

Instytut Mikrobiologii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Jan FIEDUREK

**Synteza kompleksu pektynolitycznego przez *Aspergillus niger* 71
w warunkach hodowli wgłębnej**

Синтез пектинолитического комплекса *Aspergillus niger* 71 в условиях
глубинной культуры

Pectinolytic Complex Synthesis by *Aspergillus niger* 71 under the Conditions of
a Submerged Culture

Podobnie jak w przypadku wielu innych biosyntez mikrobiologicznych, również przy otrzymywaniu pektynaz istnieje możliwość uzyskiwania wysoko wydajnych szczepów *Aspergillus niger* na drodze mutagenizacji, która może być realizowana także poprzez indukcję wielostopniową (5, 8, 11, 12, 14, 25). Wprawdzie wiąże się z tym pewne niebezpieczeństwo spadku efektywności mutagenu, co może prowadzić do dominacji mutantów negatywnych (2), jednak w odniesieniu do możliwości uzyskiwania na tej drodze szczepów aktywnych pektynolitycznie istnieją realne szanse osiągnięcia właściwej efektywności selekcji, dzięki zastosowaniu szybkiej metody wstępnego ich różnicowania (13). Oprócz odpowiedniej aktywności szczepów *A. niger*, istotny wpływ na syntezę pektynaz wywierają też określone warunki środowiskowe, takie jak skład podłoża, jego odczyn, temperatura czy czas hodowli. Przez właściwy dobór tych czynników staje się możliwe uzyskanie kompleksów enzymatycznych określonego składu, który decyduje o ich przydatności technicznej (15, 18).

Przedmiotem niniejszej pracy było określenie optymalnych warunków niezbędnych dla aktywnego działania poszczególnych enzymów kompleksu pektynolitycznego, wytwarzanego przez mutantą *A. niger* 71 (8), a także jego charakterystyka od strony dynamiki syntezy tych enzymów w procesie hodowli wgłębnej.

BADANIA WŁASNE

Do badań użyto uzyskanego wcześniej szczepu *A. niger* 71, mutantu IV stopnia, o wysokiej aktywności w zakresie syntezy poligalakturonazy. Hodowlę prowadzono metodą wgłębną na pożywce z wysłodkami (8) w kolbach o pojemności 500 ml, zawierających 100 ml pożywki, zaszczerpionej 1 ml zawiesiny konidiów, uzyskanej przez splukanie dojrzałych spor z powierzchni skosu agarowego. Zaszczepione podłoża inkubowano w ciągu 4 dni w temp. 30°C na wytrząsarce, poruszającej się z szybkością 200—220 obr./min. i przy maksymalnym wychyleniu na płaszczyźnie poziomej, wynoszącym 25 mm. Hodowlę prowadzono w trzech powtórzeniach. W podłożach hodowlanych po upływie każdej doby oznaczano: 1) zmiany odczynu, 2) zmiany zawartości białka oznaczanego metodą Schacterle'a i Pollacka (24), 3) zmiany aktywności poligalakturonazy (PG), 4) zmiany aktywności pektynoestery (PE), liazy pektynowej (PL) i pektynianowej (PAL) oraz ogólną aktywność pektynolityczną w stopniach PM (°PM).

W celu określenia optymalnych warunków działania enzymów pektynolitycznych przebadano wpływ stabilizacji odczynu mieszaniny reagującej przez następujące bufor (0,1 M): octanowy (pH 3,6—5,4), cytrynianowy (pH 4,0—6,0), fosforanowy (pH 6,0—8,0) i McIlvaine'a (pH 3,4—8,0).

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI ENZYMÓW PEKTYNOLITYCZNYCH

Aktywność PG, określana metodą Samogyi-Nelsona (20), wyrażana była za pomocą dwóch rodzajów jednostek, a mianowicie J_1PG i J_2PG . Jednostka J_1PG oznacza miligramy grup aldehydowych ($-CHO$), zaś J_2PG ilość mikrorównoważników grup aldehydowych uwalnianych przez 1 ml płynu pohodowlanego w czasie 1 min., w warunkach oznaczenia. Ponadto aktywność PG określano metodą Bugbee'a (4) na podstawie widma absorpcji produktów enzymatycznej hydrolizy 1% roztworu pektyny (Calbiochem) lub 1% kwasu poligalakturonowego (ICN) w środowisku zbuforowanym, po reakcji z 0,04 M roztworem kwasu tiobarbiturowego (TBA). Oznaczenia wykonywano na fotokolorymetrze typu „Specol 10”, przy czym aktywność PG oznaczano przy długości fali 515 nm, używając 1 ml płynu pohodowlanego wobec substratu w postaci kwasu poligalakturonowego lub stosując 4 ml tegoż płynu wobec substratu stanowiącego roztwór pektyny. Aktywność PG wyrażano w tym przypadku w jednostkach umownych (J.U.), oznaczających wartość absorpcji (godz./ml przesącza hodowlanego).

Aktywność liazy pektynowej i pektynianowej oznaczano również metodą Bugbee'a (4) przy zastosowaniu 1% roztworów: pektyny — w przypadku PL, oraz kwasu poligalakturonowego lub polipektanu sodu — w przypadku PAL, używając 1 ml płynu pohodowlanego i mierząc jego absorpcję przy długości fali 550 nm po reakcji z TBA (26). Podobnie jak w przypadku PG, aktywność tych enzymów wyrażano w jednostkach umownych (J.U.).

