

KÜLÖNBÖZŐ *ASPERGILLUS* FAJOK ÁLTAL TERMELT β -GLÜKOZIDÁZOK FERMENTÁCIÓJA ÉS JELLEMZÉSE

JÄGER SZILVIA¹, BRUMBAUER ANIKÓ², FEHÉR ERIKA¹, RÉCZEY KATI², KISS LÁSZLÓ¹

¹Biokémiai Tanszék, TTK, Debreceni Egyetem, Debrecen, Egyetem tér 1., 4010

²Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék, Budapest, Szt Gellért tér 4., 1111

PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF β -GLUCOSIDASES FROM DIFFERENT *ASPERGILLUS* STRAINS

β -D-Glucosidase enzymes (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) from different *Aspergillus* strains (*A. phoenicis*, *A. niger* and *A. carbonarius*) were examined with respect to the enzyme production of the different strains using different carbon sources and to the effect of the pH and temperature on the enzyme activity and stability. An efficient and rapid purification procedure was used for purifying the enzymes. Kinetic experiments were carried out using *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NPG) and cellobiose as substrates. Two different fermentation methods were employed in which the carbon source was glucose or wheat bran. *A. carbonarius* proved to be the less effective strain in β -glucosidase production. *A. phoenicis* produced the highest amount of β -glucosidase on glucose as carbon source however on wheat bran carbon source *A. niger* was the best enzyme producer. Each *Aspergillus* strain produced one single acidic β -glucosidase with pI values in the range of pH 3.52-4.2. There was no significant difference considering the effect of the pH and temperature on the activity and stability among the enzymes from different origins. The examined enzymes have only β -glucosidase activity. The kinetic parameters showed that all enzymes hydrolysed *p*NPG with higher efficiency than cellobiose. It proves that hydrophobic interaction plays an important role in substrate binding. The kinetic parameters demonstrated that there was no significant difference among the enzymes from different origins in hydrolysing *p*NPG and cellobiose as the substrates.

BEVEZETÉS

A β -glükózidázok alkil- és aril- β -glükózidok, diglükózidok és oligoglükózidok hidrolízisét katalizálják. Az enzimek egy igen fontos csoportját alkotják, hiszen széles körben használják őket különböző biotechnológiai folyamatokban. Ilyen iparágak a biomassza lebontás [1], bioetanol előállítás cellulóztartalmú mezőgazdasági hulladékokból [2], aromaanyagok előállítása az élelmiszeriparban [3], ill. β -glükózidok szintézise [4].

A β -glükózidázoknak nagyon fontos szerepük van a cellulóz hidrolízisében. A cellulóz lebontását glükózzá egy celluláz enzimkomplex végzi. Ennek fő alkotói az endo-1,4- β -D-glükánáz, exo-1,4- β -D-glükánáz és a β -1,4-glükózidáz. A β -glükózidázok hidrolizálják a köztitermék cellobiózt, két molekula glükóz felszabadításával, megakadályozva a cellobióz felhalmozódását, ami más enzimekre gátló hatással van a celluláz enzimkomplexben.

Munkánk során különböző *Aspergillus* fajok (*A. phoenicis*, *A. niger* és *A. carbonarius*) eznimtermelését és az általuk termelt β -glükózidáz enzimeket vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. Az enzimek termelésére két különböző fermentációs módszert alkalmaztunk. A termelt enzimek tisztítására egy gyors és hatékony tisztítási módszert dolgoztunk ki. Összehasonlítottuk a különböző forrásból származó enzimek kinetikai tulajdonságait, *p*-

nitrofenil- β -D-glükopiranozid és cellobióz szubsztrátokat használva. Megállapítottuk az enzimek izoelektromos pontját, vizsgáltuk a pH és a hőmérséklet hatását az enzimműködésre és stabilitásra [5, 6, 7].

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Törzsek: Az *A. niger* BKM F-1305 és *A. phoenicis* QM 329 törzsek a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékének Törzsgyűjteményéből valók. Az *A. carbonarius* KLU-93 törzset a Debreceni Egyetem, TTK, Mikrobiológiai Tanszéke bocsátotta rendelkezésünkre.

Táptalajok, fermentációk; Két különböző táptalajt használtunk a gombák tenyésztéséhez.

