

Jiří Stárka

Dynamika hydrolysy škrobu amylasami *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*

(Oddělení obecné mikrobiologie biologické fakulty Karlovy university, Viničná 5, Praha II.)

Aktivité enzymů a jejich dynamice v závislosti na stáří produkujícího mikroba a zároveň za měnících se vnějších podmínek bylo věnováno převapivě málo pozornosti. Většina pracovníků se zajímá o vlastnosti určitých enzymových preparátů, získaných ze „zralé“ kultury a obvykle nepřihlíží k okolnostem, za jakých studované enzymy resp. jejich systémy vznikly. Takovýto způsob studia přinesl sice mnoho cenných informací o dílčích enzymatických reakcích, o řetězech a cyklech takovýchto reakcí, nemohl však podstatně přispět k objasnění biologických zákonitostí, platných pro růst a vývoj mikroorganismů.

Ojedinelé úspěšné experimenty na př. u butylogenních klostridií byly dovršeny teprve nedávno Ierusalimským (1951), který ukázal, že při růstu a vývoji mikroorganismů probíhají charakteristické biochemické změny současně se změnami morfologickými a že tyto změny jsou zákonité.

Při studiu amylolytických enzymových systémů aspergilů jsme toto hledisko pokládali za výchozí, ať už byly sledovány praktické cíle pro přípravu amylolytických plísňových preparátů, vhodných pro hydrolysu ovocného škrobu v pektinových roztocích (Stárka 1952, Stárka 1954b), nebo cíle obecněji zaměřené, sledující význam kvality prostředí na dynamiku produkce enzymů v průběhu růstu za laboratorních podmínek a vztah mezi enzymy vázanými na buňku a jejich vylučováním do prostředí (Stárka 1953). Nápadným zjevem při těchto pokusech byla dynamika exkrece enzymů během růstu kultury, zřetelně závislá na jejím stáří a povaze prostředí a nikoli pouze na váhovém množství mycelia. Dalším zajímavým zjevem byla odlišnost v průběhu hydrolysy u *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*.

Odlišnost hydrolysy škrobu amylasami z *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae* pozorovala také Feniksova (1953) a vysvětlovala tento zjev vysokou aktivitou maltasy u *Aspergillus niger*, mající za důsledek nahromadění glukosy, zatím co u *Aspergillus oryzae* je maltasa slabá a hromadí se hlavně maltosa a další oligosacharidy — glukosidy. Srovnávali jsme (Stárka 1954a) diastatické plísňové preparáty se sladovými tak, že po dosažení achromatického bodu v reakci s jodem jsme hydrolysat škrobu chromatografovali. Plísňové otruby z *Aspergillus niger* dávají převážně glukosu, avšak málo maltosy a vyšších oligosacharidů. U *Aspergillus oryzae* jsou odlišné poměry produktů hydrolysy. Kromě glukosy je tu velké množství maltosy, maltotriosy, maltotetraosy a dalších vyšších oligosacharidů, o nichž lze podle pohyblivosti

na papíře předpokládat, že mají 5,6 a více glukosových jednotek. Preparáty ze sladu se do určité míry podobají preparátům u *Aspergillus oryzae*.

Odlišné poměry produktů hydrolysy daly tušit, že i průběh hydrolysy u obou aspergilů bude odehlný. Provedli jsme proto kvantitativní stanovení chromatograficky oddělených cukrů v časových intervalech v průběhu hydrolysy.

Nejnápadnějším rozdílem byla vydatná tvorba glukosy u *Asp. niger* a silný pokles ostatních sacharidů zvláště v pozdějších fázích hydrolysy. U *Aspergillus oryzae* byl poměr mezi produkty hydrolysy poměrně vyrovnaný a glukosy přibývá jen zvolna. Význačným zjevem bylo tu stále a poměrně značné nahromadování maltosy.

Není tedy štěpení škrobu procesem jednoduchým, srovnatelným s prostou hydrolysou. Enzymatickou hydrolysou je převedeno asi 80 % škrobu na zkvasitelné cukry, zbytek tvoří vyšší oligosacharidy, dextriny. Hlavní úlohu při tomto pochodu mají amylasy, jimž je přisuzována čistě hydrolytická činnost (Sumner a Myrbäck, 1950). Štěpí výhradně α -1,4 glykosidické (maltosové) vazby a tak vznikají jednak cukry redukující, především maltosa a glukosa, a neredukující nezkvasitelné zbytky polysacharidových molekul. Enzymatická hydrolysa škrobu je však proces, který je komplikován ještě dalšími enzymy. Především je třeba brát v úvahu účast fosforylas, které vytvářejí redukující fosforečné estery cukrů nebo volné redukující cukry. Právě amylasy se od těchto enzymů liší především tím, že nejsou prakticky ovlivňovány přítomností fosfátů a že nedovedou provádět syntetické pochody. Syntetická činnost v hrubých amylolytických preparátech (Pigman 1944) byla přičítána proto fosforylasám, neboť ve fosfátových ústojích zmizely z maltosy vyšší nezkvasitelné oligosacharidy. Objasnění tohoto problému však zůstávalo dlouho nevyřešeno, hlavně pro nedostatek vhodných analytických metodik.

