

Wpływ składu podłoża i warunków hodowli na syntezę
alkalicznych proteinaz produkowanych przez
Mucor microsporus Nam.

BOGUSŁAW NARZYMSKI, JADWIGA CHMIELNICKA, HENRYK URBANEK

Instytut Biochemii i Fizjologii Uniwersytetu Łódzkiego i Zakład Bromatologii
Akademii Medycznej w Łodzi

Narzymski B.¹, Urbanek H.¹, Chmielnicka J.², (¹Institute of Biochemistry and Physiology, University of Łódź, 90-237 Łódź, Nowopółdnio-wa 12/16; ²Department of Bromatology Medical Academy, 90-145 Łódź, Narutowicza 120a): *Conditions influencing the synthesis of alkaline proteinases by Mucor microsporus* Nam. Acta Mycol. X(2):295-304, 1974.

Maximal proteolytic activity at pH 8 was noted in the culture filtrate from *Mucor microsporus* when the medium contained: 30 g maltose, 10 g pepsine peptone, 5 g CaCO₃, 1 g KN₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.05 g FeSO₄, 0.05 g ZnSO₄, 0.05 g MnCl₂ in 1 l. water.

WSTĘP

Proteinazy grzybów, tak jak i bakterii wykazują szerokie specyficzności w stosunku do substratów, a zakres ich działania w zależności od pH mieści się w granicach 1,8-10,5 (Konowalów 1972). Najwięcej uwagi poświęcono proteinazom różnych gatunków grzybów z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*.

Badano również proteinazy niektórych gatunków grzybów z rodzaju *Mucor* (Koch, Dedic 1957; Sarbhoy 1965; Shu-Chen Sung 1965; Veselov, Mosicev, Tipograf 1968). Enzymy te wytwarzane przez *Mucor pusillus* Lindt., wykazujące wysoką specyficzność w ścinaniu mleka nazwano renninopodobnymi enzymami (Richardson, Nelson, Lubnow, Schwarberg 1967; Arima, Iwasaki, Tamura, Yu 1967, 1968, 1969; Itoh, Thomasov 1971). *Mucor pusillus* jest zdolny również do syntezy kwaśnej proteinazy hydrolizującej kazeinę i hemoglobinę (Somkuti, Babel 1967, 1968, 1969). Kwaśną proteinazę wyodrębniono także z grzybni *Mucor hiemalis* Wehmer (Wang 1967). Proteinazy neutralne natomiast wytwarza *Mucor miehei* Cooney et Emerson (Prinz, Nelsen 1970; Martin, Ric-

kert 1970). Jak wynika z dotychczasowych badań biosynteza enzymów proteolitycznych przez różne gatunki grzybów jest uzależniona od składu pożywki i warunków hodowli.

W poprzedniej pracy (Narzyski, Urbanek 1971) stwierdzono, że niektóre gatunki z rodzaju *Mucor* wykazują zdolność produkowania enzymów proteolitycznych o wysokiej aktywności w zakresie o pH 6. Aktywność ta nie zawsze odpowiadała zdolności do koagulacji kazeiny.

Celem pracy było dobranie takich warunków hodowli dla grzybów z rodzaju *Mucor*, aby stworzyć dla nich możliwość biosyntezy enzymów proteolitycznych o optymalnym działaniu w pH alkalicznym.

MATERIAL I METODY BADAŃ

Do badań użyto 13 gatunków grzybów z rodzaju *Mucor*, które otrzymano z Zakładu Systematyki i Geografii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego. Szczepy te były uprzednio wyizolowane z różnych stanowisk w Puszczy Kampinoskiej i przechowywane na skosach agarowych z brzeczką.