Folyékony táptalaj: Összetétel, (g/l): karbamid, 0.3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4; KH_2PO_4 , 2; CaCl_2 , 0.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.3; peptone, 0.75; élesztő extrakt, 0.25; glükóz szénforrás, 10; nyomelemek 1 % törzsoldatból: 0.5 ml/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.16 ml/l MnSO_4 , 0.14 ml/l ZnSO_4 és 0.2 ml/l CoCl_2 (Mandels & Weber 1969). A táptalaj kezdeti pH-ja 5.8-6.0. A táptalajt 2 ml spóraszuszpenzióval oltottuk be ($5 \cdot 10^6$ spóra/ml). A lombikokat rázógéppen 30 °C-n inkubáltuk (350 r.p.m.) 9 napig.

Szilárd táptalaj: 20 g búzakorpa (kereskedelmi forgalomban kapható) / 100 ml desztillált víz. A táptalajt 2 ml spóraszuszpenzióval oltottuk be ($5 \cdot 10^6$ spóra/ml). A lombikokat 27 °C-n 10 napig inkubáltuk. Extrakció: a táptalajhoz 100 ml desztillált vizet adtunk, 3 órán át ráztuk (170 r.p.m., 30 °C) majd szűrtük.

Enzimaktivitás mérések: β -glükozidáz aktivitás: 1 ml reakcióelegy tartalmazott 100 μl 5 mM p-nitrofenil β -D-glükopiranozid (pNPG) oldatot és megfelelő mennyiségű enzimoldatot 0.02 M Na-acetát pufferben, pH 4.0. A reakció 50 °C-n 10 percig folyt, majd 2 ml 0.2 M Na-borát puffer hozzáadásával állítottuk le (pH 10.0). A felszabadult p-nitrofenol mennyiségét 400 nm-n mértük. Egy U az az enzim mennyiség ami 1 μmol p-nitrofenolt szabadít fel 1 perc alatt a fenti reakciókörülmények között.

A β -glükozidáz aktivitás méréséhez cellobióz szubsztrátot is alkalmaztunk. A 0.5 ml reakcióelegy tartalmazta a megfelelő mennyiségű cellobiózt és enzimet, a reakció 50 °C-n 10 percig folyt. A felszabadított D-glükóz mennyiségét a D-glükóz-oxidáz – peroxidáz módszerrel határoztuk meg.

Enzimtisztítás: A leszűrt, nyers fermentlevet a következő módszerrel tisztítottuk:

Hidrofób kromatográfia Phenyl-Sepharose CL-4B oszlopon (20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -t tartalmazó 0.02 M Na-acetát pufferrel, pH 5.0, ekvilibrálni). Az enzimet 0.02 M Na-acetát, pH 5.0, pufferrel eluáltuk. Gélkromatográfia: Sephacryl S-300 HR töltetű oszlopon (0.2 M NaCl-t tartalmazó 0.02 M Na-acetát pufferrel ekvilibrálni). Kromatofókuszálás: PBE 94 töltetű oszlopon (0.025 M hisztidin-HCl pufferrel, pH 6.2, ekvilibrálni). A pH gradienst 8 x hígított Polybuffer 74-l alakítottuk ki, pH 3.5.

Kinetikai vizsgálatok: A kinetikai vizsgálatokhoz enzimaktivitás méréseket végeztünk 7 különböző szubsztrát koncentrációnál (pNPG esetén 0.25-4.0 mM szubsztrát koncentráció; cellobióz esetén 1.5–15 mM szubsztrát koncentráció), amelyek a 0.5 K_M és 5.0 K_M tartományba estek. Ábrázoltuk a reakciósebességet a szubsztrát koncentráció függvényében. A K_M és $V_{\max}$ értékeit a Grafit program segítségével határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

Különböző *Aspergillus* fajok β -glükozidáz termelése

Folyékony táptalaj: Az enzimtermelés a maximumot a 9. napon érte el. Az *A. phoenicis* bizonyult a legjobb enzimtermelőnek, a legnagyobb enzimaktivitás, hozam és produktivitás értékekkel, míg az *A. niger* érte el a legmagasabb specifikus aktivitást. Az *A. niger* és *A.*

carbonarius által elért enzimaktivitás és produktivitás értékek 60, illetve 37 %-ai az *A. phoenicis* enzintermelésének (1. táblázat).