Aktywność PE określano metodą potencjometrycznego miareczkowania uwolnionych grup karboksylowych, powstałych w wyniku enzymatycznej deestryfikacji pektyny (3). Wyrażano ją za pomocą dwóch rodzajów jednostek, a mianowicie J_1PE i J_2PE . Jednostka J_1PE oznacza miligramy grup metoksyloowych ($-OCH_3$), zaś J_2PE ilość mikrorównoważników grup metoksyloowych uwalnianych przez 1 ml płynu pohodowlanego w czasie 1 min. w warunkach oznaczenia.

Ogólną aktywność pektynolityczną płynu pohodowlanego oznaczano metodą wiskozymetryczną. Wyrażano ją w °PM, które odpowiadają na pytanie, w ilu litrach

0,5% roztworu pektyny jabłkowej, pod działaniem 1 kg preparatu pektynolitycznego, następuje spadek lepkości o 85% w czasie 5 godz. inkubacji, w temp. 20°C (21).

Celem lepszej oceny wartości użytkowej enzymu określano także stosunek liczbowy aktywności PG do PE.

Wszystkie wyniki dotyczące aktywności enzymów stanowią średnie z trzech równoległych oznaczeń.

OZNACZENIE STOPNIA ESTRYFIKACJI PEKTYNY CALBIOCHEM

Stopień estryfikacji pektyny oznaczano metodą miareczkową, polegającą na określeniu ilości wolnych grup karboksylowych, a także grup zestryfikowanych po ich zmydleniu 1 N NaOH poprzez zmiareczkowanie 0,1 N NaOH (22). Stopień zestryfikowania pektyny obliczano ze wzoru:

$$E\% = \frac{y}{x+y} \cdot 100$$

w którym x = ilości ml 0,1 N roztworu NaOH zużytego w pierwszym miareczkowaniu (wolne grupy karboksylowe), zaś y = ilości ml 0,1 N roztworu NaOH zużytego w drugim miareczkowaniu (grupy karboksylowe uwolnione w procesie zmydlenia).

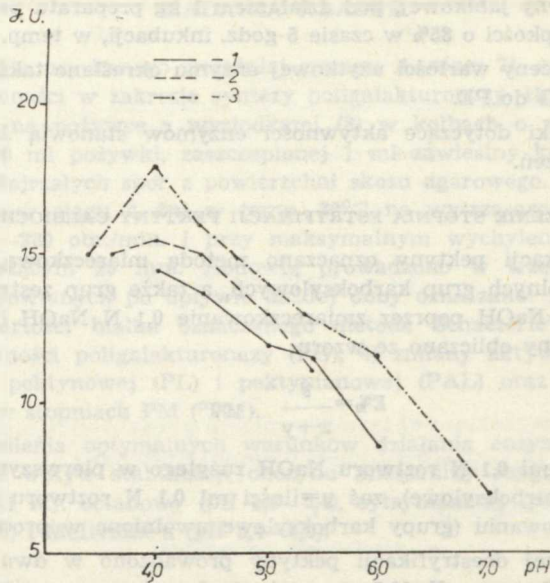
Proces alkalicznej deestryfikacji pektyny prowadzono w dwu różnych układach: w temp. 20°C przy pH 10,5 w czasie 1–5 godz. oraz w temp. 30°C przy pH 12,0 w czasie 24 godz. Zawartość grup metoksyłowych $-\text{OCH}_3$ obliczano, opierając się na zależności, z której wynika, że 1 ml 0,1 N NaOH odpowiada 3,1 mg grup metoksyłowych.

PRÓBA JAKOŚCIOWA NA OBECNOŚĆ KWASU GALAKTURONOWEGO (jako dowód istnienia aktywnej egzo-PG)

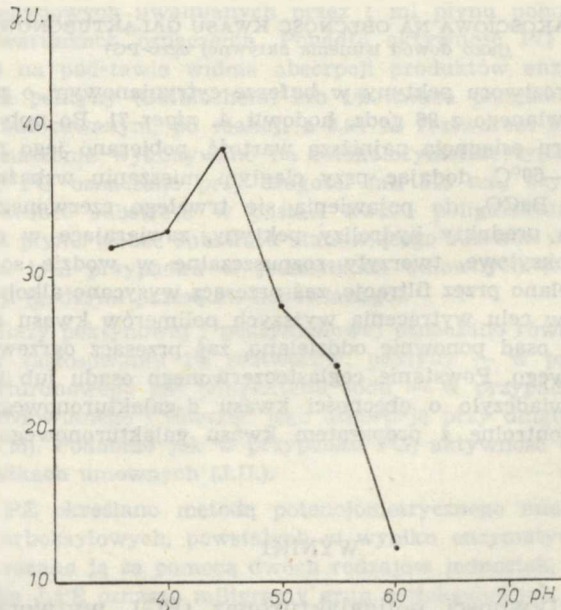
Do 100 ml 1% roztworu pektyny w buforze cytrynianowym o pH 4 dodawano 4 ml płynu pohodowlanego z 96 godz. hodowli *A. niger* 71. Po upływie 2–3 godz., gdy lepkość roztworu osiągnęła najniższą wartość, pobierano jego próbkę i ogrzewano do temp. 55–60°C, dodając przy ciągłym mieszaniu wskaźnika w postaci czerwieni Kongo i BaCO_3 do pojawienia się trwałego czerwonego zabarwienia. W tych warunkach produkty hydrolizy pektyny, zawierające w swoim składzie wolne grupy karboksylowe, tworzyły rozpuszczalne w wodzie sole barowe. Po 24 godz. osad oddzielano przez filtrację, zaś przesącz wysycano alkoholem etylowym do zawartości 50% w celu wytrącenia wyższych polimerów kwasu galakturonowego (9). Wytworzony osad ponownie oddzielano, zaś przesącz ogrzewano z nadmiarem octanu ołowiawego. Powstanie ceglastoczerwonego osadu lub takiegoż zabarwienia roztworu świadczyło o obecności kwasu d-galakturonowego. Równolegle wykonano próby kontrolne z preparatem kwasu galakturonowego w stężeniach 100–5000 $\mu\text{g/ml}$.

