

Wstępna charakterystyka alkalicznych proteinaz syntetyzowanych przez *Mucor microsporus* Nam.

BOGUSŁAW NARZYMSKI, JADWIGA CHMIELNICKA

* Zakład Fizjologii Roślin Instytutu Biochemii i Fizjologii Uniwersytetu w Łodzi

** Zakład Bromatologii Akademii Medycznej w Łodzi

Narzymski B. (Department of Plant Physiology, Institute of Biochemistry and Physiology, University of Łódź, 90-237 Łódź, Nowopółdniowa 12/16, Poland); Chmielnicka J. (Department of Bromatology, Medical Academy of Łódź, 90-145, Narutowicza 120, Poland), *Partial characterization of alkaline proteases*, Acta Mycol. 11 (1): 17-21, 1975.

When *Mucor microsporus* Nam. was grown in a chemically defined medium alkaline proteases produced by this organisms appears in the culture filtrate. Crude proteolytic enzymes preparations isolated from these filtrates show two optima for the digestion of casein, namely at pH 8 and 11.

Optimum działania większości proteinaz, wyodrębnionych z filtratów hodowli różnych gatunków *Mucor* odbywa się w podłożu o niskiej wartości pH (Narzymski, Chmielnicka, Urbanek, 1974). Do nich należą proteinazy syntetyzowane przez *Mucor pusillus* Nam. (Somkuti, Babel 1968), a także proteinazy produkowane przez *Mucor miehei* (Martin, Rickert 1970). Mikroorganizmy te, w zależności od warunków hodowli, zdolne są również do syntezy proteinaz wykazujących optimum działania w środowisku o pH zbliżonym do 7 (Prins, Nielsen 1970).

Neutralna proteinaza wytwarzana przez jeden z chińskich gatunków rodzaju *Mucor* została opisana przez Pe-Wen Liu (Pe-Wen Liu, Shen-Ho Chen 1966). Z naszych poprzednich doświadczeń wynika, że proteinazy wytwarzane przez *Mucor microsporus* Nam. (Narzymski, Chmielnicka, Urbanek 1974) wykazują wysoką aktywność proteolityczną w środowisku alkalicznym.

Celem pracy było określenie niektórych właściwości fizyczno-chemicznych tych proteinaz zarówno w filtracie, jak i w proszku enzymatycznym wytrąconym za pomocą acetonu.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto *Mucor microsporus* Nam., (Narzyski, Chmielnicka, Urbanek 1974), stosując hodowlę wglębną.

Skład pożywki: pepton pepsynowy — 10 g, maltoza — 30 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5 g, KCl — 0,5 g, KH_2PO_4 — 1,0 g, $CaCO_3$ — 5,0 g, $ZnSO_4$ — 0,05 g, $MnCl_2$ — 0,05 g, woda wodociągowa 1000 ml. Po rozpuszczeniu składników pożywki doprowadzono wartość pH do 6,0 za pomocą 1/10 n HCl.

Hodowlę prowadzono w kolbach o poj. 500 ml (po 100 ml pożywki w każdej) na wytrząsarkach (150 cykli/min.) w temperaturze 28°. Po 72 godzinach kulturę odwirowywano w wirówce z chłodzeniem, w celu oddzielenia grzybni.

Przygotowanie preparatu enzymatycznego: do ochłodzonego supernatantu dodawano potrójną objętość acetonu oziębionego do 0°, pozostawiano w chłodni na 30 minut, po czym wirowano w tych samych warunkach. Uzyskany osad przemywano 3 razy ochłodzonym acetonem i suszono w temperaturze 0°. Preparat enzymatyczny przechowywano w lodówce.

W celu oznaczenia aktywności proteolitycznej preparatu stosowano stężenie 1 mg/1 ml. Sposób oznaczania aktywności proteolitycznej podano w poprzedniej pracy (Narzyski, Chmielnicka, Urbanek 1974).

