



Próby stymulacji zewnątrzkomórkowego wydzielania beta-galaktozydazy syntetyzowanej przez drożdże *Kluyveromyces fragilis 28*

Anna Demczuk, Jadwiga Kowalewska-Piontas
Włodzimierz Bednarski

Katedra Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Trials of stimulation of extracellular secretion of beta-galactosidase synthesised by *Kluyveromyces fragilis 28*

Summary

To induce extracellular secretion of beta-galactosidase synthesised by *Kluyveromyces fragilis 28* yeasts, we used: glycin, L-asparagine, L-leucine, dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, cetyldimethylethylammonium bromide, penicillin G and glycolipids from *Candida antarctica*.

The highest increase in the secretion of beta-galactosidase was obtained in the yeast culture cultivated in the medium with polypeptone when glycin was used as the secretion inductor. The extracellular activity of beta-galactosidase reached 0.416 A.U./ml, and was 10-fold higher than the beta-galactosidase activity reported in the control group.

Key words:

beta-galactosidase, secretion, *Kluyveromyces fragilis*, yeast.

1. Wstęp

Laktoza jest głównym cukrem występującym w mleku ssaków. Enzym beta-galaktozydaza (beta-D-galaktozyd galaktohydrolaza, EC 3.2.1.23) katalizuje hydrolizę tego cukru do glukozy

Adres do korespondencji

Anna Demczuk,
Katedra Biotechnologii
Żywności,
Wydział Nauki o Żywności,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Heweliusza 1,
10-759 Olsztyn-Kortowo.

i galaktozy, dwóch monosacharydów, które są słodsze, łatwiej przyswajalne przez organizm człowieka i lepiej rozpuszczalne niż laktoza. Reakcją towarzyszącą hydrolizie jest transgalaktozylacja prowadząca do powstania galaktooligosacharydów znajdujących coraz większe zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz medycynie.

Drożdże, m.in. *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis* syntetyzują beta-galaktozydazę w strukturach wewnątrzkomórkowych, a jej ekstrakcja jest procesem czasochłonnym i kosztochłonnym. W celu zmniejszenia kosztów produkcji preparatów enzymatycznych preferowane są mikroorganizmy syntetyzujące enzymy zewnątrzkomórkowe. Istnieje wówczas możliwość immobilizacji całych komórek drobnoustrojów wydzielających enzym poza komórkę. Poszukuje się metod indukcji sekrecji beta-galaktozydazy do pożywki.

Jednym z najczęściej stosowanych czynników indukujących sekrecję beta-galaktozydazy jest glicyna (1-5). Zainteresowanie budzi również zastosowanie innych aminokwasów jak: prolina, cysteiny, alaniny, leucyny, asparaginy (3,4,6). Prowadzone są próby użycia antybiotyków: kolistyny, bacytracyny, penicyliny (Ikura) i detergentów jak bromku cetylotrimetyloamoni (7).

W pracy oznaczano wpływ glicyny, L-asparaginy, L-leucyny, N,N-dimetyloformidu (DMF), dimetylosulfotlenku (DMSO), bromku cetylodimetyloetyloamoni (CDAB), penicyliny G oraz glikolipidów z *Candida antarctica* na indukcję zewnątrzkomórkowego wydzielania beta-galaktozydazy z *Kluyveromyces fragilis* 28.

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizm

W badaniach stosowano szczep *Kluyveromyces fragilis* 28 otrzymany z kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Czystą kulturę drożdży prowadzono na skosach agar-serwatka w 30°C przez 48 godzin.

2.2. Skład pożywek

Pożywka nr 1 o składzie (g/litr): permeat po UF mleka, 50 g; ekstrakt drożdżowy, 1 g; K_2HPO_4 , 2 g; $NH_4H_2PO_4$, 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g.

Pożywka nr 2 o składzie (g/litr): laktoza, 15 g; pepton K, 5 g; ekstrakt drożdżowy 5 g; K_2HPO_4 , 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,02 g.