Szilárd táptalaj: A szilárd táptalaj esetén figyelembe kell venni, hogy a kapott aktivitás (U/ml) és specifikus aktivitás (U/mg fehérje) értékek az extrakció körülményeitől függnének, azaz az extrakció idejétől, a kirázáshoz használt desztillált víz mennyiségétől, stb. Extrakció után 100 ml nyers fermentlevet kaptunk. A U/ml-ben kifejezett aktivitás értékek a fermentlére vonatkoznak, extrakció után. Az *A. niger* bizonyult a legjobb enzintermelőnek a szilárd táptalajon. Az *A. carbonarius* aktivitás, specifikus aktivitás, hozam és produktivitás értékei 65 %-ai voltak az *A. niger* hasonló értékeinek. A fermentlé fehérje tartalma 14-20-szorosa a folyékony táptalaj fehérje tartalmának. Ennek egyik oka a búzakorpa szénforrás nagyobb fehérje tartalma, másrészt ezen a szénforráson a gombák más, indukálható enzimekből nagyobb mennyiséget termelnek, pl. β -D-galaktozidáz, β -D-xilozidáz, α -L-arabinozidáz. A különböző táptalajokon elért β -glükózidáz termelés a hozam segítségével hasonlítható össze. Az *A. phoenicis* hozama a folyékony táptalajon 6.4-szerese volt a szilárd táptalajon elért hozamának. Az *A. niger* és *A. carbonarius* esetén a folyékony táptalaj hozama 3.2, illetve 3-szor volt nagyobb mint a búzakorpás táptalajé (1. Táblázat).

1. Táblázat Különböző *Aspergillus* fajok β -glükózidáz termelése glükóz és búzakorpa szénforráson

	Aktivitás (U/ml)	Feh. tart. (mg/ml)	Specifikus aktivitás (U/mgfehérje)	Hozam (U/g szénforrás)	Produk- tivitás (U/l/h)
<i>A. phoenicis</i> ^a	1.29 ±0.12	0.273 ±0.057	4.72 ±1.07	129	5.97
<i>A. niger</i> ^a	0.776 ±0.07	0.144 ±0.017	5.38 ±0.12	77.6	3.60
<i>A. carbonarius</i> ^a	0.485 ±0.035	0.214 ±0.051	2.26 ±0.57	48.5	2.24
<i>A. phoenicis</i> ^b	4.02 ±0.38	3.84 ±0.12	1.04 ±0.10	20.1	16.75
<i>A. niger</i> ^b	4.87 ±1.57	2.90 ±0.009	1.68 ±0.54	24.35	20.3
<i>A. carbonarius</i> ^b	3.17 ±0.67	3.53 ±0.086	0.89 ±0.002	15.87	13.23

^a 1 % (w/v) glükóz szénforrás

^b 20 % (w/v) búzakorpa szénforrás

A különböző forrásból származó β -glükózidázok összehasonlítása

Kinetikai vizsgálatok. A kinetikai mérések eredményeit a 2. Táblázat foglalja össze. A kinetikai paraméterek azt mutatják, hogy az enzimek affinitása nagyobb a pNPG, mint a cellobióz felé. A különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidázok K_m értékei hasonlóak voltak pNPG-t használva szubsztrátként. Szintén nem volt különbség a kétféle

táptalajon termelt enzimek kinetikai paraméterei között. Az *A. carbonarius* $V_{\max}$ értéke volt a legkisebb, így a legkisebb $V_{\max}/K_m$ értéke is. A legnagyobb $V_{\max}$ és $V_{\max}/K_m$ értéket az *A. niger* érte el. Cellobiózt használva szubsztrátként a K_m értékek 3.4-6.2-szer nagyobbak voltak mint a *pNPG* esetén. Az adatok nem mutatnak eltérést a különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidázok és a különböző táptalajon termelt β -glükózidázok között. A $V_{\max}$ adatok cellobióz szubsztrát esetén 1.5-szeresei a *pNPG*-nél mért $V_{\max}$ adatoknak. A legnagyobb $V_{\max}$ értéket az *A. niger* érte el, mind folyékony, mind szilárd táptalajon. A $V_{\max}/K_m$ adatok cellobióz esetén 24-65 %-ai a $V_{\max}/K_m$ -nek *pNPG* szubsztrát esetén. A cellobiózt az *A. carbonarius* által termelt enzim hasítja a legkisebb hatékonysággal.

