

## Enzymy chitynolityczne (chitynaza i chitobiasa) w grzybach

### Chitinolytic enzymes (chitinase and chitobiase) in mushrooms

JADWIGA CHMIELNICKA, HENRYK MŁODECKI, MARIA TROCHA

#### WSTĘP

Obszerne wiadomości na temat występowania enzymów chitynolitycznych, biorących udział w trawieniu chityny (polimeru N-acetylo-dwuamino-2-dezoksyglikopiranozy zawierającego wiązania  $\beta$ -1,4) zawdzięczamy Jeuniaux (1963). Występowanie tych enzymów zostało stwierdzone zarówno w świecie roślinnym, jak i zwierzęcym (Paech i Tracey 1955; Jeuniaux 1963; Chmielnicka, Młodecki i Filipkowska 1969). Do enzymów chitynolitycznych zalicza się chitynazę (3, 1, 2, 14 glikanohydrolazę poli- $\beta$ -1,4-2-acetamino-2-dezoksy-D-glukozydu) oraz chitobiazę (3, 1, 2, 29 acetaminodezoksyglukohydrolazę chitobiozy) (Enzymy — nomenklatura i klasyfikacja 1967).

Bogatym źródłem chityny są grzyby jadalne. Zawartość tego związku stanowi ca 9% ich suchej substancji (Więckowska 1968). Dotychczas w piśmiennictwie naukowym nie zanotowano żadnych prac dotyczących występowania enzymów chitynolitycznych w grzybach. Pewne sugestie o zawartości enzymów biorących udział w trawieniu chityny można było wyciągnąć z poprzednich naszych doświadczeń dotyczących charakterystyki frakcji białkowych pieczarki (Młodecki, Chmielnicka, Kulejowska i Pawlicka 1968). Stwierdzono, że z 13,6% azotu przypadającego na chitynę w pieczarce po rozdzieleniu na 4 frakcje białkowe, w pozostałości po ekstrakcjach pozostaje tylko 2,9%. Można więc przypuszczać, że w czasie rozdzielania frakcji białkowych chityna ulega trawieniu, przechodząc w podjednostki rozpuszczalne.

Celem pracy było zbadanie, na jakim poziomie ustala się aktywność enzymów hydrolizujących chitynę w grzybach jadalnych.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do badań użyto 9 gatunków grzybów suszonych:

<i>Boletus edulis</i> Bull. ex Fr.	<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.
<i>Agaricus bisporus</i> Lange	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.
<i>Suillus bovinus</i> (L. ex Fr.) Kuntze	<i>Hydnum imbricatum</i> Fr.
<i>Leccinum scabrum</i> (Bull. ex Fr.) S. Gray	<i>Gyromitra esculenta</i> Fr.
<i>Xerocomus badius</i> (Fr.) Kühn	

Ponadto przeprowadzono badania na zawartość tych enzymów w pieczarce świeżej.

**Metody badań.** Przygotowanie wyciągów z grzybów. Po dokładnym sproszkowaniu grzybów przeprowadzono ekstrakcję wodą podwójnie destylowaną, wytrząsając zawiesinę 2 godziny. Następnie po pozostawieniu na 24 godziny w lodówce w temp.  $+2^{\circ}$  zawiesinę wirowano stosując 6 tys. obr./min. Po przemyciu osadu wyciągi łączono razem i badano obecność enzymów hydrolizujących chitynę.

**Oznaczanie aktywności chitynazy.** Do oznaczeń zastosowano metodę nefelometryczną wg Jeuniaux (1963). Zasadą metody polega na tym, że zawieszoną w wodzie chitynę za pomocą 0,5%-owego roztworu gumy arabskiej w odpowiednim pH poddaje się trawieniu enzymami chitynolitycznymi. W wyniku działania chitynazy, chityna zostaje zhydrolizowana do chitobiozy i chitotriozy oraz częściowo do N-acetyloglukozaminy, a w związku z tym następuje zmiana stężenia chityny, które ustala się za pomocą nefelometru lub kolorymetru. Oznaczając ekstynkcję dla mieszaniny reakcyjnej o znanym stężeniu chityny przed inkubacją oraz po inkubacji można stwierdzić zmianę wartości ekstynkcji, która odpowiada ilości zhydrolizowanej chityny pod wpływem chitynazy. Wartość ekstynkcji dla chityny odczytywano na fotometrze Pulfricha przy filtrze niebieskim, stosując mikrokiuwetę o grubości 5 cm.