2.3. Przygotowanie inokulum

W celu przygotowania inokulum użyto pożywkę nr 1. Pożywkę odbiałczano metodą termiczną przez ogrzewanie w 90°C przez 20 minut, ochłodzenie i sączenie. Następnie pożywkę rozlano po 100 ml do kolb stożkowych o pojemności 500 ml, wyjaławiano ją w 117°C przez 20 minut. Po ochłodzeniu pożywkę zaszczepiano zmywem biomasy ze skosów. Inokulum prowadzono metodą wstrząsaną w wytrząsarce typu G-25 (New Brunswick) przy szybkości wstrząsania 250 obr/min w temperaturze 30°C przez 24 godziny.

2.4. Warunki hodowli drożdży

Hodowlę *Kluyveromyces fragilis* 28 prowadzono w pożywce nr 1 oraz w pożywce nr 2. Pożywki rozlewano po 200 ml do kolb stożkowych o pojemności 500 ml, wyjaławiano je w 117°C przez 20 minut. Dodano następujące ilości induktorów sekcji: aminokwasy 0,8, 1,0, 1,2 [%]; penicylina G 10, 20, 50 [µg/ml podłoża]; DMSO i DMF 0,10, 0,25, 0,50 [%]; CDAB i glikolipidy z *C. antarctica* 10, 20, 50 [µg/100 ml podłoża]. Glicynę oraz inne dodatki dodawano przez filtr mikrobiologiczny (Millex – GP, 0,22 µl). Inokulum drożdży dodawano w ilości 5% (v/v). Hodowlę mikroorganizmów prowadzono metodą wstrząsaną w wytrząsarce typu G-25 (New Brunswick) przy szybkości wstrząsania 250 obr/min w temperaturze 30°C przez 72 godziny. Ponadto, w celu określenia wpływu warunków hodowli na wydzielanie zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy prowadzono hodowlę metodą wstrząsaną w pożywce nr 2 z dodatkiem glicyny (0,8%) lub asparaginy (1,2%) lub DMF(0,25%) lub CDAB (50 µg/100 ml pożywki) w warunkach jw. przez 120 godzin, pobierając próby co 24 godziny.

2.5. Otrzymywanie preparatu beta-galaktozydazy

Po zakończeniu hodowli drożdży całość wirowano w wirówce typu IEC PR-7000 M w warunkach: 5000 obr/min przez 10 min. W płynie hodowlanym po oddzieleniu biomasy drożdży (preparat zewnątrzkomórkowy) oznaczano aktywność beta-galaktozydazy z o-nitrofenylo-beta-D-galaktopiranozydem (ONPG).

Aktywność beta-galaktozydazy oznaczano przez pomiar spektrofotometryczny ilości o-nitrofenolu uwolnionego w wyniku działania enzymu na roztwór ONPG. Za jednostkę aktywności beta-galaktozydazy przyjęto dawkę enzymu, która w warunkach oznaczenia (temperatura 38°C, pH 6,8, czas reakcji 10 minut) uwalnia 1 µmol o-nitrofenolu/minutę.

2.6. Odczynniki

Penicylinę G, DMSO, DMF, CDAB, glicynę, L-asparaginę, L-leucynę i (NPG otrzymano z Sigma Co., ekstrakt drożdżowy z Merck, pepton K z BTL spółka z o. o. Zakład Enzymów i Peptonów.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Wpływ składu pożywki na sekrecję zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy

W badaniu wpływu składu pożywki na sekrecję zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy wykazano, że składniki pożywki nr 2 zawierającej polipeptoi stymulują sekrecję beta-galaktozydazy na zewnątrz. Po hodowli drożdży na pożywce nr 1 nie stwierdzono aktywności zewnątrzkomórkowej enzymu. Można zatem wnioskować, że obecność polipeptonu, a dokładniej zawartych w nim peptydów, jest niezbędna dla wydzielania beta-galaktozydazy na zewnątrz komórek drożdży (rys. 1).

3.2. Wpływ aminokwasów

Dodatek glicyny do pożywki pozytywnie wpływa na wydzielanie beta-galaktozydazy na zewnątrz komórek. Aktywność preparatu zewnątrzkomórkowego wzrasta nawet 10-krotnie w porównaniu do aktywności enzymu zewnątrzkomórkowego w hodowli kontrolnej. Najkorzystniejszy jest 0,8% dodatek glicyny do pożywki.