WYNIKI

Najwyższe aktywności poligalakturonaz (PG), wytworzonych przez szczep *A. niger* 71, ujawniły się w środowisku stabilizowanym buforem McIlvaine'a o pH 4,0 wobec pektyny i o pH 4,5 wobec kwasu poligalakturonowego, przy czym obszar wysokich aktywności tego enzymu obejmo-



Ryc. 1. Aktywność poligalakturonazy (PG) wobec pektyny w zależności od pH i rodzaju buforu; 1 — bufor cytrynianowy, 2 — bufor octanowy, 3 — bufor McIlvaine'a
 The activity of polygalacturonase (PG) in relation to pectin, depending on pH and kind of buffer: 1 — citrate buffer; 2 — acetate buffer; 3 — McIlvaine's buffer



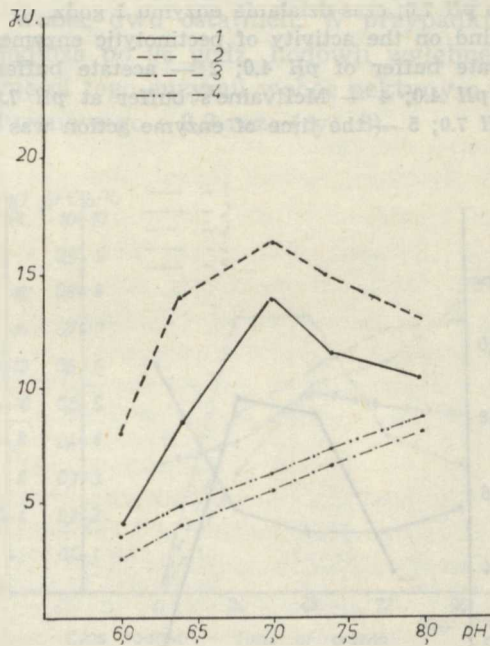
Ryc. 2. Aktywność poligalakturonazy wobec kwasu poligalakturonowego w buforze McIlvaine'a w zależności od pH
 The activity of polygalacturonase in relation to polygalacturonic acid in McIlvaine's buffer depending on pH

wał przedział wartości pH w granicach 3,4—5,0. Nizsze aktywności PG wystąpiły przy użyciu buforów octanowego i cytrynianowego (ryc. 1 i 2).

Liazy pektynowe (PL) maksymalną aktywność wykazały w środowisku stabilizowanym buforem fosforanowym o $pH=7,0$ zaś liazy pektynianowe (PAL) również w obecności buforu fosforanowego, ale w pH 8,0 (ryc. 3). Jak wynika z danych ryc. 3 i 4, aktywność zarówno PG, jak i liaz pektynowych i pektynianowych, zależy nie tylko od określonej wartości pH środowiska, lecz również od rodzaju zastosowanego buforu.

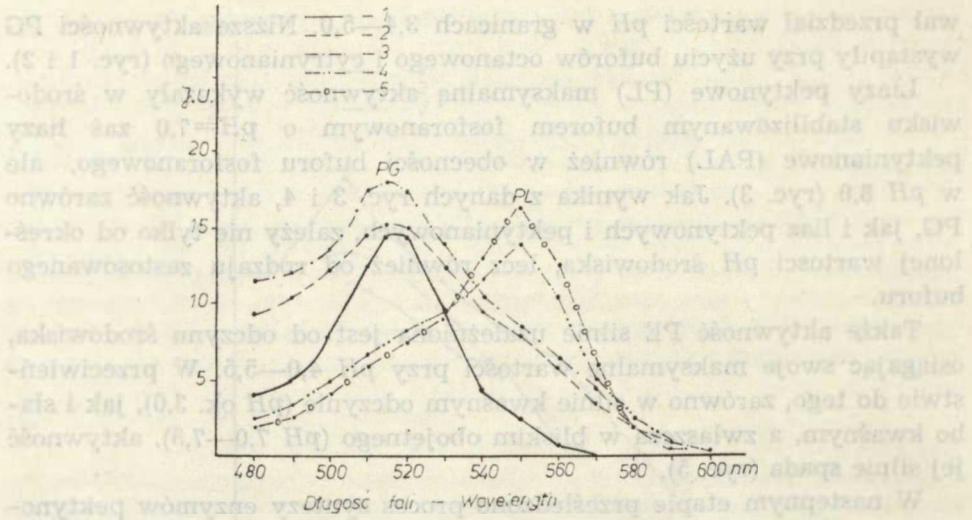
Także aktywność PE silnie uzależniona jest od odczynu środowiska, osiągając swoje maksymalne wartości przy pH 4,0—5,5. W przeciwieństwie do tego, zarówno w silnie kwaśnym odczynie (pH ok. 3,0), jak i słabo kwaśnym, a zwłaszcza w bliskim obojętnego (pH 7,0—7,5), aktywność jej silnie spada (ryc. 5).