W celu uzyskania zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych kultury hodowano włąębnie w płaskodennych kolbach o pojemności 500 ml, początkowo stosując pożywkę Czapka (w objętości 100 ml pożywki płynnej) z dodatkiem 1% kazeiny zamiast KNO_3 oraz 3% sacharozy zamiast glukozy. Hodowlę prowadzono na wytrząsarkach (150 cykli/min) w temp. 28°C w ciągu 72 godzin. Do określenia aktywności proteolitycznej użyto filtrat otrzymany po odwirowaniu (5000 obr./min) grzybní. Aktywność tą oznaczano zmodyfikowaną metodą Ansona (Petrova, Wintsyunaite 1966). Odmierzano 1 ml odwirowanego filtratu, który inkubowano w ciągu 10 min w temp. 30° z 2 ml 2% roztworu kazeiny w buforze uniwersalnym wg Theorella i Stenghagena o pH 8,0, po czym dodawano 1 ml 5% kwasu trójchlorooctowego i sączono po 10 min przez miękkí sączek. W przesączu oznaczano produkty hydrolizy białka rozpuszczalne w 5% kwasie trójchlorooctowym, za pomocą odczynnika Folina. Aktywność wyrażano w jednostkach na ml. Za jednostkę przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 min powoduje przyrost substancji rozpuszczalnych w 5% kwasie trójchlorooctowym odpowiadających jednemu mikroekwiwalentowi tyrozyny. Gęstość optyczną mierzono na spektrofotokolorymetrze „Spekol” przy dł. fali 750 mm, grubości kjuwety 1 cm.

W celu sprawdzenia wpływu pożywki na maksymalną aktywność proteolityczną *Mucor microsporus* Nam., do pożywki Czapka dodawano, zamiast KNO_3 , różne związki azotowe pochodzenia organicznego, a mianowicie: kazeinę (BDH Anglia), aminobak, peptobak (Bacutil), pepton pepsynowy, bulion mięsny (Wytwórnia Surowic i Szczepionek), hemo-

globinę wołową (Biomed), ekstrakt drożdżowy (Gurr Anglia), bacto-pepton, bacto-protone, bacto-tryptone, bacto-tryptoze, casitone, neopepton, żelatynę, hydrolizat enzymatyczny kazeiny (Difco USA). Po ustaleniu najodpowiedniejszego źródła azotu do pożywki zastosowano kolejno zamiast sacharozy: celbiozę (Bioddle Sawyer Co. Ltd.), fruktozę, galaktozę, glukozę, laktozę, maltozę, ramnozę, skrobię (POCh Gliwice), mannitol i sorbitol (Gławchimreaktiv ZSRR). W końcu zbadano również wpływ różnych stężeń CaCO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (POCh-Gliwice).

Tabela 1 — Table 1
Aktywność proteolityczna filtratów grzybów różnych gatunków grzybów z rodzaju *Mucor*
Proteolytic activity of the filtrates of various strains of the genus *Mucor*

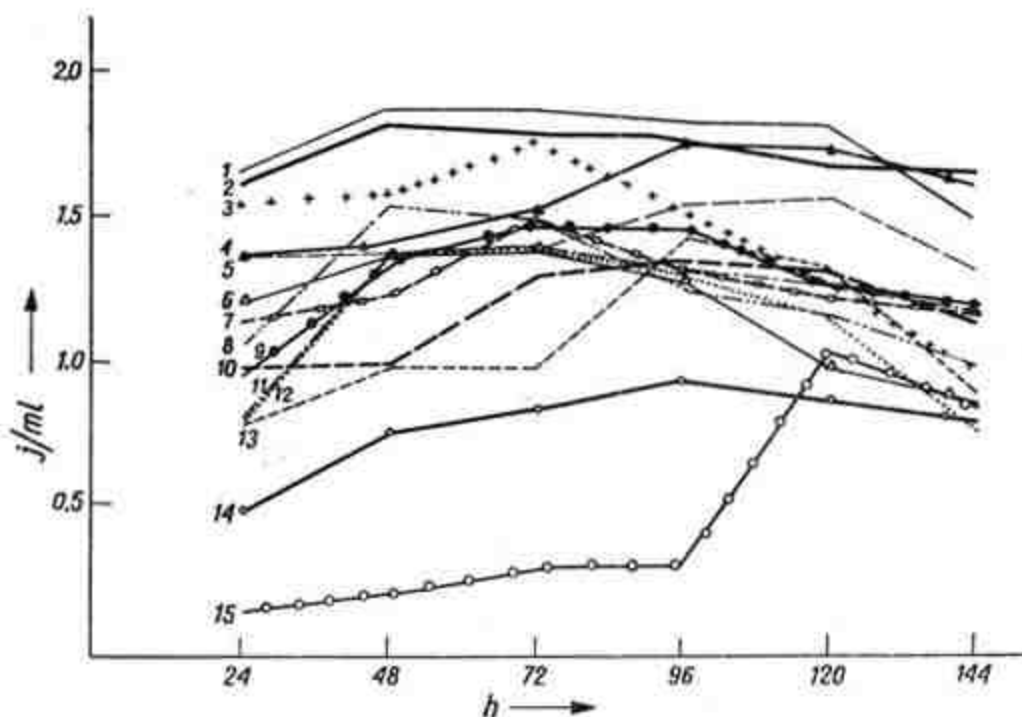
Gatunek — Species	j/ml
<i>Mucor albus</i> Pisp.	0,56
<i>Mucor flavus</i> Bain	0,53
<i>Mucor griseocyaneus</i> Hag.	0,35
<i>Mucor genevensis</i> Lend.	0,80
<i>Mucor hiemalis</i> Wehm.	0,28
<i>Mucor microsporus</i> Nam.	1,80
<i>Mucor mucedo</i> (L.) Fres.	0,07
<i>Mucor musorum</i> Naum.	1,26
<i>Mucor plumbus</i> Bon.	1,24
<i>Mucor plumbeus</i> Bon.	1,13
<i>Mucor racemosus</i> Fres.	0,02
<i>Mucor strictus</i> Hag.	0,97
<i>Mucor varians</i> Pov.	0,53