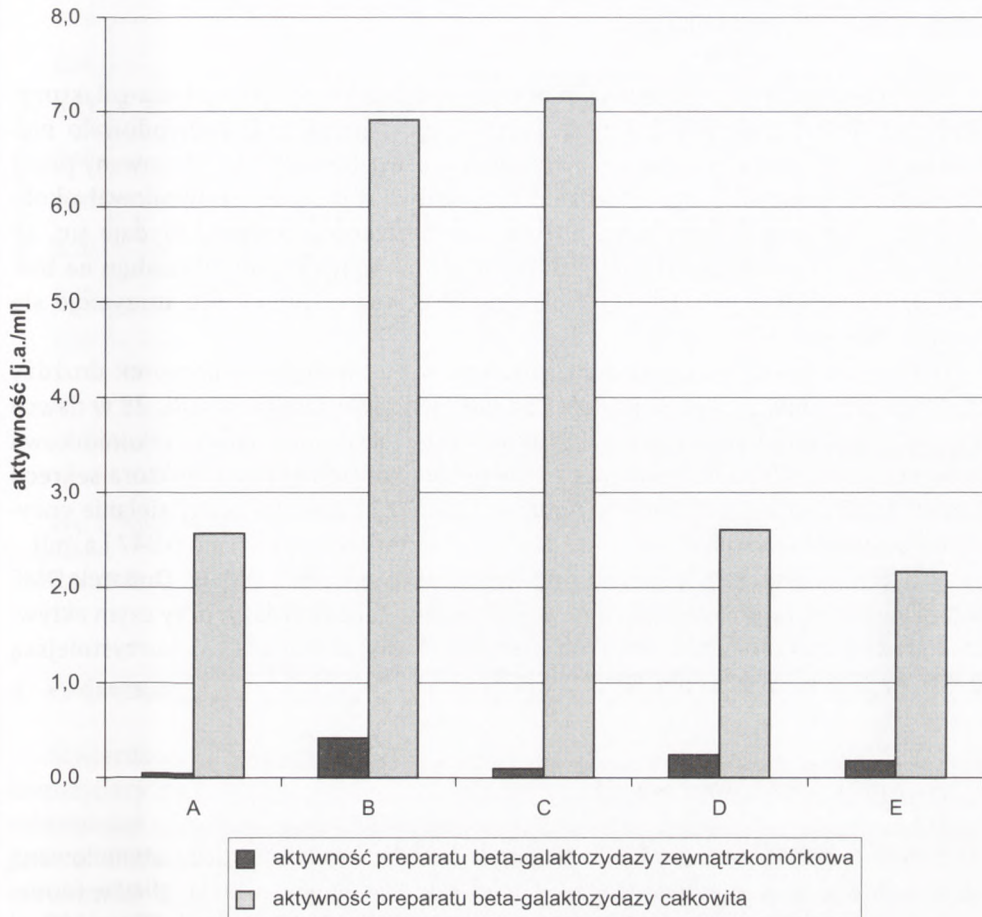
Takie działanie glicyny (stymulacja sekrecji) znajduje potwierdzenie w literaturze (3). Należy jednak zauważyć, że w pracach Ariga (1) i Mayashiro (4) odnotowano odpowiednio zmniejszenie lub brak znaczących zmian w ogólnej produkcji białka w obecności glicyny, natomiast jest widoczny wzrost aktywności zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy. Trudno jednoznacznie określić przyczyny tych zmian. Świadczą one o różnej reakcji drobnoustrojów na obecność glicyny w pożywce.

Glicyna najprawdopodobniej zmienia strukturę ściany komórkowej, zwiększając jej przepuszczalność.

Glicynę zastąpiono aminokwasami: asparaginą i leucyną. Zostały one wybrane, ponieważ uważa się, że są one inhibitorami kompetytywnymi podczas syntezy ściany komórkowej (1).