W następnym etapie przeszedzono proces syntezy enzymów pektynolitycznych przez *A. niger* 71 w czasie 96 godz. hodowli wglębnej, a także towarzyszące temu zmiany odczynu i zawartości białka w podłożu hodo-



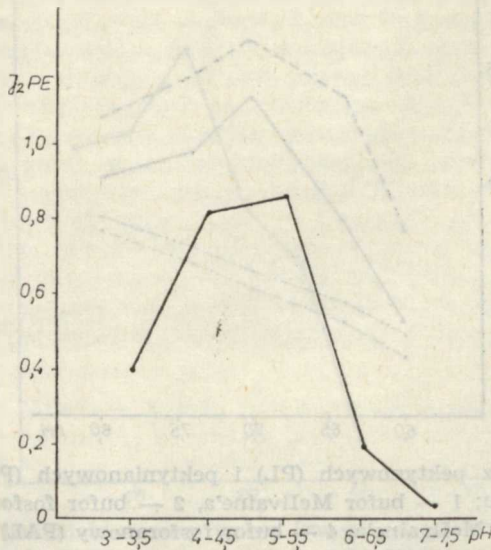
Ryc. 3. Aktywność liaz pektynowych (PL) i pektynianowych (PAL) w zależności od pH i rodzaju buforu; 1 — bufor McIlvaine'a, 2 — bufor fosforanowy (PL), 3 — bufor McIlvaine'a, 4 — bufor fosforanowy (PAL)

The activity of pectinic lyases (PL) and pectinate lyases (PAL) depending on pH and kind of buffer: 1 — McIlvaine's buffer; 2 — phosphate buffer (PL); 3 — McIlvaine's buffer; 4 — phosphate buffer (PAL)



Ryc. 4. Wpływ rodzaju buforu na aktywność enzymów pektynolitycznych (PG i PL) *A. niger* 71; 1 — bufor cytrynianowy o pH 4,0, 2 — bufor octanowy o pH 4,0, 3 — bufor McIlvaine'a o pH 4,0, 4 — bufor McIlvaine'a o pH 7,0, 5 — bufor fosforanowy o pH 7,0; czas działania enzymu 1 godz.

The effect of buffer kind on the activity of pectinolytic enzymes (PG and PL) in *A. niger* 71: 1 — citrate buffer of pH 4.0; 2 — acetate buffer at pH 4.0; 3 — McIlvaine's buffer at pH 4.0; 4 — McIlvaine's buffer at pH 7.0; 5 — phosphate buffer at pH 7.0; 5 — the time of enzyme action was 1 hour

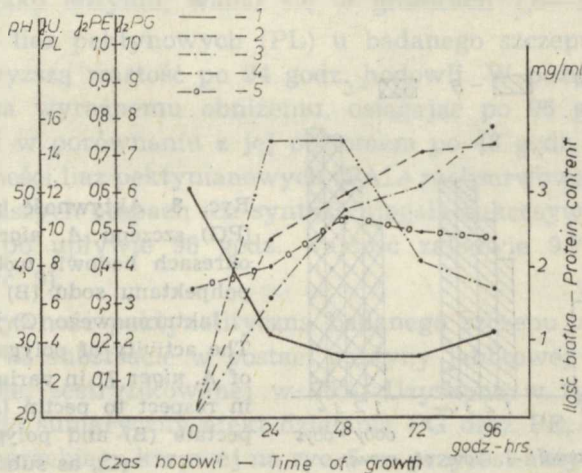


Ryc. 5. Wpływ odczynu pH na aktywność pektynoesterazy (PE) *A. niger* 71
The effect of the pH on the activity of pectinesterase (PE) in *A. niger* 71

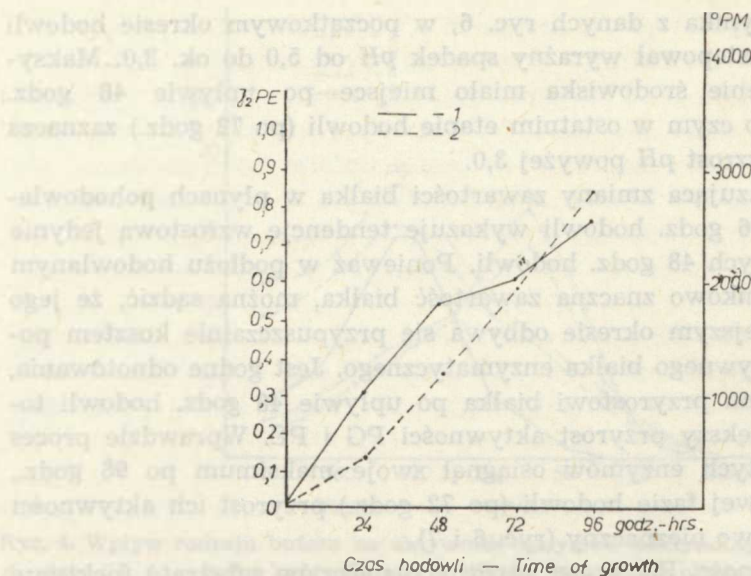
wlanym. Jak wynika z danych ryc. 6, w początkowym okresie hodowli (po 24 godz.) następował wyraźny spadek pH od 5,0 do ok. 3,0. Maksymalne zakwaszenie środowiska miało miejsce po upływie 48 godz. (pH 2,7—2,9), po czym w ostatnim etapie hodowli (po 72 godz.) zaznacza się nieznaczny wzrost pH powyżej 3,0.

Krzywa obrazująca zmiany zawartości białka w płynach pohodowlanych w czasie 96 godz. hodowli wykazuje tendencję wzrostową jedynie w ciągu pierwszych 48 godz. hodowli. Ponieważ w podłożu hodowlanym występuje stosunkowo znaczna zawartość białka, można sądzić, że jego spadek w późniejszym okresie odbywa się przypuszczalnie kosztem pożywki, a nie aktywnego białka enzymatycznego. Jest godne odnotowania, że maksymalnemu przyrostowi białka po upływie 48 godz. hodowli towarzyszył największy przyrost aktywności PG i PE. Wprawdzie proces nagromadzania tych enzymów osiągnął swoje maksimum po 96 godz., jednak w końcowej fazie hodowli (po 72 godz.) przyrost ich aktywności był już stosunkowo nieznaczny (ryc. 6 i 7).