Następnie na pożywce o ustalonym optymalnym składzie zbadano: 1 — wpływ czasu hodowli na aktywność proteolityczną i przyrost biomasy *M. microsporus* i w tym celu założono doświadczenie w 45 kolbach (w określonych odstępach czasu oznaczano poziom tych wielkości, każdorazowo w 3 kolbach, przy czym — jako miernika przyrostu biomasy używano suchą masę otrzymaną po 12-godzinnym suszeniu grzybni w temp. 105°C); 2 — wpływ inoculum (zarodniki, których ilość obliczano w komorze Thoma) na aktywność proteolityczną oraz inoculów pobieranych z różnowiekowych (48-170-godzinnych) kultur standardowych *M. microsporus*, przy czym w obu wypadkach aktywność tą oznaczano po 72 godzinach.

WYNIKI BADAŃ

Spośród 13 przebadanych gatunków rodzaju *Mucor* największą dynamikę wydzielania zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych do

podłoża odznaczał się *Mucor microsporus* (tab. 1). Gatunek ten został wybrany do dalszych doświadczeń, które polegały na dobraniu odpowiedniego składu pożywki oraz warunków hodowli optymalnych dla



Ryc. 1. Wpływ związków azotowych pochodzenia organicznego na aktywność proteolityczną j/ml w filtracie kultury *Mucor microsporus*

1 — pepton pepsynowy, 2 — kazeina, 3 — aminobac, 4 — żelatyna, 5 — bulion mięsny, 6 — ekstrakt drożdżowy, 7 — hydrolizat enzymatyczny kazeiny, 8 — baktopepton, 9 — baktotryptozą, 10 — casiton, 11 — peptobac, 12 — baktotrypton, 13 — hemoglobina, 14 — neopepton, 15 — bacto-proton

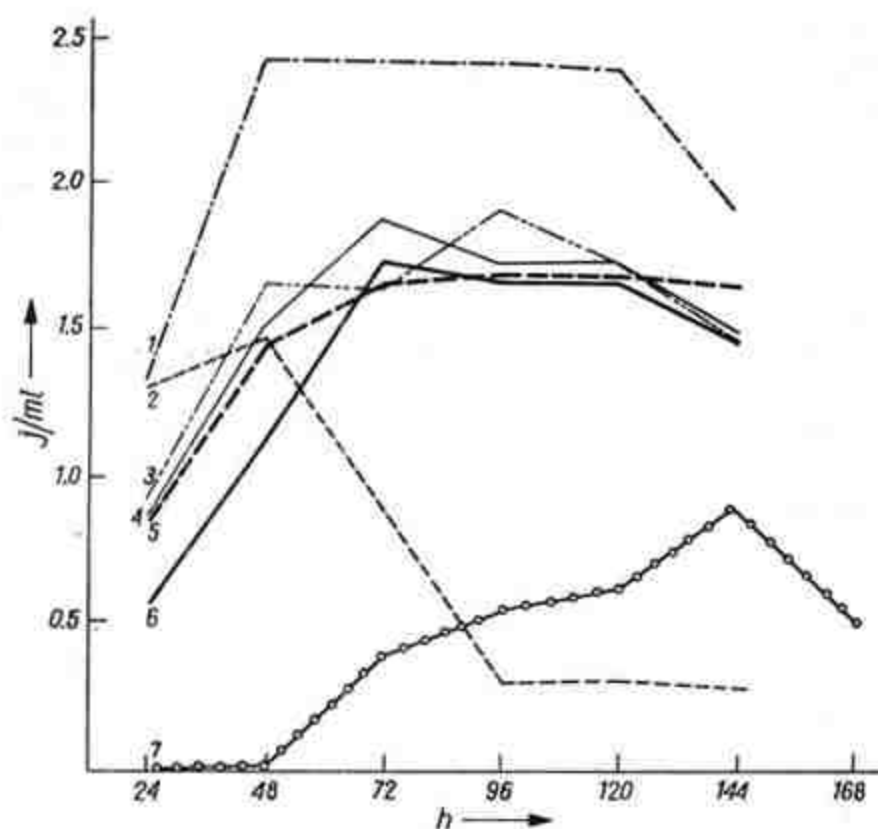
Effect of organic nitrogen compounds on proteolytic activity (u/ml) in filtrate of *Mucor microsporus*

