



## Ocena przydatności bakterii *Thermus ruber* jako źródła termostabilnej $\alpha$ -glukozydazy użytecznej do wytwarzania syropów glukozowych

Izabela Sinkiewicz, Józef Synowiecki

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

### Evaluation of *Thermus ruber* as a source of thermostable $\alpha$ -glucosidase useful for production of glucose syrups

#### Summary

*Thermus ruber* produces  $\alpha$ -glucosidase detected in the crude extract of cell proteins. This enzyme exhibits optimum activity at 65°C and pH 6,0. The enzyme was stable within a range of pH 5.5 to 8.0 and in 65°C for 60 min. The rate of *p*-nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranoside cleavage was higher than that for maltose. With maltotetraose, maltopentaose and maltohexaose, the hydrolysis rate decreased with increasing the molecular weight of the substrate. Our data suggest that the starch converting process could be improved using  $\alpha$ -glucosidase from *Thermus ruber*.

#### Key words:

$\alpha$ -glucosidase, thermostable enzymes, glucose syrups, *Thermus ruber*.

#### Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,  
Katedra Chemii,  
Technologii  
i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. Gabriela Narutowicza  
11/12,  
80-952 Gdańsk;  
e-mail:  
synowiec@chem.pg.gda.pl

### 1. Wstęp

$\alpha$ -Glukozydazy są grupą enzymów oddzielających reszty glukozytowe poprzez rozszczepienie wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych lub z mniejszą aktywnością  $\alpha$ -1,6-glikozydowych od strony nie-redukującego końca cząsteczek disacharydów, oligosacharydów lub niekiedy polisacharydów. Enzymy te w przeciwieństwie do

glukoamylaz charakteryzują się wzrastającą aktywnością względem małych cząsteczkowych substratów oraz zdolnością hydrolizowania maltozy, sacharozy i innych disacharydów. Aktywność glukoamylaz jest natomiast największa względem polisacharydów i dość szybko maleje w miarę zmniejszania się masy cząsteczkowej substratu (1).

Skutkiem tego jest spowolnienie przebiegu zaawansowanego scukrzania skrobi przeprowadzanego w celu uzyskania syropów glukozydowych. Nagromadzeniu się małych cząsteczkowych oligosacharydów mało wydajnie hydrolizowanych przez glukoamylazę można ewentualnie zapobiec wprowadzając do środowiska reakcji  $\alpha$ -glukozydazę. Warunkiem synergistycznego oddziaływania obu enzymów jest jednak podobieństwo ich optymalnych warunków działania.  $\alpha$ -Glukozydazy wspomagające działanie powszechnie stosowanych glukoamylaz powinny zatem wykazywać największą aktywność w temperaturze około 60°C przy pH 4,5 (2).

Jednym ze źródeł takiego enzymu może być termofilna bakteria *Thermus ruber*. Jest ona gramujemnym, nie wytwarzającym endospor tlenowcem, którego komórki mają postać pałeczek o długości 3-6  $\mu\text{m}$  i szerokości 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . Kolonie tej bakterii charakteryzują się różową barwą pochodzącą od karotenoidów pełniących funkcję fotoprotektorów (3). Podobnie jak inne szczepy z rodzaju *Thermus* nie wytwarzają przetrwalników, jak też wici. Ich zewnętrzna warstwa ściany komórkowej ma strukturę falistą spowodowaną licznymi wgłębieniami (4). W centralnej części komórki tego termofila znajduje się duży nukleoid, zaś mezosomy z aktywnie działającą dehydrogenazą i ciała tłuszczowe są w częściach peryferyjnych. Ściana komórkowa składa się z zewnętrznej błony i sztywnej warstwy peptydoglikanu. Błona zewnętrzna umożliwia kontakt między zewnętrznymi i wewnętrznymi warstwami ściany komórki dzięki obecności w niej nieregularnych wgłębień (5).

Gatunek *Thermus ruber*, podobnie jak *Thermus silvanus* i *Thermus chliarophilus*, był do tej pory zaliczany do rodzaju *Thermus*. Badania filogenetyczne 16S rRNA, jak również analiza profilu polarnych lipidów i składu hydroksykwasów tłuszczowych przyczyniły się do wyodrębnienia nowego rodzaju *Meiothermus* (6). Pomiędzy poszczególnymi gatunkami rodzaju *Meiothermus* podobieństwo sekwencji 16S rRNA przekracza 88%, zaś między rodzajami *Thermus* i *Meiothermus* jest mniejsze od 88%. Zakres temperatur rozwoju bakterii rodzaju *Meiothermus* mieści się w granicach od 50 do 65°C, natomiast dla rodzaju *Thermus* wynosi 65-80°C (7). Minimalna temperatura rozwoju *T. ruber* wynosi 35-40°C, a największy przyrost biomasy uzyskiwano w 55°C przy pH 8,0.

