoważnej 1 μ molowi glukozy. W przypadku metody Heinkela mieszanina inkubacyjna zawierała 1 ml roztworu enzymu, 1 ml 1% roztworu skrobi i 3 ml 0,02 M buforu fosforanowego o pH 6,6. Inkubację prowadzono w temperaturze 30°C przez 10 min. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 5 ml 20% kwasu sulfosaliicylowego. Za jednostkę aktywności enzymów amylolitycznych według metody Heinkela przyjęto taką ich ilość, która w ciągu 1 min w temp. 30°C rozkładała 1 mg skrobi.

Oznaczanie białka. Zawartość białka oznaczano metodą Lowry'ego (Lowry i in. 1951).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. Przeprowadzono 3 godz. elektroforezę w żelu 7,5% przy natężeniu 5,0 mA na rurkę. Zastosowano 0,05 M bufor Tris-HCl o pH 8,6.

Chromatografia bibułowa węglowodanów. Na bibułę Whatman 1 nanoszono produkty 10-minutowej hydrolizy 1% skrobi (150 μ l). Stosowano chromatografię jednokierunkową zstępującą w układzie octan etylu—kwas octowy lodowaty—woda (3:3:1). Chromatogramy wywoływano za pomocą ftalanu anizydy.

Wpływ temperatury na stabilność enzymów. Roztwory enzymów preinkubowano 30 min. w zakresie temperatury 20—60°C. Następnie poszczególne roztwory enzymatyczne inkubowano ze skrobią w temp. 30°C i oznaczano aktywność.

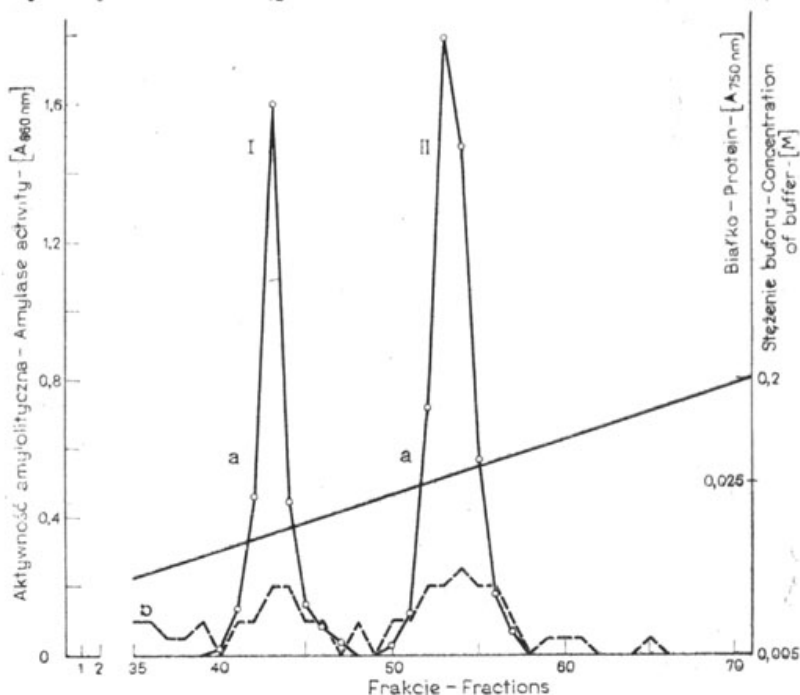
Wpływ pH na stabilność enzymów. Enzymy preinkubowano 30 min i 24 godz. w temp. 20°C i pH od 3 do 10,5. W zakresie pH 3-8, stosowano bufor McIlvaine'a, a w zakresie pH 9-10,5 bufor glicynowy. Następnie oznaczano aktywność w optymalnym pH i temp. 30°C.

Wpływ różnych związków chemicznych na aktywność enzymów. Przed oznaczeniem aktywności roztwory enzymów preinkubowano 30 min w 20°C z następującymi związkami (stężenie końcowe 10^{-3} M): JCH_2COONa , KCN, NaCl, CuSO_4 , HgCl_2 , EDTA, H_2O_2 ,

CaCl₂ p-chlorortęciobenzoesanem (PCMB), czteronitrometanem, N-acetyloimidazolem, fluorkiem fosforanu dwuizopropylowego (DFP).