1 — pepsin peptone, 2 — casein, 3 — aminobac, 4 — gelatine, 5 — infusion broth, 6 — yeast extract, 7 — casein enzymatic hydrolysate, 8 — bacto-peptone, 9 — bacto-tryptone, 10 — casitone, 11 — peptobac, 12 — bacto-tryptone, 13 — haemoglobin, 14 — neopeptone, 15 — bacto-proton

biosyntezy enzymów proteolitycznych o alkalicznym zakresie działania pH.

Zmieniając azot pochodzenia nieorganicznego w pożywce Czapka na związki azotowe pochodzenia organicznego stwierdzono (ryc. 1), że pepton pepsynowy powodował w filtracie największą aktywność proteolityczną utrzymującą się na niezmiennym poziomie w ciągu 120 godzin. Zbliżone wyniki doświadczeń uzyskano również dla kazeiny jako źródła azotu. Najniższe wyniki uzyskano natomiast w przypadku stosowania neopeptonu i bacto-protonu.

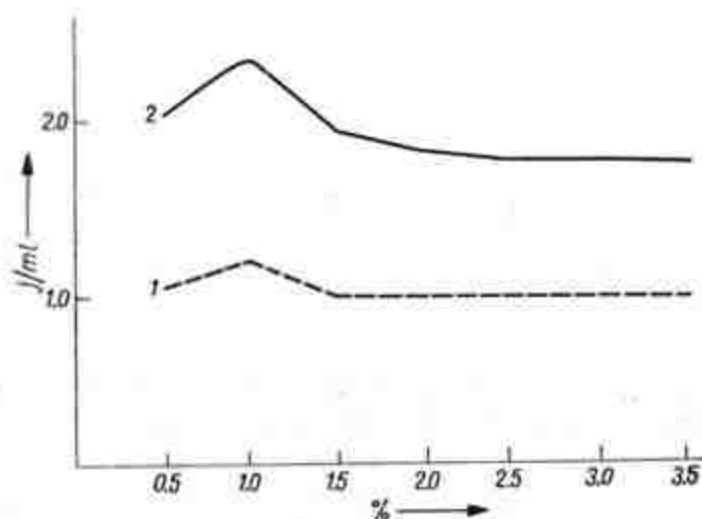
Rycina 2 obrazuje wpływ różnych węglowodanów na dynamikę wydalenia enzymów proteolitycznych przez *Mucor microsporus*. Najwięk-



Ryc. 2. Wpływ węglowodanów na aktywność proteolityczną (j/ml) w filtracie kultury *Mucor microsporus*

1 — maltoza, 2 — glukoza, 3 — sacharoza, 4 — skrobia, 5 — mannitol, 6 — celobioza, 7 — rhamnoza
Effect of carbohydrates on proteolytic activity (u./ml) in filtrate of *Mucor microsporus*

1 — maltose, 2 — glucose, 3 — saccharose, 4 — starch, 5 — mannitol, 6 — celobiose, 7 — rhamnose