Ocena aktywności PG wobec 3 różnych rodzajów substratu (pektyny, polipektanu sodu i kwasu poligalakturonowego) wykazała, że jest ona znacznie wyższa wobec dwu ostatnich. W przypadku polipektanu sodu aktywność PG podłoża po 96 godz. hodowli wglębnej *A. niger* 71 była wyższa od aktywności tego enzymu wobec pektyny o 2,3 raza, zaś wobec kwasu poligalakturonowego o 2,9 raza (ryc. 8).

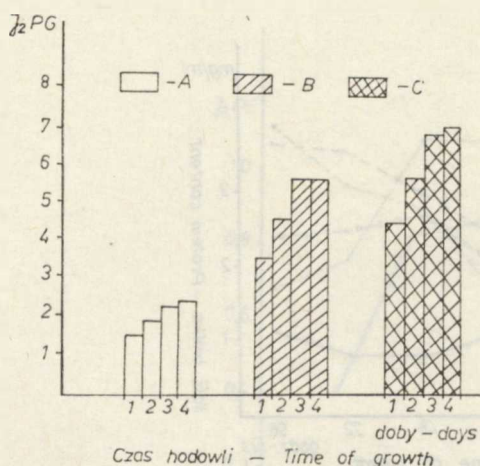


Ryc. 6. Zmiany odczynu, zawartości białka i aktywności pektynaz w podłożu podczas hodowli wglębnej szczepu *A. niger* 71; 1 — odczyn podłoża, 2 — aktywność PG, 3 — aktywność PE, 4 — aktywność PL, 5 — zawartość białka w podłożu
 Changes in the reaction, protein content, and the activity of pectinases in the medium of a submerged culture of *A. niger* 71; 1 — medium reaction; 2 — PG activity; 3 — PE activity; 4 — PL activity; 5 — protein content in the medium



Ryc. 7. Aktywność PE i ogólna aktywność pektynolityczna w stopniach PM szczepu *A. niger* 71 w czasie 96 godz. hodowli wglębnej; 1 — aktywność PE, 2 — ogólna aktywność pektynolityczna w °PM

The activity of PE and total pectinolytic activity in PM degrees in *A. niger* 71 in a 96-hour submerged culture; 1 — PE activity; 2 — total pectinolytic activity in °PM



Ryc. 8. Aktywność poligalakturonazy (PG) szczepu *A. niger* 71 w różnych okresach hodowli wobec pektyny (A), polipektanu sodu (B) i kwasu poligalakturonowego (C) jako substratu

The activity of polygalacturonase (PG) of *A. niger* 71 in various growth stages in respect to pectin (A), sodium polypectate (B) and polygalacturonic acid (C), as substrates

Próba jakościowa na obecność egzopoligalakturonaz (egzo-PG) dała wynik dodatni po 2 godz. inkubacji, a więc wówczas, gdy lepkość osiągnęła wartość graniczną. Wyeliminowanie wyższych polimerów kwasu galakturonowego drogą przeprowadzenia ich w postać soli barowej i wy-

trącenie 50% alkoholem etylowym spowodowało, że próba stała się bardziej czytelna i umożliwiła wykrycie kwasu galakturonowego przy minimalnej jego zawartości w granicach 500—1000 $\mu\text{g/ml}$.

Najwyższa aktywność poligalakturonazy badanego szczepu *A. niger* po 96 godz. hodowli wglębnej, wyrażona w jednostkach $J_1\text{PG}$, wyniosła 1,49 mg CHO/ml enzymu, natomiast w jednostkach $J_2\text{PG}$ 7,04 $\mu\text{M/ml}$. Aktywność PE badanego szczepu wyniosła po 96 godz. hodowli wglębnej 0,023 $J_1\text{PE}$, zaś wyrażona w jednostkach $J_2\text{PE}$ — 0,76 (tab. 1). Maksimum aktywności tego enzymu ujawniło się po 96 godz. hodowli, zaś największe jej przyrosty — jak to widać z ryc. 7 — wystąpiły po upływie 48 godz. W dalszych etapach były one już stosunkowo nieznaczne.

W oparciu o przelicznik kwasu galakturonowego dla pektyny, który wg Procentki (cyt. wg 23) wynosi 1,37, określono stopień hydrolizy substratu pektynowego, który wahał się w granicach 17,2—28,0% (tab. 1).

Skuteczność działania PE określono w drodze obliczenia stopnia deestryfikacji pektyny na podstawie ilości uwolnionych miligramów grup karboksylowych. Zastosowane początkowo warunki deestryfikacji (6), to jest pH 10,5 i czas 3 godz. w temp. 20°C, okazały się mało efektywne (procent deestryfikacji pektyny wyniósł 65,6). Dopiero po wprowadzeniu odpowiednich zmian (pH 12,0, czas 24 godz. i temp. 30°C) stopień deestryfikacji pektyny osiągnął wartość 79,5%. Oznaczony przez nas stopień deestryfikacji roztworu pektyny (1,2%), osiągnięty przy użyciu płynu pochodowlanego jako enzymu, wahał się w granicach 7,8—19,3% (tab. 1).