Činnost enzymů katalysujících štěpení nebo syntésu oligosacharidů a polysacharidů bylo možno do nedávna sledovat prakticky pouze pomocí více nebo méně hrubých stanovení produktů nebo substrátů na př. jako redukujících látek, ketos a pod. Možnost odděleného stanovení většího počtu složek v reagujících systémech zůstávala prakticky nedostupnou, neboť identifikace jednotlivých štěpných produktů ve směsi a malých kvantech, zvláště v případě oligosacharidů nebyla tehdy běžnými metodami proveditelná. Teprve chromatografie a zvláště chromatografie na papíře obohatila i tento úsek o metodu, která přímo zázračně jednoduchým způsobem otevřela nové a netušené cesty.

Velká pozornost byla věnována především enzymům, provádějícím transglykosidické výměny u oligosacharidů (transglukosidace, transfruktosidace a transgalaktosidace). Kinetika těchto reakcí může být sledována kvantitativně a současně u všech složek v časovém průběhu reakce. Na podkladě výsledků takto získaných lze soudit, že enzymatická hydrolysa oligosacharidů není jednoduchým procesem analogickým hydrolyse chemické, nýbrž že dochází k přenosu monosacharidových zbytků na vhodné akceptory, čímž vznikají nové oligosacharidy, některé i o delším řetězci, z nichž některé zůstanou v malých množstvích zachovány i po dosažení rovnovážných stavů. V souvislosti s těmito studiemi byly vypracovány různé kvalitativní i kvantitativní úpravy chromatografické analýsy včetně odstraňování interferujících látek pomocí měničů iontů. Byly též nalezeny i nové oligosacharidy dosud nepopsané (na př. panosa, kestosa a j.), jejichž izolace a identifikace mohla být

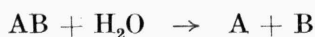
opět uskutečněna chromatograficky. (Gross, Blanchard a Bell 1954, Bacon a Bell 1953, De Whaley 1952, Blanchard a Albon 1950, Pan, Andreasen a Kochalov 1950, French 1951).

Enzymatický rozklad polysacharidů právě tak jako jejich syntéza jsou studovány především s hlediska objasnění dynamiky celého procesu a mechanismu účinku izolovaných enzymů. V popředí zájmu jsou amylasy z plísňí, bakterií, sladu a slin a jejich působení na škrob nebo glykogen resp. jejich složky nebo štěpné produkty. Amylosa je štěpena sladovou a bakteriální α -amylasou přes oligosacharidy o různě dlouhém řetězci na maltosu a glukosu; amylopektin je těmito enzymy odbouráván za vzniku štěpných produktů s řetězci delšími než 2 nebo 3 glukosylové jednotky (Bird a Hopkins 1954a).

β -amylasa hydrolysuje amylosu za současného napadení všech řetězců — „multichain action“ (Hopkins a Jelinek 1954, Bird a Hopkins 1954b), glykogen ztrácí jejím účinkem asi 45 % vnějších řetězců za vzniku maltosy jako jediného konečného produktu. (Bell a Manners 1952). Dextran, glukosový polymér tvořený především α -1,6 glykosidickými vazbami a vytvářený ze sacharosy činností bakterií z rodu *Leuconostoc* a z dextrinů též působením jiných bakterií, je produktem extracelulární dextransacharasy čili dextransukrasy. (Koepsell et al. 1953). Zavedením alternativních akceptorů glukosylových jednotek (na př. maltosy, isomaltosy nebo glukosy) do reagující směsi enzymu a sacharosy je možno vyvolat tvorbu oligosacharidů, vznikajících současně s normálními dextranovými řetězci a získati tak určité informace i o mechanismu polymerisace, interpretované jako transglykosidická reakce, kde donátorem je sacharosa a akceptorem terminální hexosylová jednotka rostoucího řetězce. Vlastního cíle, t. j. dosažení syntézy dextranů o menší molekulové váze, aby jich mohlo být přímo použito jako náhrady krevní plazmy bez částečné hydrolysy, však dosaženo nebylo. Podobným způsobem jako u dextranů dochází i k syntéze levanů, které však na rozdíl od dextranů nejsou konečným produktem metabolismu určitých mikrobů, nýbrž meziproduktem metabolismu sacharosy na př. u azotobaktera (Hestrin a Goldblum 1953). Dosud značně nejasná je syntéza celulosy. Bakteriální celulosa u *Acetobacter xylinum* nevzniká, jak se věřilo, polymerisací fosforylované glukosy, i když fosfáty se procesu účastní, snad jako zprostředkovatelé s reakcemi poskytujícími energii (Hestrin 1953). Právě tak komplikované poměry jsou u hemicelulos. U xylanu je studována především hydrolysa enzymovými preparáty z *Chaetomium globosum*, z aktinomycet a jiných půdních mikrobů. Uvolněné oligosacharidy jsou tvořeny především D-xylosou, jejíž jednotky jsou spojeny α -1,4 vazbami. Kromě těchto oligosacharidů objevují se při hydrolyse též arabinosa, galaktosa a glukosa, ovšem v daleko menším množství (Sørensen 1952 a 1953, Whistler a Chen-Chuan Tu 1952).