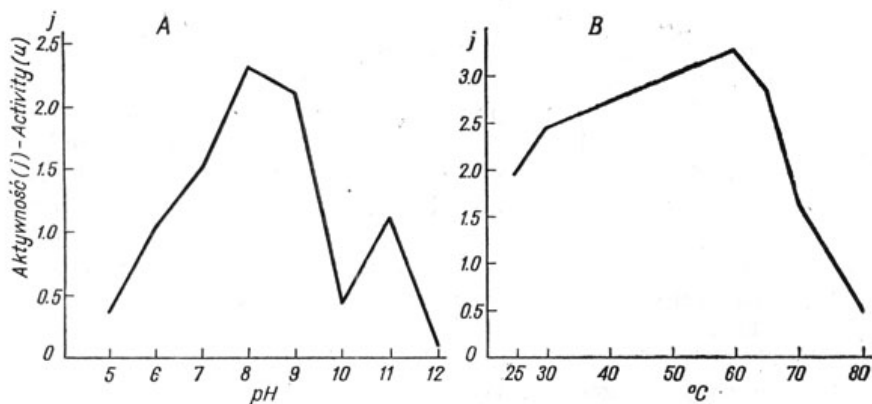
W celu ustalenia zależności aktywności proteolitycznej od rodzaju roztworów buforowych zastosowano następujące: bufor uniwersalny wg Brittona i Robinsona (pH 2,0-12,0), bufor wg Mc Ilvaine'a (pH 2,2-8,0), bufor uniwersalny wg Theorella i Stenghagena (pH 2,0-12,0), bufor fosforanowy wg Michaelisa (pH 5,3-8,3).

W przypadku ustalania wpływu stopnia zakwaszenia na stabilność preparatu enzymatycznego preparat — po rozpuszczeniu w odpowiednich roztworach buforowych — inkubowano wstępnie w ciągu 30 minut w temperaturze +4°C, po czym oznaczano aktywność w roztworze buforowym o pH 8.

Badano wpływ temperatury na aktywność preparatu enzymatycznego oraz stabilność w temperaturze 20-80°C. W tym celu przeprowadzono inkubowanie roztworu enzymatycznego w różnych zakresach temperatury w ciągu 30 minut, w roztworze buforowym o pH 8,0, a następnie oznaczano aktywność w temperaturze 30°C.

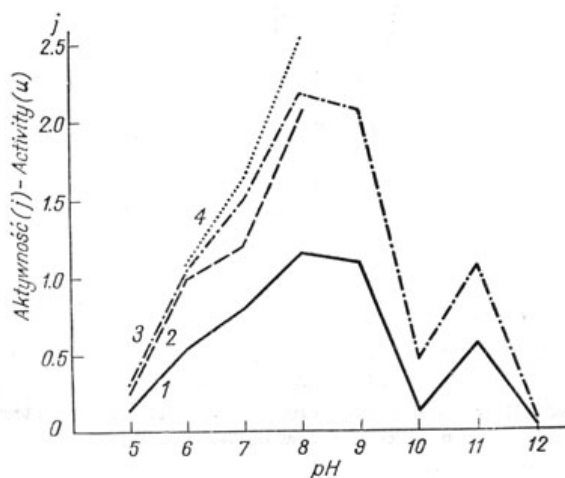
WYNIKI

Aktywność proteolityczna filtratu badanej kultury *Mucor microsporus* mieściła się w zakresie pH 5,5-11,5 (ryc. 1A). Stwierdzono dwa szczyty aktywności proteolitycznej, przy pH 8,0 i pH 11,0.



Ryc. 1. Wpływ pH (A) i temperatury (B) na aktywność proteolityczną filtratu kultury *Mucor microsporus*

Fig. 1. Effect of pH (A) and temperature (B) on proteolytic activity of filtrate of *Mucor microsporus*



Ryc. 2. Aktywność proteolityczna preparatu enzymatycznego otrzymanego z badanej kultury *Mucor microsporus* w zależności od rodzaju buforu

1 — bufor uniwersalny wg Brittona i Robinsona, 2 — bufor wg Mc Ilvaine'a, 3 — bufor uniwersalny wg Theorella i Stanhegena, 4 — bufor fosforanowy wg Michaelisa

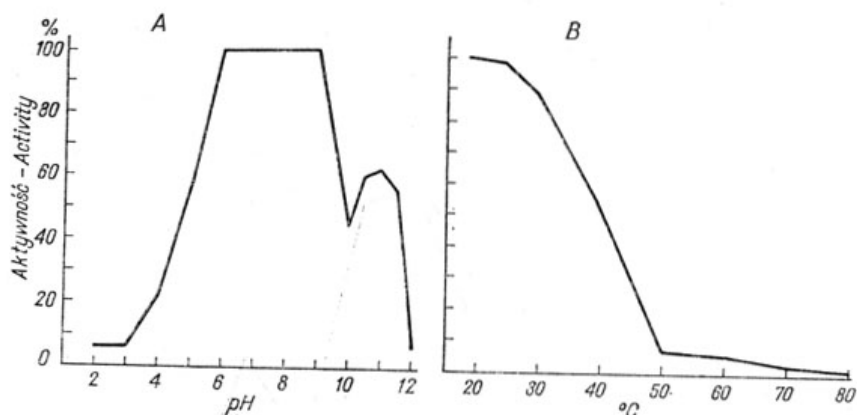
Fig. 2. Proteolytic activity of enzymes from culture of *Mucor microsporus* examined in relation to of various buffers

1 — universal buffer (Britton and Robinson), 2 — buffer (Mc Ilvaine), 3 — buffer universal (Theorell and Stanhegen), 4 — phosphate buffer (Michaelis)

Najwyższy poziom aktywności (ryc. 1B) dla filtratu o pH 8,0 uzyskano w temperaturze o zakresie 50-60°. W temperaturze wyższej następował gwałtowny spadek aktywności.