Sposób oznaczania chitynazy w wyciągach grzybowych oraz wykreślenie krzywej kalibracji dla chityny był identyczny jak w przypadku oznaczania chitynazy zwierzęcej; został on przedstawiony dokładnie w poprzedniej naszej pracy (Chmielnicka, Młodecki i Filipkowska 1969). Do oznaczeń pobierano 0,125—0,25 ml 10% wyciągu grzybowego. Aktywność chitynazy wyrażano w mg zhydrolizowanej chityny w ciągu 1 godziny inkubacji, w przeliczeniu na 1 g suchej masy grzyba (tab. 1).

W czasie doświadczeń stwierdzono, że aktywność chitynazy w pieczarce dwuzarodnikowej zmienia się w zależności od rodzaju stosowanego roztworu buforowego w mieszaninie reakcyjnej. W obecności fosforanowo-cytrynianowego roztworu buforowego o pH 5 aktywność enzymatyczna jest o ca 100% wyższa niż w obecności buforowego roztworu

Tabela 1 — Table 1

Aktywność enzymów chitynolitycznych w grzybach suszonych w ciągu 1 godziny w temperaturze 37°C (w przeliczeniu na 1 g suchej masy)

Chitinolytic enzymes activity in mushrooms dried for one hour at 37°C (per 1 g d. wt.)

Nazwa grzyba Mushrooms	Aktywność chitynazy w mg zhydrolizowanej chityny Chitinase activity in mg of hydrolyset chitine	Aktywność chitobiazzy w mg uwolnionej N-acetyloglukozaminy Chitobiase activity in mg of N-acetylglucosamine released
<i>Boletus edulis</i>	2,92	0,173
<i>Suillus bovinus</i>	1,71	0,138
<i>Xerocomus badius</i>	1,57	0,134
<i>Agaricus bisporus</i>	1,35	0,171
<i>Leccinum scabrum</i>	1,33	0,166
<i>Paxillus involutus</i>	1,11	0,135
<i>Gyromitra esculenta</i>	1,10	0,017
<i>Cantharellus cibarius</i>	0,83	0,027
<i>Hydnum imbricatum</i>	0,81	0,004

oetanowego o tej samej wartości pH (ryc. 1). W związku z tym w naszych doświadczeniach stosowano fosforanowo-cytrynianowy roztwór buforowy.

W doświadczeniach stwierdzono, że aktywność chitynazy w grzybach jest uzależniona od pH środowiska (ryc. 2), od czasu inkubacji mieszaniny reakcyjnej (ryc. 3), a także od stężenia wyciągów grzybowych i rodzaju grzyba pobranego do oznaczenia (ryc. 4). Wpływ na poziom aktywności enzymatycznej ma również suszenie materiału jak to wykazuje (ryc. 5) w przypadku pieczarki dwuzarodnikowej.