Bakterie *T. ruber* wyizolowano z gorących źródeł (od 50 do 65°C, pH 6,5-7,3) Kamczatki (4). Szczepy znalezione na terenach Islandii charakteryzują się różowym zabarwieniem (8). *T. ruber* rozwija się w warunkach tlenowych, lecz dwa zidentyfikowane szczepy mogą rosnąć w warunkach beztlenowych w obecności azotanów (V). Szczepy te prawdopodobnie wytwarzają reduktazę azotanów, która umożliwia im wykorzystanie azotanów (V) jako akceptora elektronów (9). Charakteryzują się one wrażliwością na kanamycynę i antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Bakterie



*T. ruber* wykorzystują jako źródło węgla węglowodany (fruktoza maltoza mannoza, sacharoza), sole kwasów karboksylowych i alkohole (8). Większość szczepów tego gatunku ma zdolność hydrolizy elastyny, fibryny, żelatyny oraz rozkładu arbutyny, eskuliny, *p*-nitrofenylo- $\alpha$ -glukopiranozydu (Glc $\alpha$ pNp) i *p*-nitrofenylo- $\beta$ -glukopiranozydu (Glc $\beta$ pNp). Przyswajają D-celobiozę, D-ksylozę, D-trehalozę, D-mannitol, D-sorbitol, maltozę, laktozę, sacharozę, L-asparaginę, L-glutaminian, L-serynę, L-prolinę i L-argininę. Bakterie te przejawiają aktywność katalazy,  $\alpha$ -galaktozydazy i syntazy trehalozy oraz mają zdolność utleniania tiosiarczanu do siarczanu (VI) (10,11). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że ekstrakt białek komórkowych tego drobnoustroju katalizuje hydrolizę maltozy oraz Glc $\alpha$ pNp. W przedstawionych wynikach badań wskazuje się, że mało dotychczas zbadana termofilna bakteria *T. ruber* może być też źródłem  $\alpha$ -glukozydazy użytecznej do wytwarzania syropów glukozowych.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Szczep i hodowla mikroorganizmu

Szczep *T. ruber* (DSM 1279) ożywiano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta, zawieszając liofilizowane komórki bakterii w 1 ml podłoża zawierającego: 0,5% peptonu, 0,1% wyciągu drożdżowego, 0,1% skrobi oraz wodę. Tak przygotowaną zawiesinę przenoszono następnie do 5 ml podłoża o takim samym składzie i inkubowano przez 3-5 dni w temperaturze 55°C. Porcje podłoża (pH 8,0) o objętości 1000 ml umieszczano w kolbach Erlenmayera o pojemności 2000 ml, sterylizowano w temperaturze 121°C przez 30 min i zaszczepiano. Hodowlę drobnoustroju prowadzono przez 48 godz. bez dodatkowego napowietrzania w termostatowanej wstrząsarce typu ECOTRON w temperaturze 55°C z szybkością wstrząsania 160 cykli/min. Biomase komórek odwirowywano przez 15 min (9000 $\times$ g), zamrażano i przechowywano w -18°C przez okres nie przekraczający trzech dni.

### 2.2. Ekstrakcja białek komórkowych

Do 10 g zamrożonej biomasy dodawano 20 g Aluminy A-5 (Sigma, St. Louis, MO, USA) i rozcierano przez 15 min w moździerz (4°C) wprowadzając stopniowo 70 ml 0,01 M buforu fosforanowego (pH 6,0) zawierającego w 1 litrze 1 mmol ditiotretolu (DTT) i 1 mmol MgSO<sub>4</sub>. Otrzymaną zawiesinę wirowano przez 15 min (9000 $\times$ g) i w uzyskanym supernatancie oznaczano zawartość białka metodą Bradford (12) oraz aktywność  $\alpha$ -glukozydazy. Ten sposób izolacji powoduje stratę około 22%  $\alpha$ -glukozydazy wytwarzanej podczas hodowli *T. ruber*, która znajduje się w odwirow-



wanej pozostałości komórek. Zastosowanie ultradźwięków nie miało znaczącego wpływu na poprawę wydajności  $\alpha$ -glukozydazy (wyniki nie publikowane).

### 2.3. Oznaczanie aktywności $\alpha$ -glukozydazy względem *p*-nitrofenylo- $\beta$ -glukopiranozydu

Aktywność  $\alpha$ -glukozydazy oznaczano metodą Constantino i wsp. (13), polegającą na oznaczeniu *p*-nitrofenolu uwolnionego podczas hydrolizy roztworu Glc $\alpha$ pNp w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym. W porównaniu ze standardową procedurą stężenie Glc $\alpha$ pNp obniżono do 5 mM, było to możliwe, bo stężenia substratu przekraczające 1,5 mM nie powodowały zwiększenia szybkości reakcji (14). Do przygotowania roztworu Glc $\alpha$ pNp stosowano bufor fosforanowo-cytrynianowy o pH 6,0, przy którym  $\alpha$ -glukozydaza z *T. ruber* ma największą aktywność (rozd. 2.5). W celu wykonania oznaczenia do probówek zawierających 2,5 ml wstępnie ogrzanego do 65°C substratu dodawano 0,5 ml ekstraktu białek komórkowych (otrzymano wg procedury podanej w rozdz. 2.2.). Po upływie 5 min reakcję przerywano dodając 1 ml 1 M roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i mierzono absorpcję ( $A_{405}$ ) względem analogicznie ogrzewanej próby odniesienia, zawierającej zamiast roztworu enzymu 0,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 6,0. Stężenie uwolnionego *p*-nitrofenolu obliczano stosując jego molowy współczynnik absorpcji wynoszący  $16,86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto ilość enzymu hydrolizującą w ciągu jednej minuty 1  $\mu\text{mol}$  substratu w temperaturze 65°C przy pH 6,0.