Aktywność proteolityczna preparatu enzymatycznego, jak wynika z badań (ryc. 2) była uzależniona od rodzaju stosowanego buforu. Najbardziej odpowiednim okazał się roztwór buforowy uniwersalny wg Thorella i Stenghagena, natomiast roztwór buforowy wg Brittona i Robinsona w dużym stopniu obniżał aktywność enzymatyczną. Tak jak i w przypadku filtratu, w preparacie enzymatycznym stwierdzono dwa szczyty aktywności proteolitycznej, których maksimum przypada również przy pH 8,0 i 11,0.

Wyniki doświadczeń (ryc. 3A) wskazują, że aktywność proteolityczna preparatu enzymatycznego była stabilna przy pH 6,0-9,0. Stwierdzono również drugi szczyt stabilności aktywności badanego preparatu przy pH 10,5-11,5, co wskazywałoby na obecność różnych proteinaz działających w środowisku alkalicznym.



Ryc. 3. Wpływ pH (A) i temperatury (B) na stabilność preparatu enzymatycznego *Mucor microsporus*

Fig. 3. Effect of pH (A) and temperature (B) on stability of proteolytic enzymes produced by *Mucor microsporus*

Badany preparat enzymatyczny okazał się bardzo wrażliwy na temperaturę (ryc. 3B). Stabilność aktywności preparatu następowała w temperaturze o zakresie 0-20°. W temperaturze wyższej następował gwałtowny spadek aktywności proteolitycznej i prawie całkowity jej zanik już w temperaturze 50°.

Dla porównania właściwości fizyczno-chemicznych proteinaz różnych gatunków grzybów z rodzaju *Mucor* zestawiono tab. 1. Preparat proteoli-

Tabela 1—Table 1

Porównanie niektórych właściwości proteinaz z rodzaju *Mucor*
The comparison of some properties of *Mucor* proteases

Gatunki Species	Optimum aktywności proteinaz Optimum of protease activity		Stabilność aktywności proteinaz Stability of protease activity	
	pH	temp. °C	pH	temp. °C
<i>Mucor pusillus</i> Lindt.	3,8-5,6	55	3,0-6,0	30-50
<i>Mucor miehei</i> Coqney et Emerson	5,7-7,5	50-65	3,0-6,0	—
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer.	3,0-3,5	—	3,0-4,0	—
I.	7,5-9,0	60	6,0-9,0	0-20
<i>Mucor microsporus</i> Nam.				
II.	11,0	—	10,5-11,5	—

tyczny uzyskany z grzybni *Mucor microsporus* użytej do niniejszych badań różnił się od proteinaz pozostałych grzybów zakresem pH, w którym aktywność była optymalna. Dotychczas nie znaleźliśmy proteinaz produkowanych przez grzyby z rodzaju *Mucor* aktywnych w środowisku alkalicznym. Dalsze badania powinny określić również właściwości fizyczno-chemiczne proteinaz optymalnie aktywnych przy pH 11,0.

Optimum temperatury dla optymalnej aktywności uzyskanego preparatu enzymatycznego wynosiło 60°. Preparat ten okazał się jednak bardzo niestabilny.

LITERATURA

- Martin O., Rickert W., 1970, The isolation and partial characterization of an acid protease produced by *Mucor miehei*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. 37: 301.
- Narzymiski B., Chmielnicka J., Urbanek H., 1974, Wpływ składu podłoża i warunków hodowli na syntezę alkalicznych proteinaz produkowanych przez *Mucor microsporus* Nam., Acta Myc. 10: 295.
- Pen-Wen Liu, Shen-Ho Chen, 1966, Studies on the isolation, purification and properties of the proteolytic enzyme produced by *Mucor sufu*, Chem. Abstract 65: 10859 c.
- Prins J., Nielsen T. K., 1970, Microbial rennet *Mucor miehei*, Process Biochem. 5: 34.
- Somkuti G. A., Babel F. J., 1968, Purification and properties by *Mucor pusillus* acid protease, J. Bacteriol. 95: 1407.
- Somkuti G. A., Babel F. J., 1968, Acid protease synthesis by *Mucor pusillus* in chemically defined media, J. Bacteriol. 95: 1415.