Za velký úspěch chromatografie je třeba pokládat objasnění transglykosidických reakcí některých sacharidas.

Dosud byl běžně tradován názor, že enzymy, štěpící glykosidické vazby oligosacharidů, mají charakter hydrolas, provádějících všeobecně psanou reakci



Podle druhu štěpené vazby byly rozlišovány

α -glukosidasa (maltasa)

β -glukosidasa (celobiasa)

β -fruktosidasa (invertasa kvasničná)

α -galaktosidasa (melibiasa)

β -galaktosidasa (laktasa)

Když byly tyto reakce podrobeny chromatografické analýze, ukázalo se, že průběh je složitější a že vznikají přechodně nové oligosacharidy i o vyšším počtu příslušných jednotek monosacharidových. Tyto reakce byly připsány enzymům, nazvaným transglykosidasy (TF, TG1, TGa).

Účinkem transfruktosidasy (β -fruktofuranosidasy) jsou přenášeny fruktosylové jednotky ze sacharosy a rafinosy na fruktosylové sloučeniny a vznikají nové oligosacharidy složené z glukosy, fruktosy a galaktosy.

Transfruktosidasu mají plísně, kvasinky i rostliny a převládá názor, že je jediným enzymem hydrolyzujícím sacharosu, t. j. identická s invertasou. Bude tedy třeba korigovat dosud uznávaný rozdíl mezi kvasničnou invertasou (fruktosidasou) a plísňovou (glukosidasou) právě tak jako názor, že inverze sacharosy je záležitost čistě hydrolytického procesu (Pazur 1952, Bealing a Bacon 1953, Bealing 1953).

Obdobný je účinek transglukosidasy (maltasy), přenášející glukosylové jednotky a syntetisující tak isomaltosu, glukosylmaltosu a glukosylisomaltosu (Pazur a French 1951, Monod a Torriani 1948, Pazur a French 1952, Barker a Bourne 1952, Wallenfels a Bernt 1952). Rovněž laktasa kvasinek i bakterií má funkci transgalaktosidasy a při její činnosti vznikají nejméně čtyři oligosacharidy, složené z galaktosy a glukosy (Aronson 1952).

Zatím není definitivně objasněno, existují-li invertasa, maltasa, laktasa atd. jako čistě hydrolytické enzymy vedle transglykosidas nebo je-li transglykosidická aktivita vlastností jich samotných.

Lze tedy předpokládat, že při enzymatické hydrolyse škrobu bude třeba počítat kromě amylas rovněž s transglykosidasami. Proto bylo zvoleno za cíl této práce jednak prostudování významu stáří mikroorganismu a kultivačního media na aktivitu amylas, jednak objasnění účasti transglykosidas při hydrolyse škrobu.

Materiál a metodika

S kmeny *Aspergillus oryzae* a *Aspergillus niger*, použitými v těchto pokusech, bylo pracováno již v předchozích pracích (Stárka 1953 a 1954a). Tam jsou též uvedena data o způsobu kultivace, odběru vzorků a testování dextrinogenní aktivity.

Chromatografická analýsa. Bylo používáno výhradně sestupné techniky na papíře Whatman č. 1 nebo č. 4. Při opakování pokusů byla vyzkoušena řada různých soustav rozpouštědel, z nichž se nejlépe osvědčily: N-butanol-pyridin-voda (12 : 8 : 7), isopropanol 75 %, octová kyselina-ledová (9 : 1), N-propanol-ethylacetát-voda (6 : 1 : 3), N-butanol-octová kyselina-voda (4 : 1 : 5).