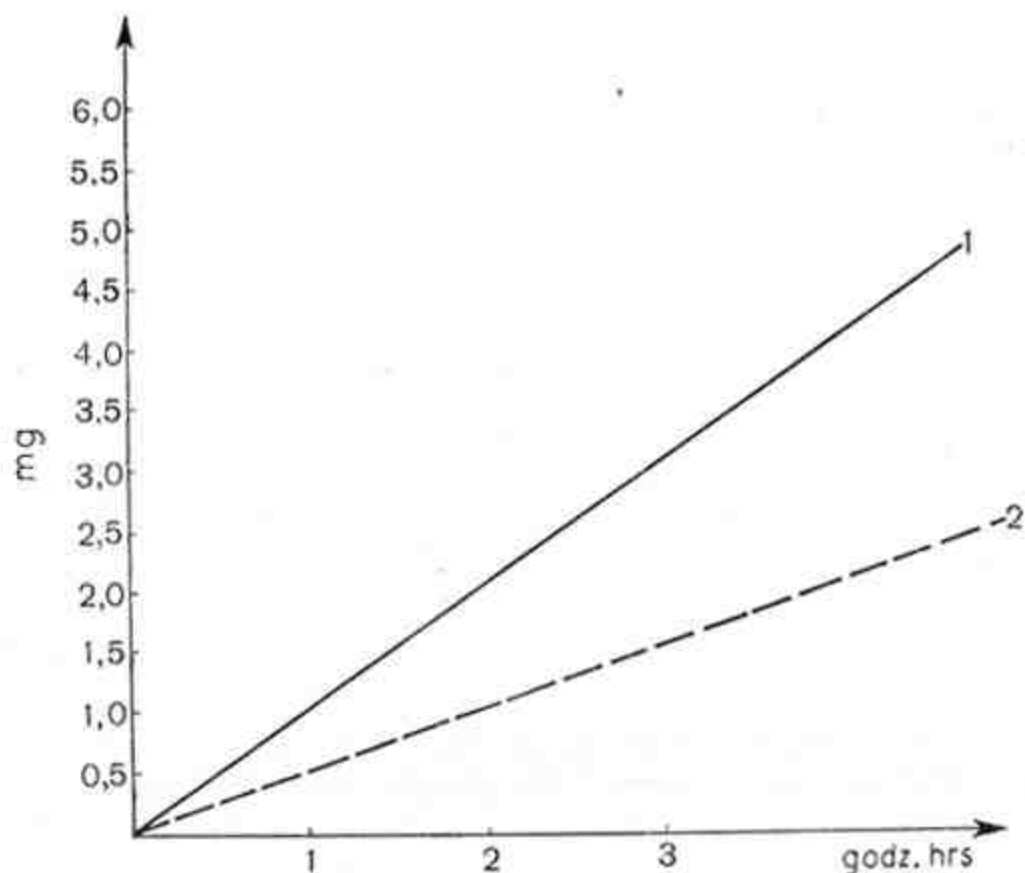
Oznaczenie aktywności chitobiazzy. W tym celu zastosowano metodę wg Reissiga (1955). Zasada metody polega na tym, że w czasie inkubacji uwolniona N-acetyloglukozamina reaguje z p-dwumetyloaminobenzaldehydem w obecności jonów boranowych przy pH 9,2 dając fioletoworóżowe zabarwienie.

Sposób postępowania oznaczania chitobiazzy w wyciągach grzybowych był taki sam jak w przypadku oznaczania chitobiazzy w tkankach zwierzęcych, opisany w poprzedniej pracy (Chmielnicka, Młodnicki, Filipkowska 1969). Intensywność powstałego zabarwienia oznaczano na fotokolorymetrze chińskim model 581, stosując filtr nr 53 i kiuwety o grubości 1 cm. Aktywność chitobiazzy wyrażano w µg uwolnionej N-acetyloglukozaminy w ciągu 1 godziny inkubacji w przeli-

czeniu na 1 g suchej masy grzyba (ryc. 6). Aktywność chitobiazы w badanych 9 gatunkach grzybów jest kilkakrotnie niższa niż chitynazy (tab. 1).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