Oznaczenia zmian aktywności  $\alpha$ -glukozydazy podczas hodowli *T. ruber* przeprowadzano bez izolacji enzymu z komórek. W celu zwiększenia przepuszczalności błony cytoplazmatycznej do 0,5 ml zawiesiny komórek pobieranej podczas hodowli drobnoustroju i umieszczonej w szczelnie zamykanych probówkach, dodawano 2 ml 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 6,0 oraz 100  $\mu\text{l}$  chloroformu i 10  $\mu\text{l}$  1% roztworu SDS. Zawartość probówek dokładnie mieszano przez 30 s (Vortex) i ogrzewano 60 min w 65°C. Następnie dodawano 0,4 ml 5 mM roztworu Glc $\alpha$ pNp w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 6,0). Po upływie 10 min reakcję zatrzymywano dodając 1 ml 1 M roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Komórki odwirowywano (9000 $\times$ g, 5 min) i mierzono absorpcję supernatantu ( $A_{405}$ ) względem analogicznie przygotowanej i ogrzewanej próby odniesienia zawierającej zamiast zawiesiny komórek 0,5 ml czystego podłoża. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto ilość enzymu, wykazywaną przez 1 ml zawiesiny komórek, hydrolizującą w ciągu jednej minuty 1  $\mu\text{mol}$  substratu w temperaturze 65°C przy pH 6,0.



#### 2.4. Oznaczenie aktywności $\alpha$ -glukozydazy względem disacharydów i oligosacharydów

Ilość glukozy uwolnionej podczas hydrolizy różnych oligosacharydów lub disacharydów określano metodą Huggeta i Nixona (15), stosując odczynnik A zawierający 125 mg oksydazy glukozowej, 5 mg peroksydazy, 0,5 ml 1% etanolowego roztworu *o*-dianizydyny i 0,5 M buforu fosforanowego (pH 7,0), dodanego do uzyskania objętości 100 ml. Prowadzoną w 65°C hydrolizę inicjowano dodając 0,5 ml roztworu enzymu do 0,5 ml ogrzanego do 65°C 0,25% roztworu maltozy, maltotriozy, maltotetraozy, maltopentaozy lub maltoheksaozy w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym (pH 6,0). Po upływie określonego czasu reakcję zatrzymywano przez oziębienie próbek w wodzie z lodem. Analogicznie ogrzewano próby odniesienia zawierające zamiast roztworu enzymu 0,5 ml 0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 6,0. Do 1 ml uzyskanych hydrolizatów lub próby odniesienia dodawano 3 ml odczynnika A. Badane próbki ogrzewano przez 30 min w temperaturze 40°C, a następnie po ich oziębieniu mierzono absorpcję przy długości fali 415 nm względem analogicznie przygotowanych próbek odniesienia. Stężenie glukozy ( $\mu\text{mol/ml}$ ) obliczano z równania regresji krzywej wzorcowej wyznaczonej w zakresie stężeń glukozy do 0,125  $\mu\text{mol/ml}$ . Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto ilość enzymu, która w czasie 1 min uwalnia z substratu w warunkach reakcji 1  $\mu\text{mol}$  glukozy. Do obliczenia aktywności specyficznej zawartość białek oznaczano metodą Bradford (12).

#### 2.5. Warunki działania i badanie wpływu temperatury i pH na stabilność enzymu

Zależność aktywności  $\alpha$ -glukozydazy od pH reakcji oznaczano w 65°C stosując 5 mM roztwory Glc $\alpha$ pNp w 0,1 M buforach fosforanowo-cytrynianowych o pH od 5,0 do 8,0. Wpływ temperatury na aktywność enzymu określano, stosując roztwór substratu o pH 6,0 i zmieniając temperaturę reakcji w zakresie od 50 do 85°C. Termostabilność  $\alpha$ -glukozydazy określano mierząc spadek aktywności podczas 60 min inkubacji roztworu enzymu w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 6,0 lub 7,0 w temperaturach zmienianych w zakresie od 40 do 80°C. Oznaczenia aktywności enzymu dokonywano według procedury podanej w rozdziale 2.3. Badając wpływ pH na stabilność enzymu, roztwory  $\alpha$ -glukozydazy preinkubowano w 0,1 M buforach fosforanowo-cytrynianowych o pH w zakresie od 4,5 do 8,0 w temperaturze 55°C przez 30, 60 i 120 min, a następnie oznaczano stopień hydrolizy Glc $\alpha$ pNp (wg 2.3).

#### 2.6. Wpływ niektórych węglowodanów na aktywność $\alpha$ -glukozydazy

Badanie wpływu niektórych cukrów konkurujących z Glc $\alpha$ pNp o centrum katalityczne  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* przeprowadzано wprowadzając do substratu, przygo-