Vyvíjení trvalo u směsi butanol-pyridin-voda na papíře Whatman č. 4 16—18 hod., na Whatman č. 1 až 48 hod. Za tuto dobu čelo přeběhlo dolní okraj chromatogramu a rozpouštědlo

přetékalo. V některých případech po doběhnutí čela byl chromatogram vyjmut, usušen a znovu vyvíjen. Toto dvojnásobné vyvíjení se velmi dobře osvědčilo.

Po ukončení vyvíjení byl papír za normální teploty usušen v digestoři a podle potřeby dosušen v sušárně při 100°. K detekci bylo použito amoniakálního roztoku AgNO_3 (0,5 g AgNO_3 , 9,5 ml H_2O , 0,6 ml čpavku), kyselého anilinfталátu (anilin 0,93 g, kyselina ftalová 1,66 g, N-butanol nasycený vodou 100 ml, Partridge 1949) a benzidin v trichloroctové kyselině (benzidin 0,5 g, octová kyselina 10 ml, 40% trichloroctová kyselina 10 ml, ethanol 80 ml, Bacon a Edelman 1951).

Detekční reagens bylo rozprašováno proudem stlačeného dusíku z bomby. Při pokusech s cukry obsahujícími fruktosu bylo užito k detekci též floroglucinolového (0,1% floroglucinol v 0,1 N HCl), močovinnového (urea 5 g, 2 N HCl 20 ml, 95% alkohol 80 ml, Montreuil. a Scriban 1952, a naftolového reagens (α -naftol 0,1 g, ethanol 10 ml, H_3PO_4 konc. 2 ml) Po provedeném postřiku byly chromatogramy opět uloženy do sušárny na 5 až 10 min. nebo i déle při 100°.

Kvantitativní stanovení byla prováděna anthronovým reagens (Blažka 1949, 1953, Koehler 1952) po eluci paralelních nedetegovaných chromatogramů (Dimler a sp. 1952) a odečítána na fotokolorimetru.

Výsledky

I. Adaptivita amylolytických systémů.

Aspergillus niger a *Aspergillus oryzae* byly paralelně naočkovány za statických podmínek na Czapek-Doxovu půdu, obsahující jako zdroj uhlíku v prvním případě škrob (2 %), v druhém pepton prostý cukrů (2% Bacto-pepton). První vzorky byly odebrány třetí den kultivace, kdy začínaly oba kmeny sporulovat a obsah veškerých cukrů v mediu byl značně snížen, druhé desátý den, kdy již mycelium začínalo zřetelně autolysovat a medium neobsahovalo ani stopy cukrů. Odebraný vzorek metabolické tekutiny po filtraci byl přidán ke škrobovému mazu s acátátovým ústojem o pH = 4,6 a inkubován při 28°. Vzorky enzymatického hydrolyzátu byly odebírány za 10 min., 30 min., 120 min. a 300 min. Jako antiseptika bylo použito toluenu. Ještě lepších výsledků bylo dosaženo s přidáním natriumpropionátu (0,5 ml 9% roztoku na 25 ml vzorku). Po inaktivaci varem 2 min. byly vzorky nanášeny na chromatografický papír. U každého vzorku byla zároveň stanovena dextrinogenní aktivita amylas Wohlgemuthovou zkouškou. Barevná reakce byla orientačně hodnocena v pořadí: purpurová — červená — oranžová — achromatická. Výsledky jsou seřazeny v tab. 1. a 2. (AO = *A. oryzae*, AN = *A. niger*, Š = škrobová půda, P = peptonová půda.)

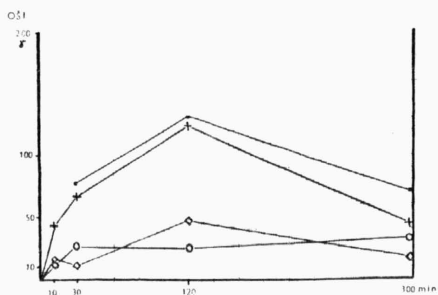
Tabulka 1.

3. den	10	30	120	300 min.
AOŠ	purp.	purp.	červ.	červ.
AOP	purp.	purp.	červ.	červ.
ANŠ	purp.	červ.	achrom.	achrom.
ANP	purp.	červ.	achrom.	achrom.