Dodatek asparaginy zwiększa aktywność beta-galaktozydazy zewnątrzkomórkowej. Najwyższy wzrost (4,2-krotny w porównaniu do aktywności enzymu zewnątrzkomórkowego w próbie kontrolnej) uzyskano w hodowli na pożywce z 1,2% dodatkiem tego aminokwasu.

Leucyna nie wpływa na sekrecję enzymu zewnątrzkomórkowego.



Rys. 1. Wpływ składu pożywki na biosyntezę zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy syntetyzowanej przez *Kluyveromyces fragilis* 28.

Pożywka: A – kontrolna, B – z dodatkiem glicyny 0,8%, C – z dodatkiem asparaginy 1,2%, D – z dodatkiem DMF 0,25%, E – z dodatkiem CDAB 50 μ g/100 ml pożywki.

3.3. Wpływ detergentów

Komórki *K. fragilis* traktowane przez Bachhawata (7) kationowym detergentem bromkiem cetylotrimetyloamonu (CTMB), charakteryzowały się nawet 400-krotnym wzrostem aktywności komórkowej beta-galaktozydazy. W naszych badaniach dodatek CDAB w ilości 50 μ g/100 ml pożywki zwiększa sekrecję beta-galaktozydazy na zewnątrz 4,2-krotnie w stosunku do sekrecji enzymu występującej w hodowli kontrolnej.

Zastosowano również glikolipidy z *Candida antarctica*, jako detergent pochodzenia mikrobiologicznego. Stwierdzono, że nie indukuje on sekrecji beta-galaktozydazy zewnątrzkomórkowej.

3.4. Wpływ innych dodatków

Ikura (3) obok aminokwasów jako potencjalne induktory sekrecji beta-galaktozydazy zastosował antybiotyki. Użycie przez niego penicyliny G spowodowało nieznaczny (0,3-krotny) wzrost sekrecji enzymu na zewnątrz komórki. Stosowany przez nas dodatek penicyliny w porównaniu do hodowli kontrolnej spowodował około 2-krotne zwiększenie aktywności enzymu zewnątrzkomórkowego. Wydaje się, że wielkość dawki penicyliny (10 lub 20 lub 50 $\mu\text{g/ml}$ pożywki) nie oddziałuje na biosyntezę beta-galaktozydazy, której aktywność zewnątrzkomórkowa utrzymuje się na poziomie ok. 0,071 j.a./ml.

DMSO jest związkiem często stosowanym w permeabilizacji komórek drożdży (8). Stwierdziliśmy, że dodatek DMSO do hodowli *Kluyveromyces fragilis* 28 w dawce 0,1 i 0,25% hamuje sekrecję beta-galaktozydazy (aktywność zewnątrzkomórkowa enzymu wynosi 0,0 j.a./ml, podczas gdy w próbie kontrolnej bez induktora sekrecji wynosi ona 0,041 j.a./ml), dopiero dodatek rzędu 0,5% umożliwia wydzielanie enzymu do pożywki (aktywność preparatu zewnątrzkomórkowego enzymu 0,047 j.a./ml).

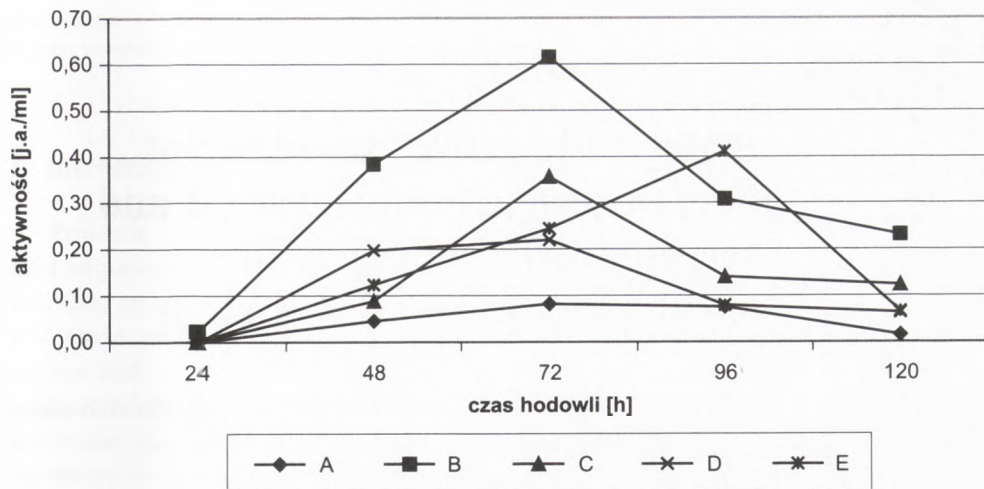
DMF to rozpuszczalnik organiczny, często używany obok DMSO. Dodatek DMF do pożywki korzystnie oddziałuje na sekrecję beta-galaktozydazy, przy czym aktywność zewnątrzkomórkowa preparatu enzymu osiąga wartość najkorzystniejszą (0,237 j.a./ml) przy stężeniu DMF 0,25%.