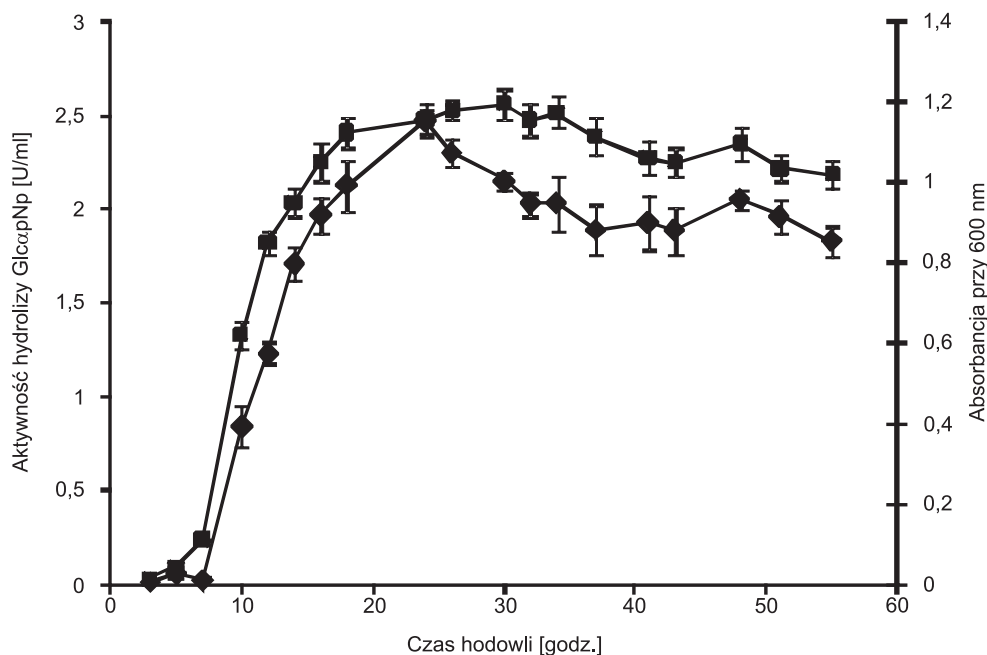


owanego według procedury podanej w rozdziale 2.3, glukozę, galaktozę, fruktozę, ksylozę, laktozę, maltozę, sacharozę lub trehalozę w ilości niezbędnej do uzyskania w środowisku reakcji określonych stężeń wymienionych cukrów. Oznaczenia aktywności przeprowadzano według procedury podanej w rozdziale 2.3 mierząc absorpcję względem prób odniesienia, do których zamiast roztworu enzymu wprowadzono równoważną objętość roztworu cukru o danym stężeniu w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 6,0. Zmiany aktywności określano jako procent aktywności analogicznie badanych prób kontrolnych, do których nie wprowadzono węglowodanów.

### 3. Omówienie wyników

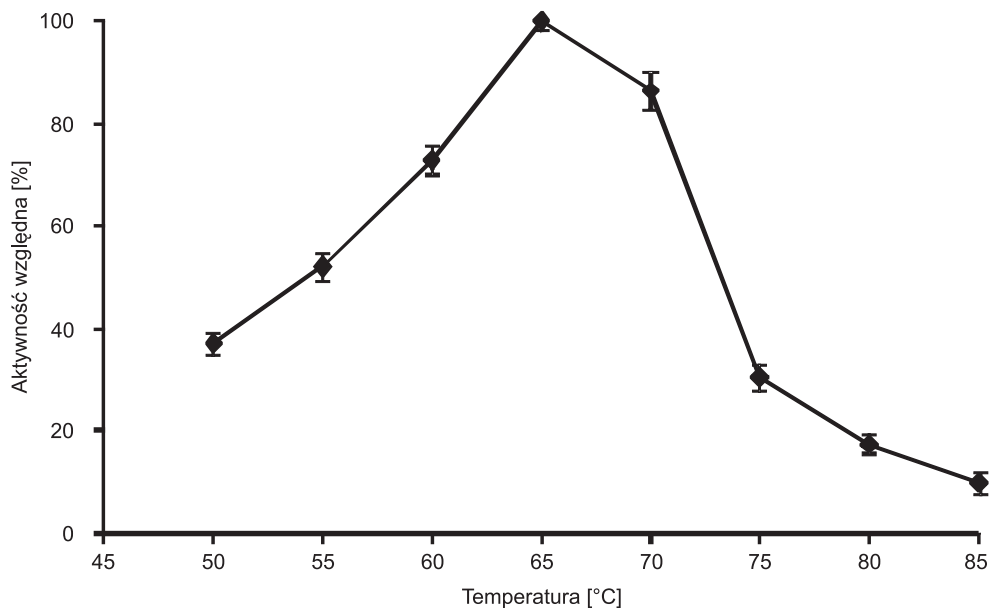
#### 3.1. Warunki działania i termostabilność $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber*

Termofilna bakteria *T. ruber* charakteryzuje się umiarkowaną szybkością rozwoju i podobnie jak w przypadku innych gatunków należących do rodzaju *Thermus* (16), czas trwania fazy wykładniczego wzrostu wynosi około 24-30 godz., podczas, której OD<sub>600</sub> wzrasta do wartości 1,2. Na rysunku 1 przedstawiono zależność przyrostu



Rys. 1. Przyrost biomasy (■) i zmiany poziomu hydrolizy GlcαpNp (◆) podczas hodowli *Thermus ruber* w temp. 55°C.



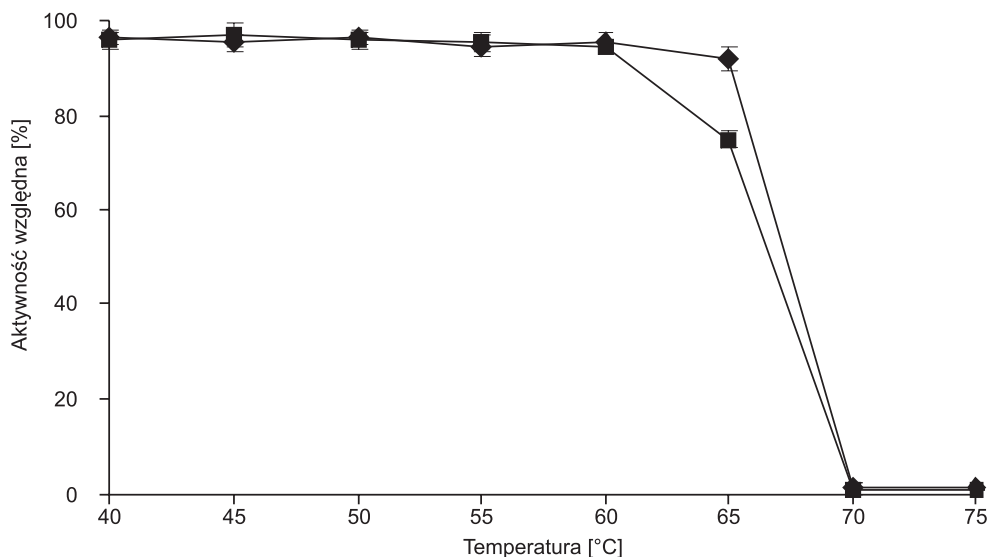


Rys. 2. Wpływ temperatury reakcji (pH 6,0) na aktywność  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber*. Wyniki są średnią z 5 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