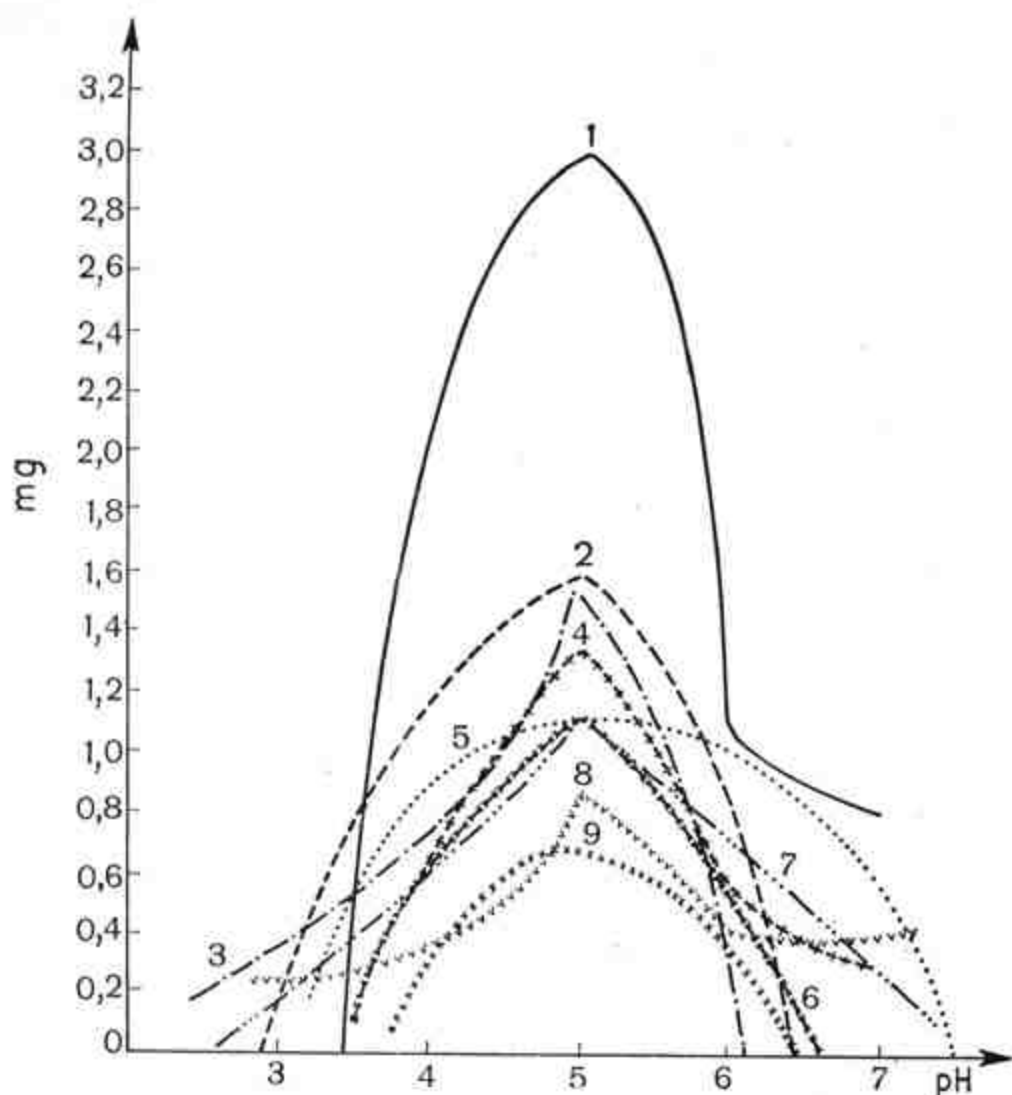
Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że aktywność chitynazy w wyciągach grzybowych jest ściśle uzależniona od pH środowiska. (ryc. 2). Maksimum aktywności chitynazy we wszystkich badanych ga-



Ryc. 1. Wpływ buforów na aktywność chitynazy pieczarki  
 Oś Y — chityna zhydrolizowana; oś X — czas inkubacji  
 1 — bufor fosforanowo-cytrynianowy pH 5; 2 — bufor octanowy  
 Effect of buffers on the activity of chitinase of *Agaricus bisporus*  
 Axis Y — chitine hydrolysed; axis X — time of incubation  
 1 — phosphate-citric buffer pH 5; 2 — acetate buffer pH 5

tunkach stwierdzono przy pH 5. Tak jak wykazały poprzednie badania Jeuniaux (1963) i nasze (Chmielnicka i wsp. 1969) dla większości chitynaz zarówno pochodzenia tak roślinnego, jak i zwierzęcego optimum działania tych enzymów wartość pH w granicach 4,5—5,0.

W stosowanych warunkach badań aktywność chitynazy w wycią-



Ryc. 2. Wpływ pH na aktywność chitynazy w wyciągach grzybowych (w mg zhydrolizowanej chityny 1 g suchej masy 1 godz. inkubacji)

Effect of pH on the activity of chitinase in mushroom extracts (in mg of chitine hydrolysed 1 g dry wt. 1 hr)