WYNIKI I WNIOSKI

Przebieg kolejnych etapów oczyszczania pozakomórkowych amylaz *Fusarium martii* przedstawiono w tabeli 1. Do wytrącania enzymów z płynu nadosadowego hodowli stosowano 3 obj. acetonu, ponieważ stwierdzano wtedy najmniejsze straty aktywności amylolitycznej i najwyższą aktywność właściwą. Roztwór osadu acetonowego sączono przez warstwę DEAE-Sefadeksu A-50 głównie w celu usunięcia węglowodanowych zanieczyszczeń obecnych uprzednio w płynie nadosadowym, które utrudniały prowadzenie chromatografii kolumnowej niszcząc strukturę kolumn. Po tym etapie oczyszczania, zawartość w badanym roztworze zanieczyszczeń o charakterze węglowodanowym, oznaczana metodą fenolową, bardzo silnie spadała. Otrzymany roztwór enzymatyczny oczyszczano następnie na kolumnie z Sefadeksem G-100, uzy-



Ryc. 1. Chromatografia kolumnowa (frakcje I i II) na DEAE-celulozie
 a - aktywność amylolityczna; b - białko; 1-70 - numer frakcji
 Column chromatography (fraction I and II) on DEAE-cellulose
 a - amylolytic activity; b - protein; 1-70 - fraction number

Tabela 1—Table 1
 Oczyszczanie amylaz *Fusarium Martii*
 Purification of amylases from *Fusarium Martii*

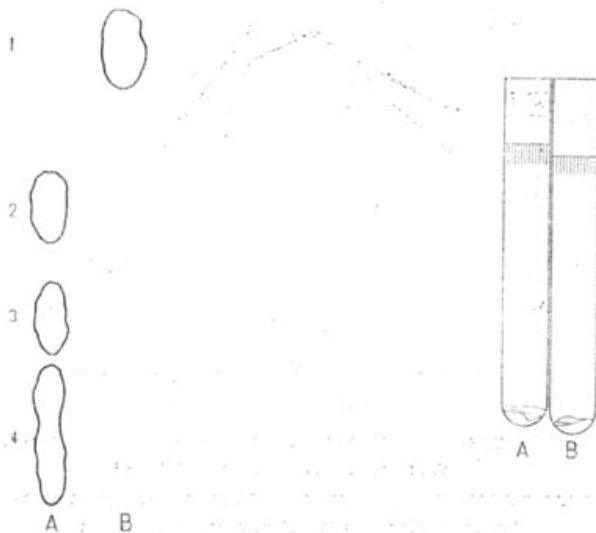
Proces oczyszczania Purification process	Objętość Volume ml	Całkowita aktywność j. Total activity u	Białko całkowite Total protein mg	Aktywność właściwa j/mg białka Specific activity u u/mg of protein	Odzyskana aktywność Yield %	Stopień oczyszczenia Purification
Płyn nadosadowy hodowli Sepernatant of culture	2000	3120	450	6,9	100	—
Aceton Acetone	500	2320	196	11,8	74,4	1,7
DEAE-sefadeks A-50 (sączenie) DEAE-sefadex A-50 (filtration)	50	2050	135	15,2	65,7	2,2
Sefadeks G-100 (chromatografia) Sefadex G-100 (chromatography)	50	1980	74	26,8	63,5	3,9
DEAE-celuloza (chromatografia) DEAE-cellulose (chromatography)						
α-amylaza (I) (α-amylase)	11,2	590	14,1	41,8	18,9	6,1
glukoamylaza (II) (glucoamylase)	11,6	1199	22,0	54,5	38,4	7,9
DEAE-celuloza (rechromatografia) DEAE-cellulose (rechromatography)						
α-amylaza (I) (α-amylase)	11,0	564	11,8	47,8	18,0	6,9
glukoamylaza (II) (glucoamylase)	11,5	1178	18,5	63,7	37,8	9,2

Tabela 2—Table 2

Wpływ różnych związków chemicznych na aktywność
glukoamylazy i α -amylazy
Effect of various chemicals on glucoamylase and α -amylase
activity