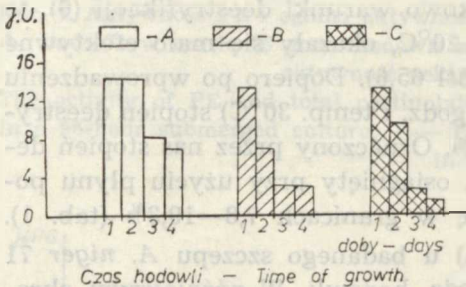
Aktywność liaz pektynowych (PL) u badanego szczepu *A. niger* 71 osiągnęła najwyższą wartość po 24 godz. hodowli. W późniejszym okresie ulegała ona wyraźnemu obniżeniu, osiągając po 96 godz. zaledwie 45,5% wartości w porównaniu z jej poziomem po 48 godz. Również najwyższe aktywności liaz pektynianowych (PAL) zaobserwowano po 24 godz. hodowli. W dalszych etapach ich synteza ulegała sukcesywnemu spadkowi, osiągając po upływie 96 godz. wartość zaledwie 9,7% aktywności wyjściowej (ryc. 9).

Ogólną aktywność pektynolityczną badanego szczepu *A. niger* oznaczano w °PM na substracie w postaci pektyny jabłkowej produkcji Zakładów w Jaśle, zestryfikowanej w 70%. Uzyskane w tym przypadku wyniki obrazują sumaryczny efekt działania PG oraz PE, dlatego też — jak to widać z przebiegu krzywej na ryc. 7 — przyrost aktywności w °PM jest proporcjonalny do czasu.

Celem lepszego określenia wartości użytkowej preparatów pektynolitycznych niektórzy badacze zalecają obliczanie stosunku liczbowego aktywności PG do PE. Dla pektynaz wytwarzanych przez szczep *A. niger* stosunek ten wahał się w granicach 9,3—14,6, przy czym najwyższe war-

Tab. 1. Aktywność PG i PE szczepu *Aspergillus niger* 71
The activity of PG and PE in *Aspergillus niger* 71

| Czas hodowli w godz. Time of growth in hours | Aktywność PG wobec substratów: PG activity against substrates: | | | | | |
|---|---|-------------------|--|-------------------|--|-------------------|
| | pektyny pectin | | polipektanu sodu sodium polypectate | | kwasu poligalakturonowego polygalacturonic acid | |
| | J ₁ PG | J ₂ PG | J ₁ PG | J ₂ PG | J ₁ PG | J ₂ PG |
| 24 | 0,31 | 1,48 | 0,74 | 3,52 | 0,96 | 4,52 |
| 48 | 0,40 | 1,90 | 0,96 | 4,52 | 1,21 | 5,73 |
| 72 | 0,49 | 2,30 | 1,19 | 5,63 | 1,45 | 6,84 |
| 96 | 0,51 | 2,40 | 1,19 | 5,63 | 1,49 | 7,04 |



Ryc. 9. Aktywność liaz pektynowych (PL) i pektynianowych (PAL) szczepu *A. niger* 71 w różnych okresach hodowli; A — aktywność PL wobec pektyny, B — aktywność PAL wobec polipektanu sodu, C — aktywność PAL wobec kwasu poligalakturonowego
The activity of pectinic lyases (PL) and pectinate lyases (PAL) in *A. niger* 71 at various growth stages; A — PL activity in relation to pectin; B — PAL activity in relation to sodium polypectate; C — PAL activity in relation to polygalacturonic acid

tości osiągał po 24 godz. W późniejszym okresie wzajemny stosunek do siebie obu enzymów nieznacznie malał, osiągając ostatecznie najniższą wartość po 96 godz. hodowli (tab. 1).

DYSKUSJA

Poligalakturonazy w zależności od ich pochodzenia i użytego substratu przejawiają swoją aktywność w określonym przedziale wartości *pH*. Czysty enzym typu PG pochodzenia pleśniowego wykazuje najczęściej optimum działania w granicach *pH* 3,5—4,5 (16, 27). Podobnie jest w przypadku pleśniowej PE, dla której optimum to wynosi *pH* 4,6—5,5 (19, 27). Dane te pozostają w zgodzie z naszymi ustaleniami dla obu enzymów syntetyzowanych przez *A. niger* 71.

Co się tyczy liaz pektynowych (PL) pochodzenia grzybowego, to ich optymalny odczyn działania określany jest jako równy *pH* 5,2 (1, 7, 10).

wyrażona w jednostkach J_1PG i J_2PG oraz J_1PE i J_2PE
 expressed in units of J_1PG and J_2PG as well as of J_2PE and J_1PE

| Procent hydrolizy pektyny Per cent of pectin hydrolysis | Aktywność PE PE activity | | Procent hydrolizy pektyny Per cent of pectin hydrolysis | Stosunek PG/PE PG/PE ratio |
|--|-----------------------------|---------|--|-------------------------------------|
| | J_1PE | J_2PE | | |
| 17,2 | 0,009 | 0,31 | 7,8 | 14,6 |
| 22,2 | 0,017 | 0,54 | 13,8 | 10,6 |
| 26,9 | 0,019 | 0,60 | 15,3 | 11,4 |
| 28,0 | 0,023 | 0,76 | 19,3 | 9,3 |

Wyjątek stanowi jedynie liaza pektynowa u *Sclerotinia fructigena*, u której istnieją dwa izoenzymy o optymalnym pH 7,3 i 8,3 oraz u *A. fonsecaeus* o optimum w pH 5,2 i w obszarze alkalicznym, zwłaszcza w obecności jonów wapnia (26). Liaza pektynianowa (PAL) pleśni jest aktywna w przedziale wartości pH 7,0—9,9 (26). W naszych badaniach nie stwierdziliśmy aktywności liaz szczepu *A. niger* 71 w kwaśnym obszarze środowiska, co nie musi oznaczać, że nie są one syntetyzowane w tych warunkach. Być może, iż wysoka aktywność PE przy niskich wartościach pH czyni substrat niedostępnym dla liaz na skutek jego deestryfikacji (7). Ponadto wysoka aktywność PG może w jakimś stopniu maskować działanie liaz.