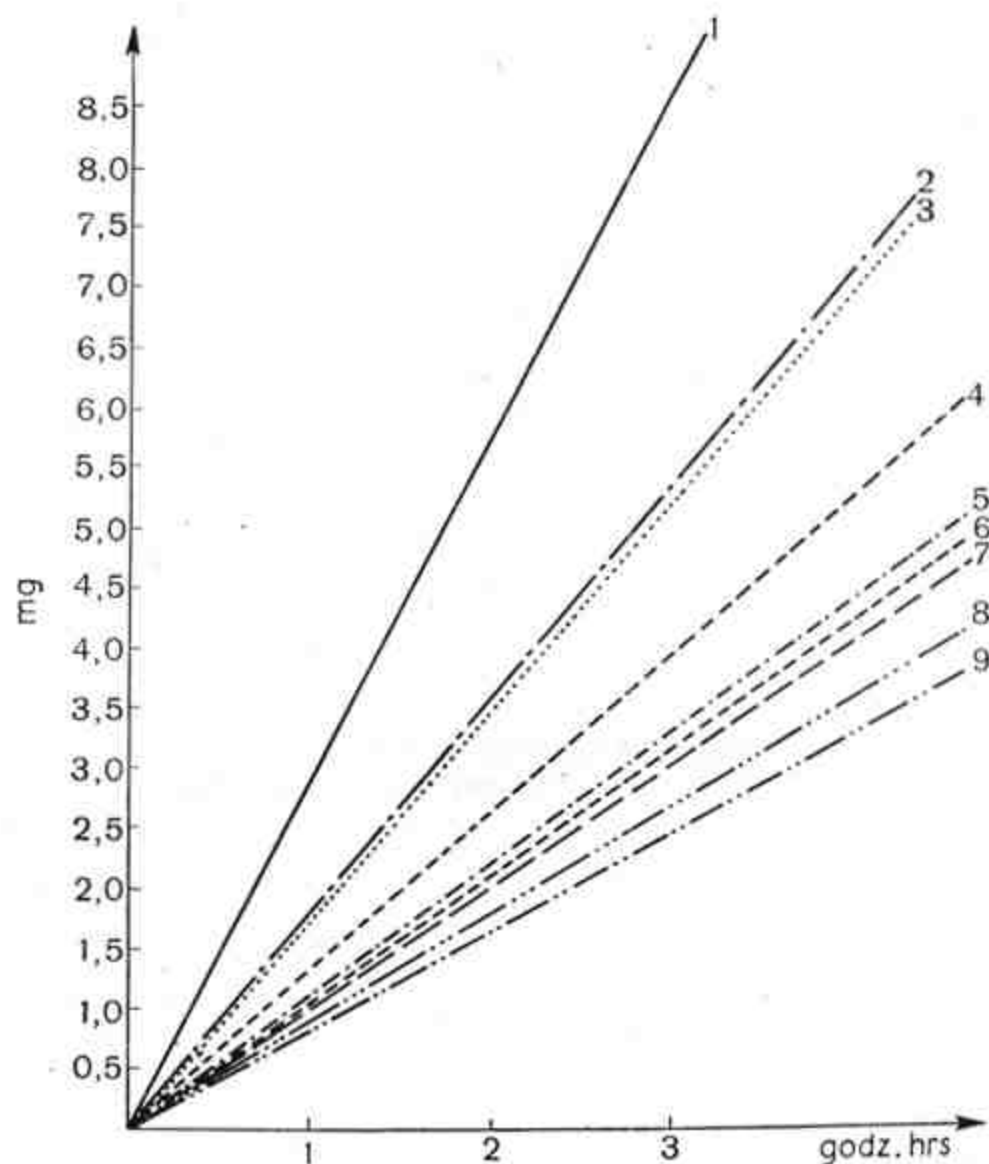
- |                             |                                  |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 1 — <i>Boletus edulis</i>   | 5 — <i>Agaricus bisporus</i>     |
| 2 — <i>Suillus bovinus</i>  | 6 — <i>Paxillus involutus</i>    |
| 3 — <i>Xerocomus badius</i> | 7 — <i>Gyromitra esculenta</i>   |
| 4 — <i>Leccinum scabrum</i> | 8 — <i>Cantharellus cibarius</i> |
|                             | 9 — <i>Hydnum imbricatum</i>     |

gach grzybowych jest proporcjonalna do czasu inkubacji (ryc. 3) i do ilości pobranej próby wyciągu do badania (ryc. 4).

Suszenie pieczarki w temperaturze pokojowej obniża aktywność chitynazy (ryc. 5). Aktywność tego enzymu w pieczarce wysuszonej jest prawie dwukrotnie mniejsza niż w pieczarce świeżej.