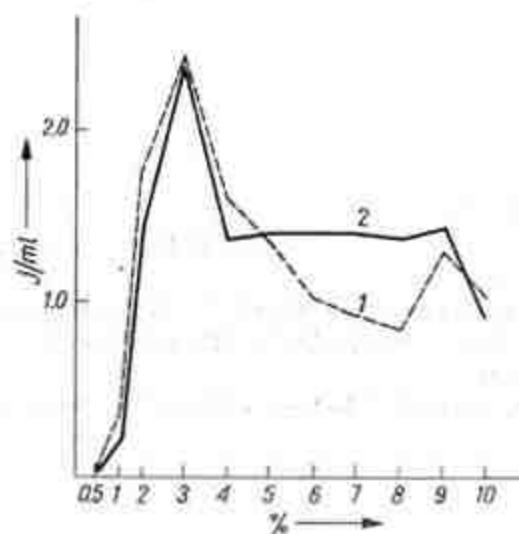
Ryc. 3. Aktywność proteolityczna (j/ml) filtratu kultury *Mucor microsporus* w zależności od stężenia peptonu pepsynowego

1 — czas hodowli 24 godziny, 2 — czas hodowli 48 godzin

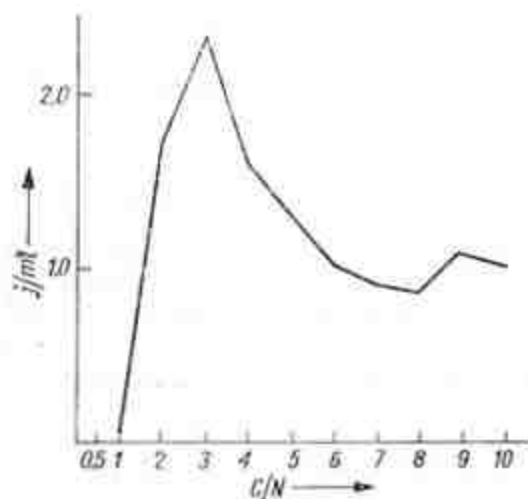
Proteolytic activity (u./ ml) in filtrate of *Mucor microsporus* versus concentration of peptone-pepsine

szy wzrost aktywności proteolitycznej uzyskano stosując maltozę. O około 40% niższą aktywność stwierdzono w przypadku stosowania: skrobi, sacharozy, celobiozy i mannitolu. Bardzo niekorzystnym źródłem węgla okazała się glukoza, bowiem aktywność proteolityczna gwałtownie spadała już po 48 godzinach. Nie stwierdzono aktywności proteolitycznej w okresie 148 godz w obecności galaktozy, fruktozy, laktozy i sorbitolu w filtracie.

Największą aktywność proteolityczną w filtracie w różnych odstępach czasu hodowli *M. microspor* uzyskano używając jako źródło azotu w pożywce pepton pepsynowy w ilości 1% (ryc. 3), a jako źródło węgla — maltozę w ilości 3% (ryc. 4). Przeprowadzone obliczenia na podstawie stosowanych w doświadczeniach stężeń węgla i azotu wykazały, że badana grzybnia odznacza się największą aktywnością proteolityczną wówczas, gdy stosunek C/N w pożywce wynosi: 3:1 (ryc. 5).



Ryc. 4



Ryc. 5

Ryc. 4. Aktywność proteolityczna (j/ml) filtratu kultury *Mucor microspor* w zależności od stężenia maltozy

1 — czas hodowli 48 godzin, 2 — czas hodowli 120 godzin

Proteolytic activity (u./ml) in filtrate of *Mucor microspor* in versus maltose concentration