W okresie maksymalnej syntezy enzymów pektynolitycznych zaobserwowano dość silne zakwaszenie podłoża (poniżej pH 3,0). Potwierdza to nasze wcześniejsze obserwacje, z których wynika, że wytwarzanie enzymów pektynolitycznych przez *A. niger* w hodowli wglębnej jest ściśle uzależnione od określonego poziomu stężenia jonów wodorowych w środowisku hodowlanym (8).

W wyniku oceny aktywności PG szczepu *A. niger* 71 wobec różnych rodzajów substratu (pektyny, polipektanu sodu i kwasu poligalakturonowego), wykazano, że jest ona najwyższa na substracie zdemetylowanym. Może to świadczyć o tym, że w kompleksie pektynolitycznym szczepu *A. niger* 71 dominuje endo-PG, przy równoczesnym braku endopolimetylogalakturonazy. Pewna aktywność PG wobec pektyny jest przypuszczalnie następstwem działania PE, która demetylując ten substrat czyni go podatnym na działanie poligalakturonazy.

Aktywność PG szczepu *A. niger* 71 wobec kwasu poligalakturonowego wyrażona w jednostkach J_2PG okazała się stosunkowo wysoka (7,04). Jest ona w jakiejś mierze porównywalna z aktywnościami prepa-

ratów przebadanych przez Lifszica (17), których wielkości wahały się w granicach od 200—620 do 1067—4087 J_2PG , w odniesieniu jednak do 1 g suchej masy preparatu, podczas gdy w naszych oznaczeniach posługiwaliśmy się płynem pohodowlanym o objętości 1 ml. Natomiast aktywność PE płynu pohodowlanego szczepu *A. niger* 71, wyrażona w jednostkach J_2PE , wynosiła 0,76, co stanowi od 10 do ponad 81 razy mniej niż poziom aktywności preparatów pektynolitycznych przebadanych przez Lifszica.

Spadek aktywności liazy pektynowej szczepu *A. niger* 71, jaki wystąpił po 48 godz. hodowli, oraz pektynianowej (po 24 godz.) może być następstwem silnego zakwaszenia podłoża, wyrażającego się wartością pH poniżej 3,0, wobec optymalnego odczynu dla działania liaz pektynowych, wynoszącego pH 7,0 i najwyższych aktywności liaz pektynianowych w pH 8,0.

Uzyskane wyniki, jak się wydaje, wskazują na dużą przydatność szczepu *A. niger* 71 do syntezy pektynaz metodą hodowli wgłębnej ze względu na jego wysoką aktywność tworzenia kompleksu enzymatycznego, złożonego z aktywnych egzo- i endo-PG oraz PE. Ponadto jego ceną zaletą jest stosunkowo krótki okres hodowli, niezbędny do uzyskania maksymalnej ilości pektynaz (72—96 godz.).

Do skutecznego działania preparatów pektynolitycznych konieczna jest w nich obecność zarówno PG, jak i PE, przy czym udział tych enzymów w procesie hydrolizy może się okazać różny w zależności od stopnia estryfikacji substratu pektynowego. Przy użyciu pektyny o niskim stopniu estryfikacji (33—35%), większy udział w tym procesie będzie mieć PG niż PE. Jednakże w przypadku substratu o wysokim stopniu estryfikacji istotna rola przypadnie w udziale PE (17).

PISMIENICTWO

1. Albersheim P., Killias U.: Studies Relating to the Purification and Properties of Pectin Transeliminase. Arch. of Bioch. and Biophysics **97**, 107—115 (1962).
2. Alichanian S. J.: Prikladnyje uspiechi gienietiki mikroorganizmow. Gienietika **6**, 4, 96—105 (1970).
3. Awrowa N. P., Goszko A. A.: Pektoliticzeskaja aktiwnost' sztamow *Clostridium felsineum* pri jejo opriedielenii raznymi mietodami. Prikl. Bioch. i Mikrobiol. **9**, 3, 414—417 (1973).
4. Bugbee W. N.: Sucrose and Cell Walls as Factors Affecting *Phoma* storage Rot of Sugar Beet. Phytopathology **63**, 480—483, (1973).
5. Dianowa O., Martakow A., Bankożytienko R., Nowikowa A.: Sielekcyja producentow pektoliticzeskich fiermientow s ispolzowanijem mutagiennyh faktorow. Tr. In-ta Mikrobiol. Wirusol. AN Kaz. SSR **15**, 149—163 (1970).