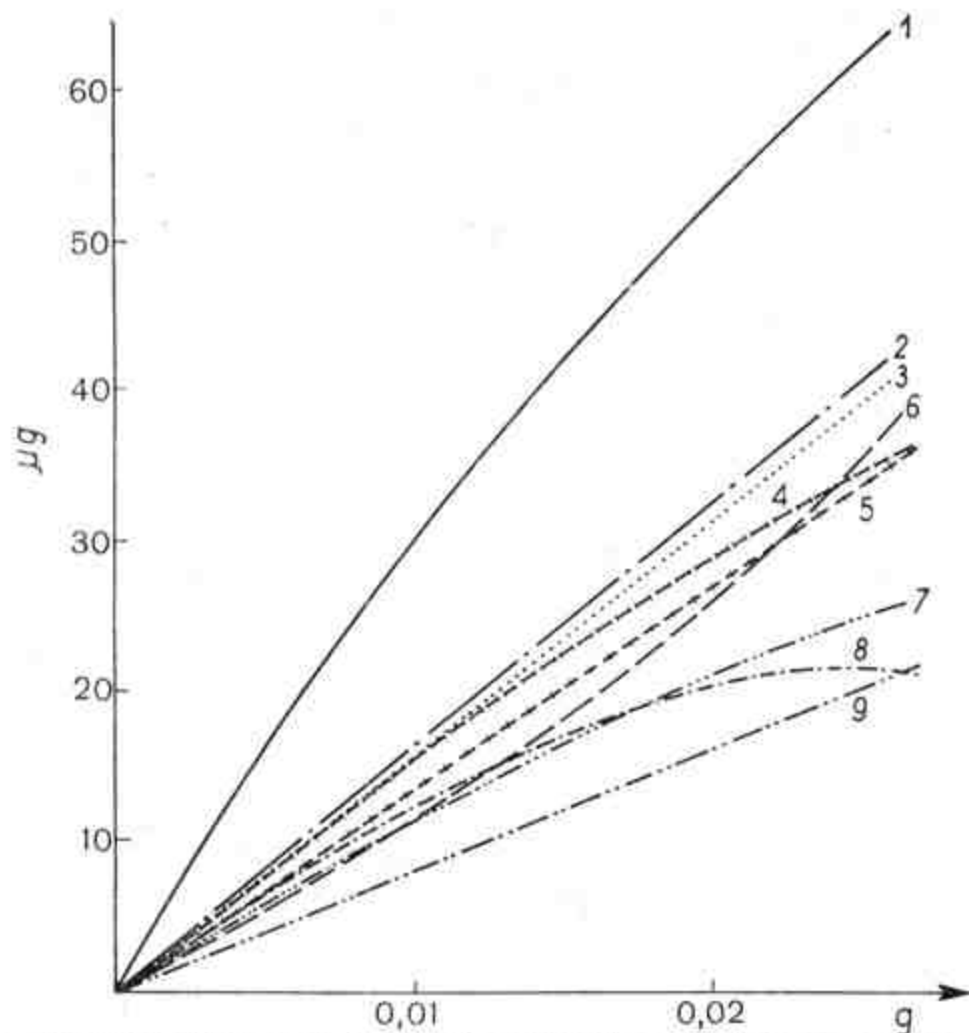
Aktywność chitynazy w badanych wyciągach grzybowych kształtuje się na poziomie 0,83—2,92 mg zhydrolizowanej chityny w ciągu 1 godziny inkubacji (temp. 37°) w przeliczeniu na 1 g suchej masy grzyba. Największą aktywność tego enzymu stwierdzono w borowiku, maślaku sitarzu i pieczarce, a najmniejszą w przypadku koleczaka dachówkowego i kurki (tabela 1).

Aktywność chitobiazy w grzybach znajduje się w granicach 0,004—0,173 mg uwolnionej N-acetyloglukozaminy w ciągu 1 godziny inkubacji (temperatura 37°) w przeliczeniu na 1 g suchej masy grzyba.