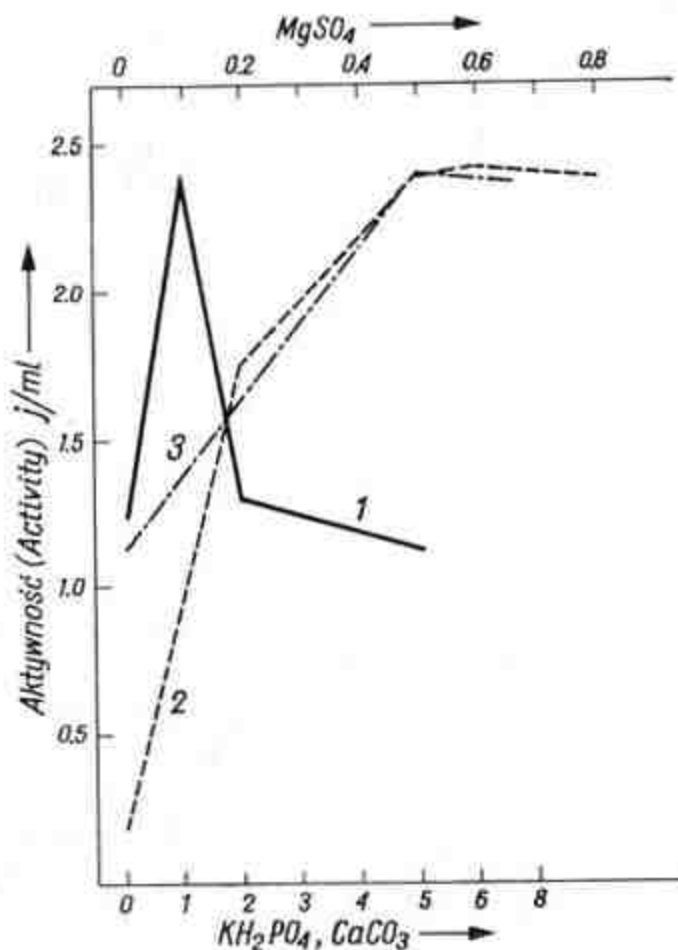
Ryc. 5. Aktywność proteolityczna (j/ml) w filtracie kultury *Mucor microspor* w zależności od stosunku węgla do azotu w pożywce

Proteolytic activity (u./ml) in filtrate of *Mucor microspor* versus to C/N in medium

Opierając się na tych parametrach w dalszych badaniach stwierdzono, że duży wpływ na aktywność proteolityczną enzymów filtratu wywierały różne stężenia $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 i $CaCO_3$ (ryc. 6). Optymalne granice stężenia dla KH_2PO_4 były bardzo wąskie, największą aktywność uzyskano w przypadku 0,1% stężenia KH_2PO_4 . Prawie identyczne wy-

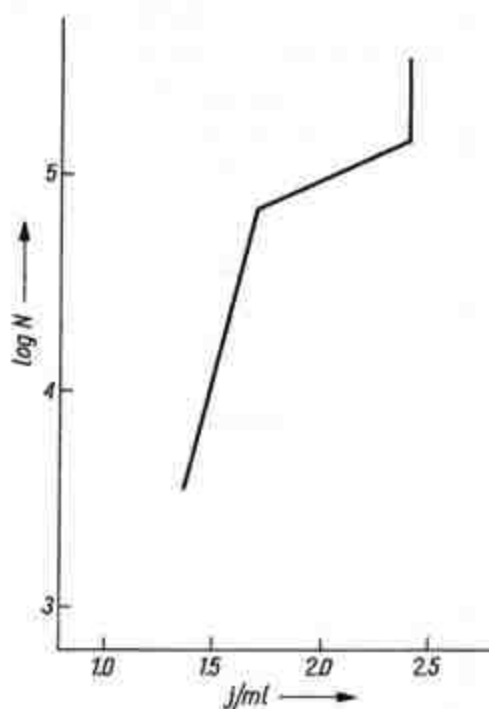
niki uzyskano stosując KH_2PO_4 . Aktywność proteolityczna była również uzależniona od stężenia CaCO_3 . Największą aktywność uzyskano w granicach 0,5-0,6% CaCO_3 w pożywce. Siarczan magnezu użyty w stężeniu 0,05% gwałtownie zmieniał tą aktywność. Optymalne stężenie tego związku w pożywce powinno się znajdować w granicach 0,05-0,07%.