6. Drzazga B.: Studia nad deestryfikacją pektyn z uwzględnieniem niepożądaných procesów depolimeryzacji. Zeszyty Naukowe SGGW AR w Warszawie **71**, 5—50 (1976).
7. Edstrom R. D., Phaff H. J.: Purification and Certain Properties of Pectin Trans-Eliminase from *Aspergillus fonsecaeus*. J. Biol. Chem. **239** (8), 2403—2408 (1964).
8. Fiedurek J., Ilczuk Z.: Mutagenizacja pleśni *Aspergillus niger* aktywnych pektynolitycznie w warunkach hodowli wglębnej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C **33**, 29—39 (1978).
9. Gaponienkow T. K., Procenko Z. J.: O rozszczepieniu piektynowych wieszczestw fermentami mikroorganizmów i chemiczkiej prirodzie koniecznych produktów. Mikrobiologija **29**, 5, 658—671 (1960).
10. Hasegawa S., Nagel C. W.: Separation of a Hydrolase from a Pectic Acid Transeliminase in Cell Extracts of a *Bacillus*. Nature **213**, 5072, 207—208 (1967).
11. Ilczuk Z.: Synthesis of Pectolytic Enzymes by UV — Induced Mutants of *Aspergillus niger*. Acta Microbiol. Polon., Ser. B **5** (22), 95—101 (1973).
12. Ilczuk Z.: Synteza enzymów pektynolitycznych przez mutanty *Aspergillus niger* uzyskane w drodze indukcji wielostopniowej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C **29**, 77—86 (1974).
13. Ilczuk Z., Fiedurek J.: Metoda szybkiej oceny aktywności pektynolitycznej mutantów *Aspergillus niger*. Przem. Ferm. i Rolny **21** (8), 20—22 (1977).
14. Ilczuk Z., Wołek K.: Selekcja aktywnych pektolitycznie mutantów *Aspergillus niger* wtórnie indukowanych promieniami UV. Przem. Ferm. i Rolny **17**, nr 9, 11—14 (1973).
15. Kałunianc K. A., Dorochow W. W., Łosjakowa L. S., Wieliczko B. A.: Naprawlennyj biosintez fermentów mikroorganizmami. Fiziolog. puti powyszenija fermentat. aktiwnosti mikroorganizmów. Izd. AN SSSR, Moskwa 1973, 89—107.
16. Krakowiak A., Ostaszewicz D., Rzędowski W.: Kinytyka hodowli wglębnej grzybów i wytwarzania enzymów pektolitycznych. Postępy Mikrobiologii **9**, 533—537, (1970).
17. Lifszyc D. B., Kaftonowa L. E., Miedowaja J. B.: Opriedielenije poligalakturonaznoj aktiwnosti. Prikl. Biochimija i Mikrobiol. **8** (5), 604—609 (1972).
18. Łosjakowa L. S., Musznikowa L. N.: Powyszenije fermentatiwnoj aktiwnosti griba *Aspergillus awamori* w zawisimosti ot usłowij kultiwirowanija. Fiziolog. puti powyszenija fermentatiwnoj aktiwnosti mikroorganizmów, Izd. AN SSSR, Moskwa 1973, 169—179.
19. Łosjakowa L. S., Siewiernaja T. A., Bogaczewa T. R., Storożewa L. N.: Piektofoetidin P10x. Fierm. i Spirt. Prom. **7**, 41—42 (1976).
20. Nelson N.: A Photometric Adaptation of the Samogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. **153**, 375 (1944).
21. Norma Zakładowa ZN-63-MPSS/C190: Preparaty pektolityczne „Pektopol P” i „Pektopol S” (1968).
22. Pluszyński E., Bagdach J.: Metody badania żywności (według norm ustanowionych do dnia 1 lipca 1967 roku). WPLiS, wyd. 2, Warszawa 1967, 1085.
23. Sapożnikowa E. W.: Piektynowyje wieszczestwa plodow. Izd. „Nauka”, Moskwa 1965.

24. Schacterle G. R., Pollack R. L.: A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amounts of Protein in Biologic Material. *Analytical Biochemistry* **51**, 654—655 (1973).
25. Sieliszczynska O., Bummanowa N.: Sielekcyja plesniewych gribow aktywnych producentow pektinazy. *Tr. WNI In-ta Prod. Brożenija* **19**, 126—133 (1970).
26. Wojciechowicz M.: Liaza pektynianowa. *Post. Biochemii* **17**, 437—450 (1971).
27. Woronowa L. J., Hiersonowa L. A., Jarowienko W. L., Dwiadcatowa E. A.: Wydzielenije pektoliticzeskich fiermientow sintezirujemych gribom *Aspergillus avamori* 44-2b i izuczenije niekotorych ich swojstw. *Fiern. i Spirt. Prom.* **2**, 39—41 (1975).

РЕЗЮМЕ

Штамм *Aspergillus niger* 71, культивированный глубинным методом в течение 4-х дней, выработал комплекс пектиназ, состоящий из экзо- и эндопектиназы (PG), пектинэстеразы (PE), пектиновой лиазы (PL), пектиниановой лиазы (PAL). Установлено, что активность этих энзимов зависела не только от определенной величины pH, но и от вида буфера, примененного для стабилизации реагирующей среды. В случае PG лучшие эффекты гидролиза были получены при применении буфера McIlvaine'a с pH 4,0—4,5. Для лиаз самым лучшим оказался фосфатный буфер, оптимальная реакция которого для PL составила pH 7,0, зато самая высокая активность PAL установлена при pH 8,0. Для PE оптимальная реакция колебалась в границах pH 4,0—5,5. Во время продолжающейся 96 часов глубинной культуры штамма *A. niger* 71 была прослежена динамика изменения активности накопленных в культурной среде пектиназ всех вышеназванных типов с учетом изменений реакции и содержания белка в культурной среде.

SUMMARY

A strain of *Aspergillus niger* 71 grown in a submerged culture for 4 days produced a complex of pectinases which consisted of exo- and endopolygalacturonase (PG), pectinesterase (PE), pectinic lyase (PL) and pectinate lyase (PAL). The activity of these enzymes was found to depend not only on a determined pH value but also on the kind of buffer used for the stabilization of the reaction medium. In case of PG, the best effects of hydrolysis were obtained when using McIlvaine's buffer of pH 4.0—4.5. For liases it was best to employ phosphate buffer whose optimum reaction for PL was pH 7.0, while the highest PAL activity was at pH 8.0. The optimum reaction for PE ranged from pH 4.0 to 5.5. During the 96-hour growth of a submerged culture of *A. niger* 71, it was possible to trace the dynamics of changes in the activities of the pectinases of all the kinds mentioned above and collected from the medium, also including changes in the reaction and protein content in the growth medium.