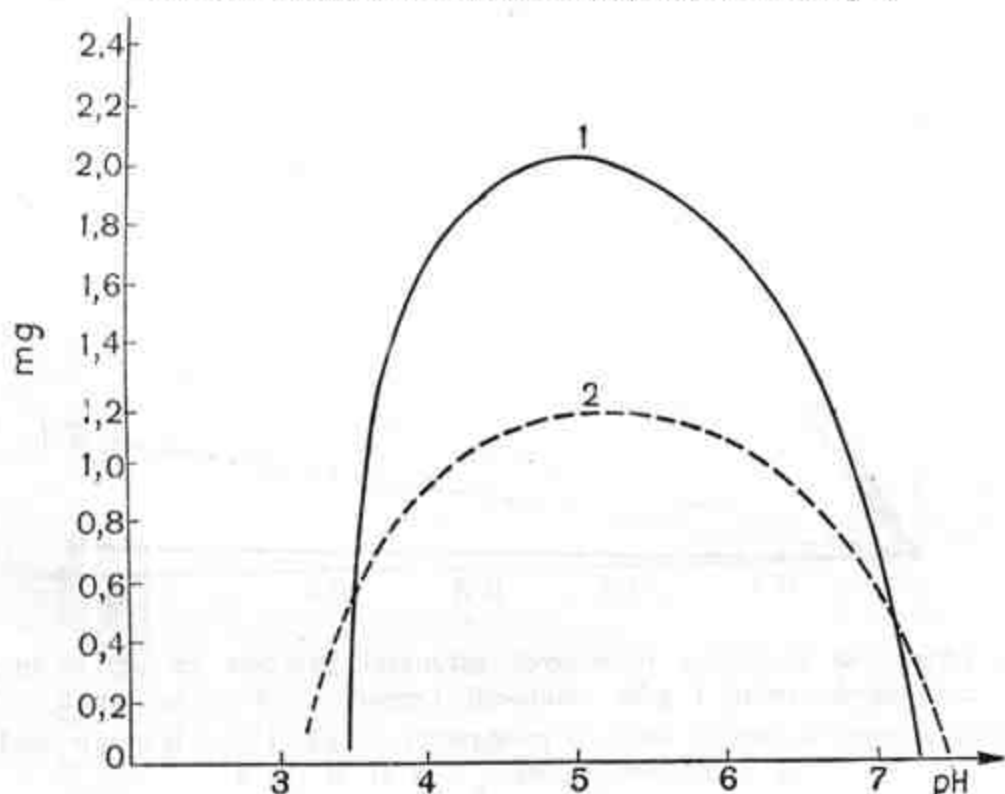


Ryc. 3. Aktywność chitynazy w wyciągach grzybowych w zależności od czasu inkubacji (w mg zhydrolizowanej chityny 1 mg suchej masy). Legenda: 1—9 jak na ryc. 2

Chitinase activity in mushroom extracts in dependence on the time of incubation (in mg of chitine hydrolysed 1 g dry wt.). Legend: 1—9 as in fig. 2



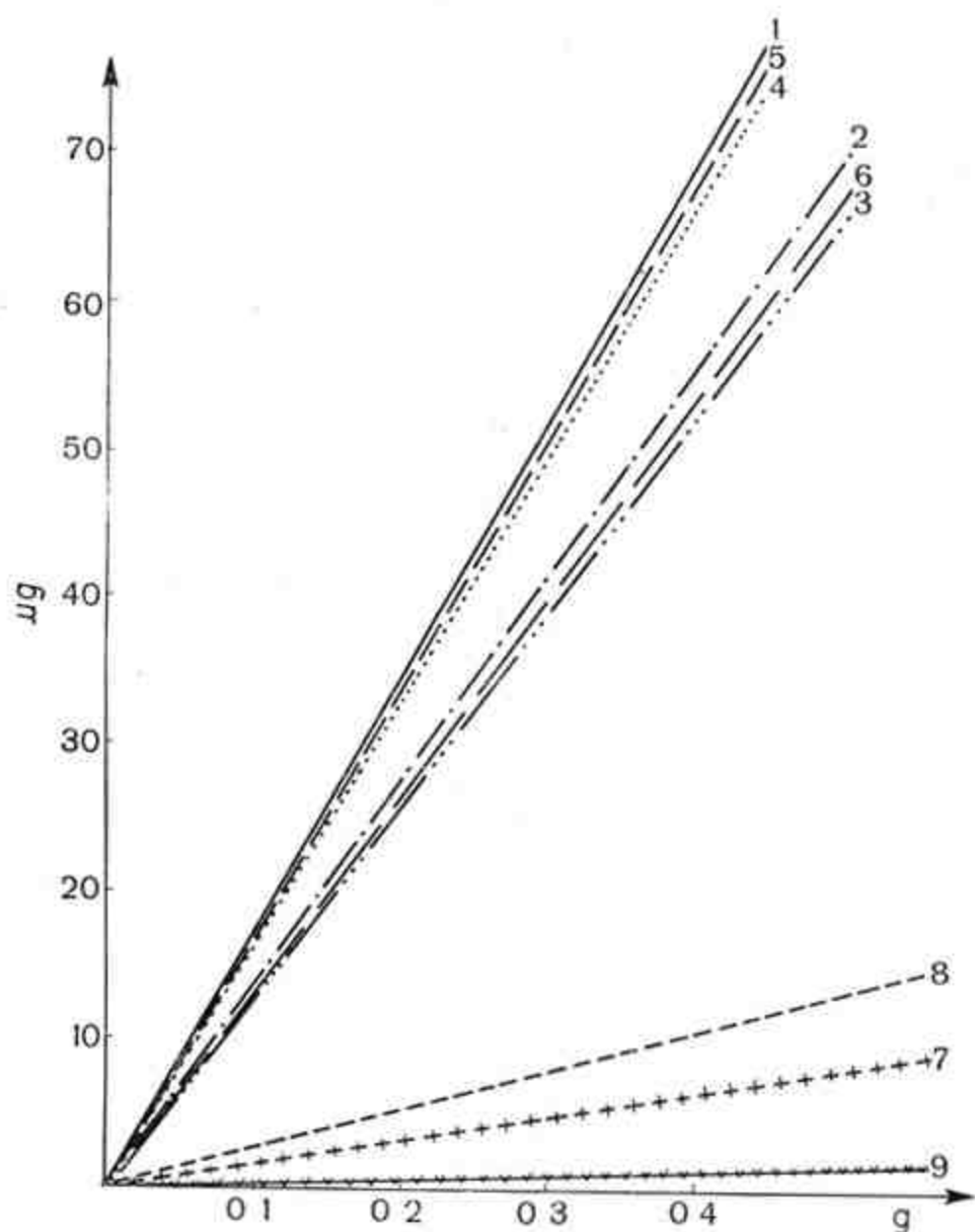
Ryc. 4. Aktywność chitynazy w wyciągach grzybowych w zależności od stężenia enzymu (w  $\mu\text{g}$  zhydrolizowanej chityny 1 godz. inkubacji). Legenda: 1-9 jak na ryc. 2  
 Chitinase activity in mushroom extracts in dependence on the enzyme concentration (in  $\mu\text{g}$  of chitine hydrolysed 1 hr of incubation). Legend as in fig. 2.