2. Táblázat A különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidázok kinetikai paraméterei

Faj	<i>pNPG</i>			cellobióz		
	K_m (mM)	$V_{\max}$ (U/mg)	$V_{\max}/K_m$	K_m (mM)	$V_{\max}$ (U/mg)	$V_{\max}/K_m$
<i>A. phoenicis</i> ^a	0.65 ±0.055	14.2 ±0.42	21.85 ±1.96	1.92 ±0.12	27.3 ±0.65	14.22 ±0.95
<i>A. niger</i> ^a	0.74 ±0.032	25.8 ±0.65	34.86 ±1.74	2.82 ±0.47	38.84 ±1.50	13.77 ±2.35
<i>A. carbonarius</i> ^a	0.63 ±0.058	10.05 ±0.13	15.95 ±1.48	3.71 ±0.41	15.35 ±0.23	4.13 ±0.46
<i>A. phoenicis</i> ^b	0.58 ±0.034	16.05 ±0.097	27.67 ±1.63	2.0 ±0.13	24.24 ±0.74	12.12 ±0.87
<i>A. niger</i> ^b	0.48 ±0.025	22.32 ±0.25	46.5 ±2.47	2.97 ±0.22	35.68 ±0.96	12.01 ±0.95
<i>A. carbonarius</i> ^b	0.67 ±0.008	13.46 ±0.083	20.09 ±0.27	2.99 ±0.092	14.6 ±0.32	4.88 ±0.18

^a1 % (w/v) glükóz szénforrás

^b20 % (w/v) búzakorpa szénforrás

Izoelektromos pont. Az izoelektromos pontot kromatofókuszálással határoztuk meg. Mindegyik *Aspergillus* faj egy savas karakterű β -glükózidáz enzimet termelt, melyek izoelektromos pontjai a pH 3.53-4.2 tartományba estek (*A. phoenicis*: 3.53, *A. niger*: 3.72, *A. carbonarius*: 4.2).

A hőmérséklet hatása az enzim aktivitásra és stabilitásra. Az enzimek működésének optimuma 60 °C volt minden esetben. 70 °C-n az enzimaktivitás jelentős csökkenést mutatott a 60 °C-n mért értékhez képest, míg 50 °C-n csak kis mértékben csökkent az aktivitás. 2 óra inkubálás után 20 és 80 °C között, az enzimek stabilak maradtak 50 °C-ig, 70 °C-n azonban már inaktíválódtak.

A pH hatása az enzimaktivitásra és stabilitásra. A vizsgált β -glükózidázok pH optimuma pH 4.5-5.0 volt szubsztrátként *pNPG*-t használva (*A. phoenicis*, *A. carbonarius* pH 5.0, *A. niger* pH 4.5-5.0). Cellobióz szubsztráttal a pH optimum 4.0-4.5 volt. A pH stabilitás vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzimek 24 óra inkubálás után (pH 2.5 és 8.0 között) megőrizték stabilitásukat pH 4.0 fölött.

Köszönetnyilvánítás:A szerzők köszönetüket fejezik ki a következő szervezeteknek anyagi támogatásukért: Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA F-026047) (R. K. és B. A.), Varga József Alapítvány (B. A.), Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság (OMFB EV-98-D8-153) (R. K.), Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA T 023759) (K. L.), Oktatási Minisztérium (FKFP 0329/1997) (J. Sz. és K. L.), Széchenyi Professzori Ösztöndíj (K. L.). A szerzők köszönetüket fejezik ki Dr. Lenkey Bélának az *A. carbonarius* törzsért, Dr. Pusztahelyi Tündének és Dr. Forgács Katalinnak a mikrobiológiai munkában nyújtott útmutatásaikért és Somosi Ritának a mindennapi munkában nyújtott segítségéért.

IRODALOM

1. Coughlan, M. P. 1985 The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Gen. Reviews* **3**, 39-109.
2. Bothast, R. J. & Saha, B. C. 1997 Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Adv. Appl. Microbiol.*, **44**, 261-286.
3. Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, I. Z., Günata, Z. & Barre, P. 1998 Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environment. Microbiol.* **64**, 3607-3614.
4. Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Griffiths, R. C., Jones, M. G., Watson, A. A. & Nash, R. J. 1997 Enzymatic synthesis of the glycosides of calystegines B1 and B2 and their glycoside inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **304(2)**, 173-178.
5. Brumbauer A., Fuleki I., Réczey K. & Kemeny S. 2000 β -Glucosidase production by *Aspergillus niger*: optimisation the composition of medium. *J. Biotech.* (In press.)
6. Réczey K., Brumbauer A., Bollok M., Szengyel Zs. & Zacchi G. 1998 Use of hemicellulose hydrolysate for β -glucosidase fermentation. *Appl. Biochem. Biotech.* **70-72**, 225-235.
7. Kiss, T. & Kiss, L. 2000 Purification and characterization of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius* W. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16(5)**, 465-470.