ilości komórek bakterii i aktywności  $\alpha$ -glukozydazy od czasu trwania hodowli. Współczynnik korelacji pomiędzy wymienionymi zmiennymi wynosi 0,98. Sugeruje to, że przyrost aktywności enzymatycznej jest spowodowany zwiększeniem ilości komórek, a nie wzrostem ilości wytwarzanego przez poszczególne komórki enzymu. Największą wydajność biomasy komórek *T. ruber* wynoszącą około 6 g/l cieczy pohodowlanej uzyskano po zakończeniu hodowli prowadzonej w temperaturze 55°C na podłożu o składzie podanym w rozdziale 2.1 (14).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że ekstrakt białek komórkowych z *T. ruber* katalizuje hydrolizę Glc $\alpha$ Np z aktywnością wynoszącą około 0,25 U/mg białka. Jednym z celów tej pracy była ocena przydatności wymienionej  $\alpha$ -glukozydazy do zwiększenia stopnia scukrzania skrobi podczas łącznego wykorzystania handlowego preparatu glukoamylazy i wyizolowanego enzymu.  $\alpha$ -Glukozydaza z *T. ruber* osiąga największą aktywność w temperaturze 65°C (rys. 2), czyli podobnej jak preparat enzymatyczny AMG 300L (glukoamylaza z *Aspergillus niger*) (17). Najbardziej termostabilne  $\alpha$ -glukozydazy o maksymalnej aktywności w temperaturze powyżej 80°C, a nawet około 100°C są wytwarzane przez hipertermofilne archeony: *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus* i *Sulfolobus solfataricus* (13,18,19). W temperaturze 50°C  $\alpha$ -glukozydaza z *T. ruber* wykazuje około 40% maksymalnej aktywności. Po przekroczeniu optymalnej temperatury działania enzymu następował dość szybki spadek jego aktywności, która w temp. 75°C wynosiła 30% maksymalnej wartości (rys. 2).





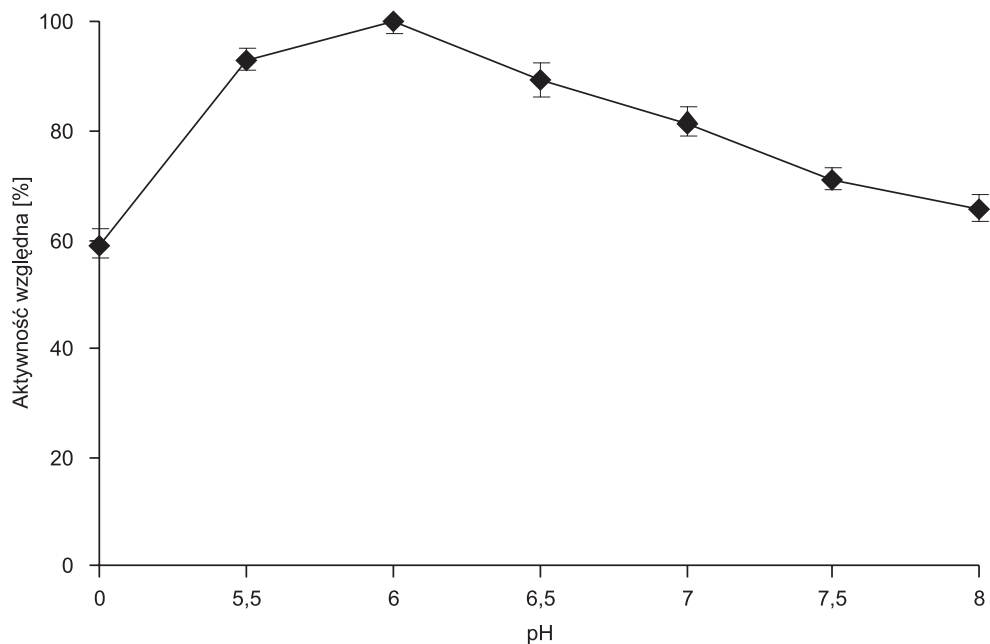
Rys. 3. Termostabilność  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber* inkubowanej przez 1 godz. w buforze o pH 6,0 (◆) lub pH 7,0 (■). Wyniki są średnią z 5 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

W badaniach termostabilności  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* wykazano, że po 1 godz. inkubacji w 70°C w środowisku buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 6,0 lub 7,0 następowała całkowita inaktywacja ekstraktu białek komórkowych. Natomiast w zakresie temperatur od 40 do 65°C badany enzym zachowywał ponad 90% aktywności początkowej (rys. 3). Pod względem wrażliwości na temperaturę badana  $\alpha$ -glukozydaza jest tak samo przydatna do wytwarzania syropów glukozowych jak preparat AMG 300L, który traci całkowicie aktywność już po 30 min ogrzewania w 80°C. Inkubacja enzymu w buforach o pH 6,0 lub pH 7,0 nie miała zasadniczo wpływu na termostabilność badanego białka. Po jednej godzinie w 65°C  $\alpha$ -glukozydaza z *T. ruber* wykazuje większą termostabilność od charakteryzujących się podobną temperaturą działania  $\alpha$ -glukozydaz z *Chaetomium thermophilum* i *Geobacillus thermodenitrificans* (20,21).