Ryc. 6. Wpływ różnych stężeń substancji mineralnych na aktywność proteolityczną filtratu *Mucor microsporus*
Effect of various concentration of mineral substances on proteolytic activity of *Mucor microsporus*
1 — KH_2PO_4 , 2 — CaCO_3 , 3 — $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



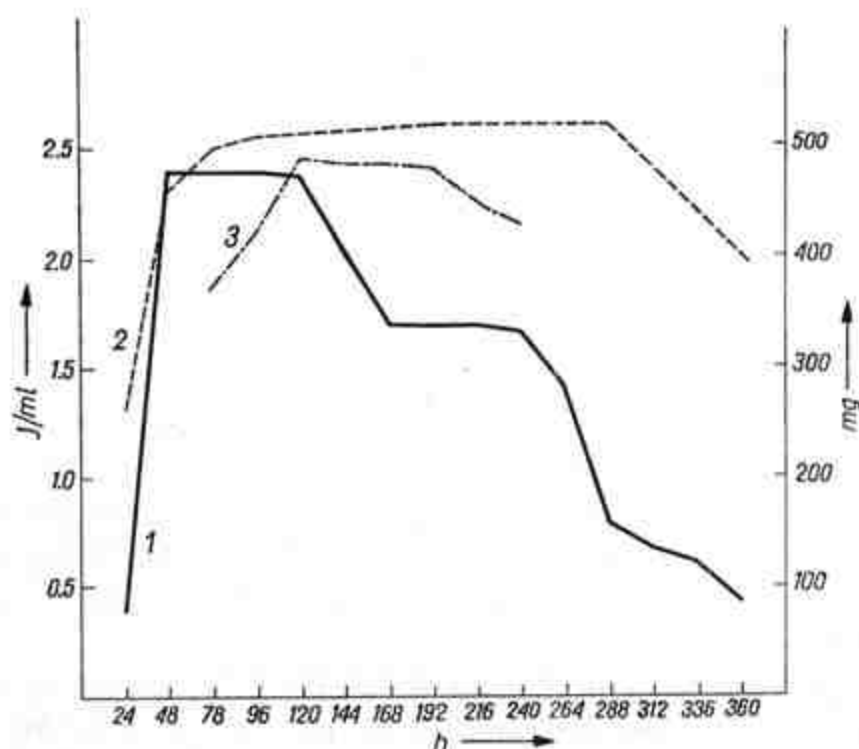
Rycina 7 obrazuje zmiany aktywności proteolitycznej filtratu w zależności od ilości zarodników użytych jako inokulum. Maksymalną aktywność uzyskano w przypadku, gdy jako inokulum użyto zarodników w ilości od $1,4-3,5 \cdot 10^6$ na 1 ml pożywki.

Stosując pożywkę o ustalonym doświadczalnie optymalnym składzie dla *Mucor microsporus* oraz określone stężenie zarodników, założono hodowlę tego grzyba w 45 kolbach. Pożywkę zakażono inokulum pobranym z 5-dniowej kultury standardowej. Następnie co 24 godziny w filtracie z trzech kolb oznaczano aktywność proteolityczną oraz zawartość suchej substancji. Jak widać z ryc. 8 aktywność proteolityczna wzrastała gwałtownie w ciągu 48 godzin po założeniu hodowli i utrzymywała się na tym poziomie w ciągu 120 godzin po czym gwałtownie spadała. Nato-



Ryc. 7. Aktywność proteolityczna (j/ml) filtratu kultury *Mucor microsporus* w zależności od ilości spor (N) użytych jako inoculum na ml pożywki

Proteolytic activity (u/ml) in filtrate of *Mucor microsporus* versus number of spores (N) used as inoculum in 1 ml medium



Ryc. 8. Zmiany aktywności proteolitycznej (j/ml) i biomasy (mg) *Mucor microsporus* w zależności od czasu hodowli węgłnej i wieku kultury standardowej
1 — aktywność proteolityczna, 2 — sucha masa grzybnii, 3 — aktywność proteolityczna w zależności od wieku hodowli standardowej

Proteolytic activity (u/ml) and biomass (mg) of *Mucor microsporus* versus time of culture and age of standard culture

1 — proteolytic activity, 2 — dry mass of mycelium, 3 — proteolytic activity versus age of standard culture

miast masa grzybowa osiągnięta w ciągu 48 godz hodowli utrzymywała się prawie na tym samym poziomie przez dalsze 9-10 dni. Rycina 8 przedstawia również zmiany aktywności proteolitycznej w zależności od wieku hodowli standardowej, z której pobierano grzybnię do inokulowania pożywki. Jak widać z ryciny 8 największą aktywność proteolityczną filtratu uzyskano używając jako inokulum grzybnię z 120-192-godzinnej kultury standardowej *Mucor microsporus*.