Ryc. 5. Aktywność chitynazy w pieczarce świeżej i wysuszonej w zależności od pH (w mg zhydrolizowanej chityny 1 g suchej masy 1 godz. inkubacji). 1 - pieczarka świeża; 2 - pieczarka wysuszona

Chitinase activity in fresh and dry *Agaricus bisporus* in dependence on pH (in mg of chitine

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że aktywność chitynazy w badanych grzybach kształtuje się na wysokim poziomie. Jest ona zbliżona do poziomu aktywności chitynazy w przewodach pokarmowych niektórych zwierząt dzikich (Jeuniaux 1963) jak nietoperz, kret, jeż oraz niektórych zwierząt doświadczalnych (Chmielnicka i wsp. 1969), jak mysz biała, szczur Wistar, chomik i świnka morska.



Ryc. 6. Aktywność chitybiazy w różnych gatunkach grzybów (w  $\mu\text{g}$  uwolnionej acetyloglukozaminy 1 godz. inkubacji). Legenda: 1—9 jak na ryc. 2

Chitinase activity in various kinds of mushrooms (in  $\mu\text{g}$  of acetylglucosamine/1 hr of incubation). Legend: 1—9 as in fig. 2



Wysoki poziom enzymów chitynolitycznych w grzybach ma niewątpliwie znaczenie dla krążenia azotu w przyrodzie.

Katedra Nauki o Srodkach Spożywczych  
Akademia Medyczna w Łodzi ul. Kilińskiego 24  
Kierownik Doc. dr H. Młodecki

#### SUMMARY

In nine kinds of mushrooms: *Boletus edulis*, *Agaricus bisporus*, *Suillus bovinus*, *Leccinum scabrum*, *Xeroconus badius*, *Cantharellus cibarius*, *Paxillus involutus*, *Hydnum imbricatum* and *Gyromitra esculenta*, the activity of chitinolytic enzymes has been established.

Chitinase activity is at the level of 0,83—2,92 mg of hydrolysed chitin, and activity of chitobiase ranges from 0,004—0,71 mg of free N-acetylglucosamine during one hour of incubation at 37°C.

#### LITERATURA

- Chmielnicka J., Młodecki H., Filipkowska J., 1969, Zeszyty Naukowe Bromatologii i Chemii Toksykologicznej.
- Jeuniaux C., 1963, Chitine et Chitinolyse, Paris.
- Młodecki H., Chmielnicka J., Kulejowska E., Pawlicka U., 1968, Mikologia Stosowana 1, 2.
- Paech K., Tracey M., 1955, Modern methods of plant analysis, 2: 264—274.
- Reissig Strominger J., Leloir L., 1955, J. Biol. Chem. 217: 959—967.
- Zbiorowo: Enzymy nomenklatura i klasyfikacja 1967, Warszawa.