Związek Compound	Kontrola Control (%)	
	glukoamylaza glucoamylase	α -amylaza α -amylase
Kontrola (Control)	100	100
JCH ₂ COONa	96	90
KCN	102	91
NaCl	99	96
CuSO ₄	88	11
HgCl ₂	0	11
CaCl ₂	101	100
EDTA	97	95
H ₂ O ₂	100	93
PCMB	0	42
Czteronitrometan (tetranitromethane)	99	100
DFP	95	22
N-acetyloimidazol (N-acetylimidasole)	102	103

skując jedną frakcję enzymatyczną. Rozdzielenie α -amylazy od glukoamylazy osiągnięto za pomocą chromatografii kolumnowej na DEAE-celulozie (ryc. 1). Na podstawie analizy chromatograficznej produktów rozkładu skrobi przez poszczególne frakcje zidentyfikowano frakcję I jako α -amylazę, zaś frakcję II jako glukoamylazę (ryc. 2). Wykazano obecność maltozy i dekstryn (oraz brak glukozy) w wyniku 10-minutowej hydrolizy 1% skrobi przez frakcję I oraz glukozę jako jedyny produkt hydrolizy skrobi przez frakcję II. Aktywne frakcje zebrane w wyniku rozdzielania na DEAE-celulozie poddano rechromatografii. Aktywność oczyszczonego preparatu glukoamylazy była dwukrotnie wyższa od oczyszczonego preparatu α -amylazy, określając szybkość wytwarzania cukrów redukujących w czasie hydrolizy skrobi. Aktywność właściwa w j./mg białka oczyszczonej α -amylazy wynosiła 47,8, glukoamylazy — 63,7. Odzyskano 55,8% aktywności wyjściowej, z tego 18% przypada na α -amylazę, a 37,8% na glukoamylazę. Wyizolowane enzymy wykazywały jednorodność w czasie elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, wędrując w pH 8,6 do anody. Glukoamylaza wędrowała nieco szybciej niż α -amylaza (ryc. 3).



Ryc. 2. Chromatografia bibułowa produktów częściowej hydrolizy skrobi przez frakcję I i frakcję II

1 — glukoza; 2 — maltoza; 3 — maltotrioza; 4 — dekstryny

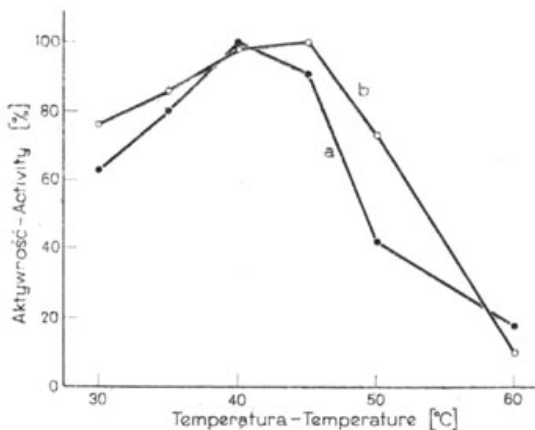
Paper chromatography of products of partial hydrolysis of starch by fraction I and fraction II

1 — glucose; 2 — maltose; 3 — maltotriose; 4 — dextrans

Ryc. 3. Rozdział α -amylazy (A) i glucoamylazy (B) w żelu poliakryloamidowym

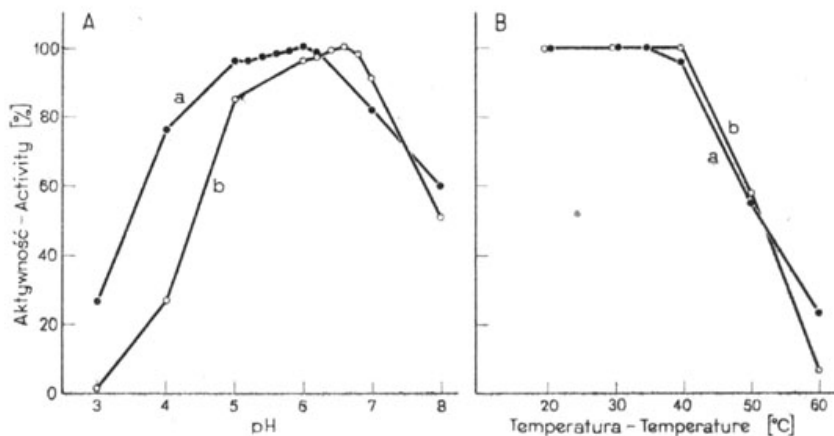
Separation of α -amylase (A) and glucoamylase (B) on a polyacrylamide gel