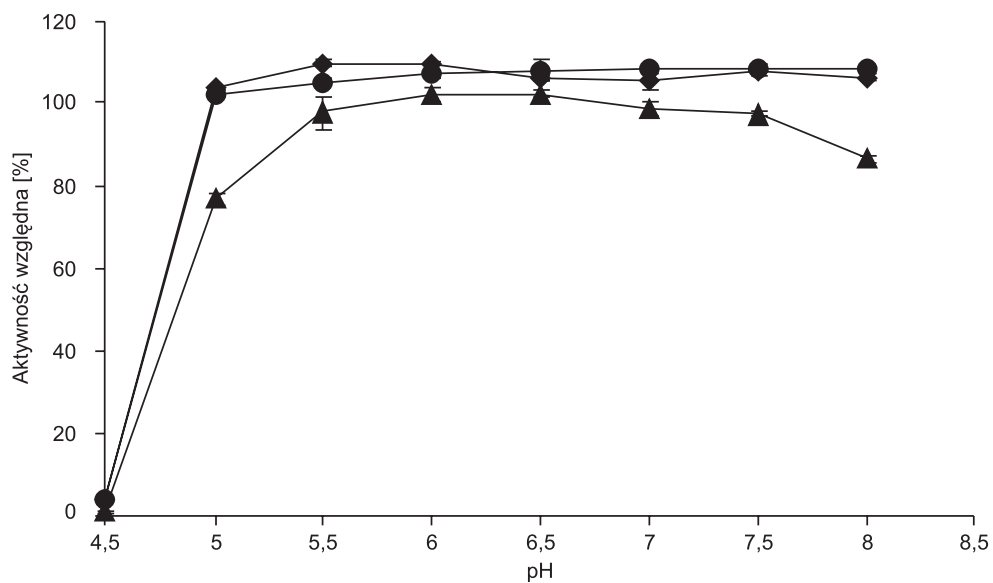
Ponieważ pod względem optymalnego pH działania, wynoszącego 6,0  $\alpha$ -glukozydaza z *T. ruber* tylko nieznacznie różni się od  $\alpha$ -amylazy z *Bacillus licheniformis* (Termamyl®) o maksymalnej aktywności przy pH 6,3, to można ją wykorzystać bez potrzeby regulacji pH pomiędzy etapami upłynniania i scukrzania skrobi (22). Zachowanie przez badany enzym około 80% aktywności w dość szerokim zakresie pH od 5,3-7,0 (rys. 4) stwarza też możliwość jego współdziałania z rekombinowaną  $\alpha$ -amylazą z *P. woesei* (23). Nie zaobserwowano także istotnych różnic w wartości optymalnego pH pomiędzy  $\alpha$ -glukozydazami wytwarzanymi przez *T. ruber* (pH 6,0) i *Thermus thermophilus* HB-8 (pH 6,2) (24).







Rys. 4. Wpływ pH środowiska reakcji na aktywność  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber*. Wyniki są średnią z 5 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rys. 5. Zmiany aktywności  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber* po inkubacji w temp. 55°C przez 0,5 godz. (●), 1 godz. (◆) i 2 godz. (▲) w buforach fosforanowo-cytrynianowych o pH od 4,5 do 8,0. Wyniki są średnią z 5 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

$\alpha$ -Glukozydaza z *T. ruber* przejawia dużą odporność na zmiany kwasowości środowiska i po jednej godzinie inkubacji w buforach o pH w zakresie od 5,5 do 8,0 zachowuje prawie nie zmienioną aktywność (rys. 5). Dopiero dwugodzinna inkubacja powoduje obniżenie aktywności o około 10% początkowej wartości.

### 3.2. Właściwości $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber*

Charakterystyczną cechą  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* jest około 35-krotnie większa aktywność katalizowania hydrolizy GlcapNp niż maltozy. Do grupy  $\alpha$ -glukozydaz o preferencyjnej aktywności względem glikozydów zawierających alkilowe lub arylowe reszty aglikonu należy też analogiczny enzym pochodzący z *T. thermophilus* (24,25). Hydroliza maltotriozy zachodziła z podobną szybkością jak maltozy, a w przypadku innych maltooligosacharydów szybkość reakcji malała wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej substratu (tab. 1).

Tabela 1

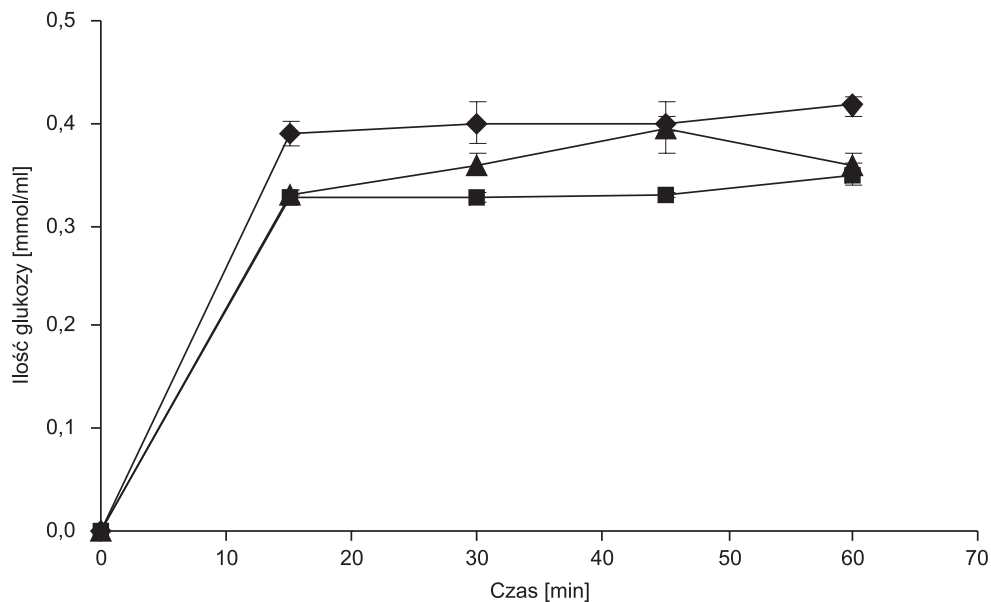
Specyficzność substratowa  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber*