3.5. Wpływ warunków hodowli

Badano wpływ czasu hodowli na aktywność beta-galaktozydazy stymulowaną przez wybrane ze względu na ich indukujący sekrecję wpływ związki: glicynę (dodatek 0,8%), asparaginę (dodatek 1,2%), DMF (dodatek 0,25%), CDAB (dodatek 50 $\mu\text{g/}$ 100 ml pożywki) (rys. 2).

Aktywność beta-galaktozydazy zewnątrzkomórkowej zwiększa się w czasie osiągając wartość najwyższą po 72 godzinach hodowli, wyjątek stanowi hodowla z dodatkiem CDAB, gdzie najkorzystniejszą aktywność beta-galaktozydazy otrzymano po 96 godzinach hodowli drożdży.

Po 24 godzinach hodowli drożdży aktywność zewnątrzkomórkowa beta-galaktozydazy wystąpiła jedynie w pożywce z dodatkiem glicyny i wynosiła 0,023 j.a./ml. Po 72 godzinach tej samej hodowli odnotowano 26-krotny, tj. najwyższy wzrost aktywności beta-galaktozydazy zewnątrzkomórkowej do 0,615 j.a./ml.



Rys. 2. Wpływ czasu hodowli *Kluyveromyces fragilis* 28 na sekrecję zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy.

A,B,C,D,E – opis patrz rys. 1.

4. Podsumowanie

Stwierdzono, że związkami, które w istotny sposób stymulują sekrecję beta-galaktozydazy do pożywki są aminokwasy glicyna i asparagina. Dodatek CDAB i DMF oddziałując na strukturę ścian komórkowych drożdży również indukuje wydzielanie zewnątrzkomórkowej beta-galaktozydazy. Skuteczność oddziaływania wymienionych induktorów na sekrecję zewnątrzkomórkowego enzymu jest uwarunkowana obecnością polipeptonu w pożywce. W przypadku jego braku dodatek żadnego z wymienionych związków nie indukuje sekrecji beta-galaktozydazy do pożywki.

Badania wykonano w ramach projektu KBN 529 0702 0916.

Literatura

1. Ariga O., Watari T., Andoh Y., Fujishita Y., Sano Y., (1989), J. Ferment. Bioeng., 68 (4), 243-246.
2. Fujiyama K., Maki H., Kinoshita S., Yoshida T., (1995), FEMS Microbiol. Lett., 126, 19-24.
3. Ikura Y., (1986), Agric. Biol. Chem., 50 (11), 2747-2753.
4. Miyashiro S., Enei H., Hirose Y., Udaka S., (1980), Agric. Biol. Chem., 44 (1), 105-112.
5. Zhang N., Tsukagoshi N., Miyashiro S., Udaka S., (1983), Appl. Environmental Microbiol., 46 (1), 293-295.
6. Grones J., Bencova K., (1994), Folia Microbiol., 39 (2), 99-104.
7. Bachhawat N., Gowda L. R., Bhat S. G., (1996), Process Biochemistry, 31 (1), 21-25.
8. Kippert F., (1995), FEMS Microbiol. Lett., 128, 201-206.