Badając właściwości otrzymanych enzymów stwierdzono, że α -amylaza i glucoamylaza *F. martii* posiadały zbliżony zakres działania optymalnej temperatury; odpowiednio 45°C i 40°C (ryc. 4). Optymalne pH dla działania α -amylazy wynosi 6,6, dla glucoamylazy 6,0 (ryc. 5A). Zarówno α -amylaza jak i glucoamylaza charakteryzowały się dość dużą labilnością termiczną (ryc. 5B). α -amylaza była stabilna w ciągu 30 min w temperaturze do 40°C, natomiast glucoamylaza do 35°C. Powyżej 40°C aktywność amylolityczna obu enzymów gwałtownie spadała. Glucoamylaza posiadała znacznie szerszy zakres pH, w którym była trwała (ryc. 6A), aniżeli α -amylaza (ryc. 6B). Po 24 godz. inkubacji w 20°C glucoamylaza zachowała 100% aktywności w zakresie pH 5-10, natomiast α -amylaza w pH 7-9. Glucoamylaza wykazywała również wyższą aktywność w niskich wartościach pH. Po 24 godz. przechowywania w pH 3,0 glucoamylaza zachowywała około 80% aktywności, a α -amy-



Ryc. 4. Wpływ temperatury na aktywność glukoamylazy (a) i α -amylazy (b)
Inkubacja trwała 10 min w pH 6 i 6,6

Effect of temperature on the activity of glucoamylase (a) and α -amylase (b)
The incubation was for 10 minutes at pH 6 and 6.6



Ryc. 5. A — Wpływ pH na aktywność glukoamylazy (a) i α -amylazy (b)
Stosowano bufor McIlvalne'a. Inkubacja trwała 10 min w 30°C

B — Wpływ temperatury na stabilność glukoamylazy (a) i α -amylazy (b)

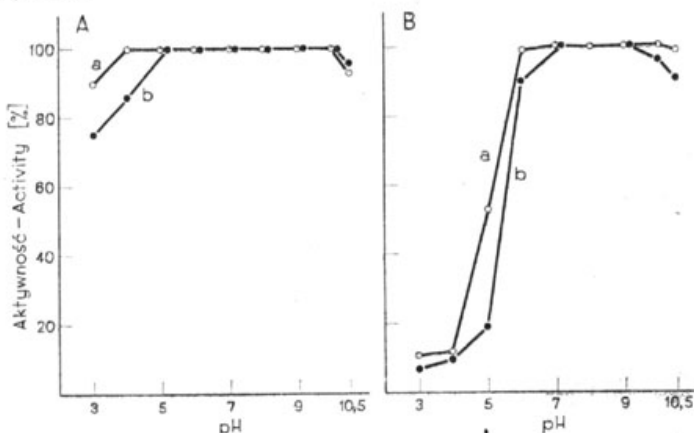
A — Effect of pH on glucoamylase activity (a) and α -amylase activity (b)
McIlvalne's buffer was used. Incubation was for 10 minutes at 30°C

B — Effect of temperature on stability of glucoamylase (a) and α -amylase (b)

laza jedynie kilka procent. Inaktywacja enzymów była w pewnym stopniu większa przy 24 godz., niż przy 30 min inkubacji.

Badając wpływ jonów i inhibitorów specyficznych na aktywność

otrzymanych amylaz wykazano (tab. 2), że w stężeniach 10^{-3} M PCMB oraz jony Hg^{++} hamowały aktywność zarówno glukoamylazy jak i Do funkcjonowania katalitycznego glukoamylazy potrzebne są grupy sulfhydrylowe.



Ryc. 6. Wpływ pH na stabilność glukoamylazy (A) i α -amylazy (B)
a — 30 min; b — 24 godz

Effect of pH on glucoamylase (A) stability and α -amylase (B) stability
a — 30 min; b — 24 h

α -amylazy. α -amylaza była ponadto hamowana przez DFP. Można zatem sądzić, że istotną rolę w reakcjach katalizowanych przez α -amylazę odgrywają grupy sulfhydrylowe oraz grupy hydroksylowe seryny.

LITERATURA

- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances 28: 350-356.
- Heinkel K., 1956, Über die vergleichbarkeit verschiedener bestimmungsmethoden der blutdiastasen, Klin. Wschr. 34: 155-157.
- Lineback D.R., Baumann W.E., 1970, Properties of a glucoamylase from *Aspergillus phoenicis*, Carbohydr. Res. 14: 341-353.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent 193: 265-275.
- Minoda Y., Arai M., Yamada K., 1969, Acid-stable α -amylase of Black *Aspergilli*, Agr. Biol. Chem. 33: 572-578.
- Nelson N., 1944, A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.
- Pazur J.H., Okada S., 1967, Properties of the glucoamylase from *Rhizopus delemar*, Carbohydr. Res. 4: 371-379.