Substrat	Szybkość hydrolizy ( $10^{-3}$ U/mg)	Względna szybkość hydrolizy (%)
maltoza	1,27 $\pm$ 0,01	100,0
maltotrioza	1,21 $\pm$ 0,02	95,3
maltotetraoza	0,99 $\pm$ 0,01	88,0
maltopentaoza	0,71 $\pm$ 0,01	55,9
maltoheksaoza	0,51 $\pm$ 0,01	40,2

Przedstawione wyniki są średnią z czterech serii oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

$\alpha$ -Glukozydazy, w odróżnieniu od glukoamylaz, charakteryzują się wzrastającą aktywnością względem małych cząsteczkowych substratów, co sugeruje możliwość poprawy katalizowania hydrolizy skrobi przez jednoczesne wykorzystanie glukoamylazy oraz  $\alpha$ -glukozydazy. W celu sprawdzenia współdziałania preparatu AMG 300L z ekstraktem białek komórkowych *T. ruber*, przeprowadzono oznaczenia działania samego preparatu AMG 300L, działania ekstraktu białek komórkowych z *T. ruber* oraz współdziałania obu enzymów (rys. 6). Hydrolizę 1% roztworu skrobi w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0 prowadzono przez 1 godz. w temperaturze 60°C. Parametry te stanowią wartości średnie pomiędzy optymalnymi warunkami działania  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* i handlowego preparatu AMG 300L. Działanie badanej  $\alpha$ -glukozydazy określano stosując ekstrakt białek komórkowych zagęszczony przez ultrafiltrację.





Rys. 6. Ilość glukozy uwalnianej podczas hydrolizy 1% roztworu skrobi w obecności: 5,4 U/ml AMG 300 L + 4,0 U/ml zatężonego ekstraktu (◆); 9,4 U/ml AMG 300 L (▲); 5,4 U/ml AMG 300L (■). Wyniki są średnią z 4 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

Równoczesne zastosowanie handlowego preparatu glukoamylazy (5,4 U/ml) oraz preparatu  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* (4 U/ml) spowodowało już po 15 min reakcji wzrost ilości wytwarzanej glukozy o około 19%, w porównaniu z działaniem takiej samej ilości jednostek aktywności (9,4 U/ml) samej glukoamylazy (rys. 6). Po około 40 min procesu katalizowanego tylko glukoamylazą (9,4 U/ml) następował ponadto spadek zawartości glukozy w mieszaninie reakcyjnej (spowodowany reakcją rewersji), którego nie zaobserwowano w przypadku stosowania analogicznej ilości jednostek (9,4 U/ml) mieszaniny glukoamylazy i  $\alpha$ -glukozydazy. Świadczy to o możliwości wykorzystania  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* w celu zwiększenia wydajności scukrzania syropów skrobiowych.

### 3.3. Wpływ cukrów prostych i złożonych na aktywność $\alpha$ -glukozydazy

Niektóre cukry podobne strukturalnie do substratu mogą działać jako kompetytywne inhibitory  $\alpha$ -glukozydaz, wiążąc się odwracalnie z centrum katalitycznym enzymu i blokując jego dostęp dla cząsteczek Glc $\alpha$ pNp. Największy wpływ na aktywność hydrolizy tego substratu wywiera glukoza powodująca przy 50 mM stężeniu zmniejszenie aktywności  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* o 70% aktywności próby kontrol-

nej nie zawierającej wymienionego cukru. Podobnie, jak badany enzym,  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermoanaerobium* Tok6-B1 i *T. thermophilus* tracą przy 50 mM stężeniu glukozy odpowiednio 70 i 67% aktywności próby kontrolnej (26,27). Słabsze oddziaływanie inaktywujące na badaną  $\alpha$ -glukozydazę wywiera także ksyloza i galaktoza. W niektórych przypadkach zmniejszenie aktywności  $\alpha$ -glukozydazy następujące dopiero przy wyższych stężeniach cukrów może być spowodowane nasilającym się tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cukrów a polarnymi ugrupowaniami białek, co powoduje zmiany struktur wodnych otaczających cząsteczek enzymu. Maltoza powoduje natomiast niewielką aktywację badanego enzymu (tab. 2). Fruktოza, sacharoza, laktoza i trehaloza nie zmieniają istotnie aktywności  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber*. Można to tłumaczyć łatwiejszym wiązaniem cząsteczek enzymu z Glc $\alpha$ pNp niż ze wspomnianymi cukrami podczas tworzenia aktywnego kompleksu.