STRESZCZENIE

Spośród 13 przebadanych gatunków z rodzaju *Mucor* stwierdzono, że największą aktywnością proteolityczną przy pH 8,0 odznacza się *Mucor microsporus*. Zbadano wpływ różnych organicznych związków azotowych, węglowodanów i niektórych substancji mineralnych na dynamikę wydzielania proteinaz do pożywki. Ustalono optymalne warunki rozwoju mikroorganizmów w zależności od składu pożywki. Największą aktywność proteolityczną uzyskano, stosując jako zaszczep spory w stężeniu $1,4-3,5 \cdot 10^6$ /ml pożywki i używając 120-192-godzinnej hodowli standardowej *Mucor microsporus*.

LITERATURA

- Arima K., Iwasaki S., Tamura G., 1967, Milk clotting enzyme from microorganisms. I screening test and the identification of the potent fungus, *Agr. Biol. Chem.* 31: 540-545.
- Arima K., Yu J., Iwasaki S., Tamura G., 1968, Milk clotting enzyme from microorganisms. V purification and crystallization of *Mucor* rennin from *Mucor pusillus* Lindt. var., *Appl. Microbiol.* 16: 1727-1731.
- Itoh T., Thomasow J., 1971, Action rennet and other clotting enzymes on casein fractions, *Milchwissenschaft* 26: 671-680.
- Iwasaki S., Tamura G., Arima K., 1967, Milk clotting enzyme from microorganisms. II the enzyme production and properties of crude enzyme, *Agr. Biol. Chem.* 41: 546-551.
- Koch O. G., Dedic G. A., 1957, Beitrag zur proteolytischen Aktivität von Schimmelpilzen, *Biochem. Zeitschr.* 328: 536-540.
- Konovalov S. A., 1972, Biosintez fermentov mikroorganizmami, Moskva.
- Martim O., Rickert W., 1970, The isolation and partial characterization of an acid protease produced by *Mucor miehei*, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 37: 301-307.
- Narzyski B., Urbanek H., 1971, Porównanie aktywności proteolitycznej różnych gatunków grzybów, *Zesz. Nauk. Uniw. Łódzkiego ser. II, zes. 42*: 69-74.
- Petrova I. S., Vintsyunaite M. N., 1966, Opređenje proteolitičeskoj aktivnosti fermentnych preparatov plesnevych gribov, *Prikl. Bioch. Mikrobiol.* 2: 322-327.
- Prins J., Nielsen T. S., 1970, Microbial rennet *Mucor miehei*, *Process Biochem.* 5: 34-35.
- Richardson G. H., Nelson J. H., Lubnow R. E., Schwarberg R. L., 1970, Rennin like enzyme from *Mucor pusillus* for cheese manufacture, *J. Dairy Sci.* 50: 1066-1069.

- Sarbhoy A. K., 1965, Nutritional studies on some members of the Mucorales, Pathol. Microbiol. 28: 816-820.
- Somkuti G. A., Babel F. J., 1967, Conditions influencing the synthesis of acid protease by *Mucor pusillus* Lindt., Appl. Microbiol. 15: 1309-1312.
- Somkuti G. A., Babel F. J., 1968, Purification and properties by *Mucor pusillus* acid protease, J. Bacteriol. 95: 1407-1414.
- Somkuti G. A., Babel F. J., 1968, Acid protease synthesis by *Mucor pusillus* in chemically defined media, J. Bacteriol. 95: 1415-1417.
- Somkuti G. A., Babel F. J., 1969, Production of *Mucor pusillus* acid protease in reconstituted whey, J. Dairy Sci. 52: 535-536.
- Veselov I. J., Mosicev M. S., Tipograf P. J., 1968, Proteolitičeskaja i sy-čužnaja (rennin) aktivnost mokorovyh gribov, Mikrobiologija 37: 616-621.
- Wang H. L., 1967, Release of proteinase from mycellium of *Mucor hiemalis*, J. Bacteriol. 93: 1794-1799.
- Yu J., Tamura G., Arima K., 1968, Studies on active site of *Mucor* rennin and reaction of Ca ion on milk coagulation. Agr. Biol. Chem. 32: 1048-1053.
- Yu J., Tamura G., Arima K., 1969, Milk clotting enzyme from microorganisms. VI properties of crystalline milk clotting enzyme (*Mucor rennin*) isolated from *Mucor pusillus* var. Lindt., Biochem. Biophys. Acta 171: 138-144.