Tabela 2

Wpływ różnych cukrów na zmiany aktywności  $\alpha$ -glukozydazy z *Thermus ruber*

Cukier	Aktywność względna [%] przy stężeniu cukru		
	10 mM	20 mM	50 mM
glukoza	55,0 $\pm$ 0,78	44,5 $\pm$ 1,0	30,3 $\pm$ 0,57
galaktoza	90,5 $\pm$ 0,89	88,1 $\pm$ 0,66	84,3 $\pm$ 1,2
fruktoza	97,5 $\pm$ 0,39	94,1 $\pm$ 0,78	93,0 $\pm$ 0,59
ksyloza	95,5 $\pm$ 0,39	86,2 $\pm$ 0,63	76,3 $\pm$ 0,77
sacharoza	97,8 $\pm$ 0,36	97,2 $\pm$ 1,5	97,3 $\pm$ 0,86
laktoza	99,7 $\pm$ 1,1	97,5 $\pm$ 1,1	95,5 $\pm$ 0,71
trehaloza	102,7 $\pm$ 0,81	99,9 $\pm$ 1,1	98,2 $\pm$ 1,2
maltoza	107,9 $\pm$ 0,59	112,1 $\pm$ 0,66	113,9 $\pm$ 0,78

Wyniki są średnią z 4 oznaczeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

### 3. Podsumowanie

Termofilna bakteria *T. ruber* może być przydatna jako źródło termostabilnej  $\alpha$ -glukozydazy m.in. ze względu na satysfakcjonującą wydajność biomasy wynoszącą około 6 g/l pożywki i możliwość hodowli drobnoustroju w tlenowych warunkach na nieskomplikowanych i mało kosztownych podłożach zawierających ekstrakt drożdżowy i pepton K.  $\alpha$ -Glukozydaza ma największą aktywność przy kwasowości środowiska zbliżonej do optymalnych warunków działania preparatów termostabilnych  $\alpha$ -amylaz stosowanych powszechnie do upłynniania skrobi. Dzięki zastosowaniu mieszaniny handlowego preparatu AMG 300L oraz  $\alpha$ -glukozydazy z *T. ruber* uzyskuje się większą szybkość scukrzania, w porównaniu z działaniem takiej samej ilo-



ści jednostek aktywności samej glukoamylazy, podczas którego przy większym stężeniu produktu szybkość scukrzania malała spowodowana reakcją rewersji. Jednoczesne zastosowanie tych enzymów stwarza zatem możliwość poprawy wydajności scukrzania syropów skrobiowych.

## Literatura

1. Krasikov V. V., Karelov D. V., Firsov L. M., (2001), *Biochemistry*, 66, 267-281.
2. Kennedy J. F., Cabalda V. M., White C. A., (1988), *TIBTECH*, 6, 184-189.
3. Loginova L. G., Egorova L. A., Golovacheva R. S., Seregina L. M., (1984), *Int. J. System. Bacteriol.*, 34, 498-499.
4. Loginova L. G., Bogdanova T. I., (1977), *Mikrobiologiya*, 46, 342-345.
5. Shadrina I. A., Moshkovtseva A. V., Kostrikin N. A., Loginova L. G., Bogdanova T. I., (1982), *Mikrobiologia*, 51, 611-615.
6. Pires A. L., Albuquerque L., Tiago I., Nobre M. F., Empadinhas N., Veríssimo A., Da Costa M. S., (2005), *FEMS Microbiol. Lett.*, 245, 39-45.
7. Nobre M. F., Trüper H. G., Da Costa M. S., (1996), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 604-606.
8. Sharp R. J., Williams R. A. D., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2049-2053.
9. Tenreiro S., Nobre M. F., Da Costa M. S., (1995), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 633-639.
10. Chung A. P., Rainey F., Nobre M. F., Burghardt J., Da Costa M. S., (1997), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 1225-1230.
11. Sinkiewicz I., Synowiecki J., (2008), *Biotechnologia*, 1(80), 168-176.
12. Bradford M. M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
13. Constantino H. R., Brown S. H., Kely R. M., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 3654-3660.
14. Sinkiewicz I., (2008), *Użyteczność niektórych enzymów bakterii *Thermus ruber* w przetwórstwie sacharydów żywności*, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
15. Huggett A. S. C., Nixon D. A., (1955), *Biochem. J.*, 66, 12-19.
16. Sonnleitner B., Cometta S., Fiechter A., (1981), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 75-82.
17. James J. A., Lee B. H., (1997), *J. Food Biochem.*, 21, 1-52.
18. Rolfsmeier M., Blum P., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 482-485.
19. Vieille C., Zeikus G. J., (2001), *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, 65(1), 1-43.
20. Ezeji T. C., Bahl H., (2006), *J. Biotechnol.*, 125, 27-38.
21. Giannesi G. C., Polizei M. T., Terenzi H. F., Jorge J. A., (2006), *Process Biochem.*, 41, 1729-1735.
22. Crabb W. D., Shetty J. K., (1999), *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 252-256.
23. Grzybowska B., Szweđa P., Synowiecki J., (2004), *Mol. Biotechnol.*, 26, 101-109.
24. Zdziebło A., Synowiecki J., (2002), *Food Chem.*, 79, 485-491.
25. Wimmer B., Lottspeich F., Ritter J., Bronnenmeier K., (1997), *Biochem. J.*, 328, 581-586.
26. Plant A. R., Parratt S., Daniel R. M., Morgan H. W., (1988), *Biochem. J.*, 255, 865-868.
27. Zdziebło A., (2005), *Bakteria *Thermus thermophilus* HB8 jako źródło enzymów użytecznych w przetwórstwie sacharydów*, rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska, Gdańsk.