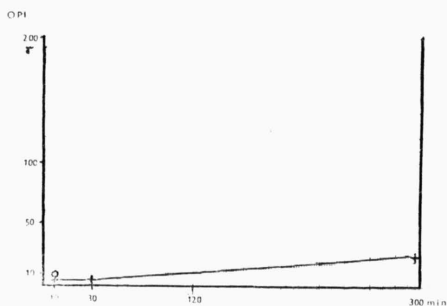
Tabulka 2.

10. den	10	30	120	300 min.
AOŠ	achrom.	achrom.	achrom.	achrom.
AOP	purp.	červ.	červ.	oranž.
ANŠ	achrom.	achrom.	achrom.	achrom.
ANP	červ.	červ.	oranž.	achrom.

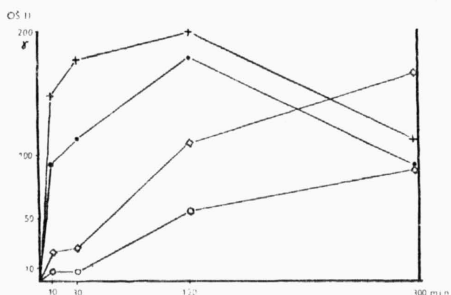
Po odstřížení a detekci vodících pásků (standard glukosy a maltosy a vzorek hydrolysátu) byla z paralelních nepostříkaných pásků vystřížena místa s předpokládanými skvrnami a po eluci destilovanou vodou stanoven obsah cukrů. Výsledky jsou zachyceny v grafech 1 až 8.



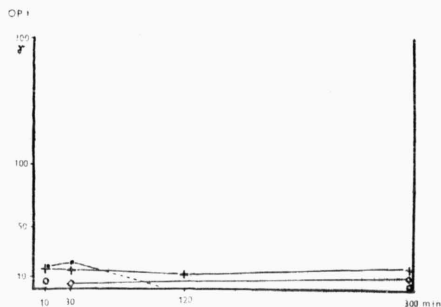
Graf 1. Účinek 10 dnů starého enzymového preparátu *A. oryzae* na škrob. Hodnoty zjištěny kvantitativní papírovou chromatografií, ○ = glukosa (G), □ = maltosa (M), + = pravděpodobně trisacharid (X), ● = pravděpodobně tetrasacharid (Y).



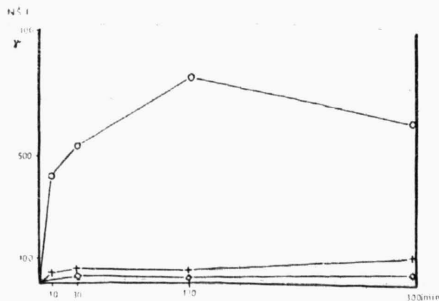
Graf 2. Třídenní preparát *A. oryzae* z peptonové půdy na škrobu.



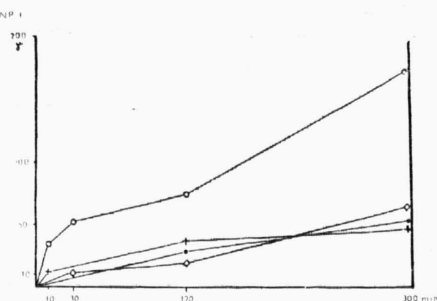
Graf 3. Desetidenní preparát *A. oryzae* ze škrobové půdy na škrobu.



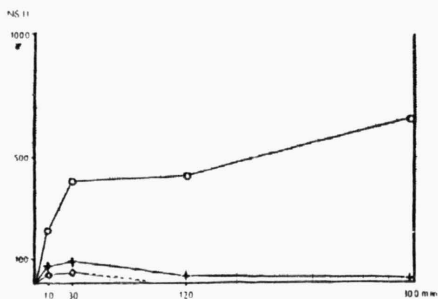
Graf 4. Desetidenní preparát *A. oryzae* z peptonové půdy na škrobu.



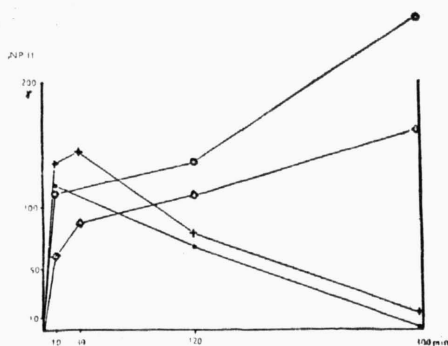
Graf 5. Třídenní preparát *A. niger* ze škrobové půdy na škrobu.



Graf 6. Třídenní preparát *A. niger* z peptonové půdy na škrobu.



Graf 7. Desetidenní preparát *A. niger* ze škrobové půdy na škrobu.



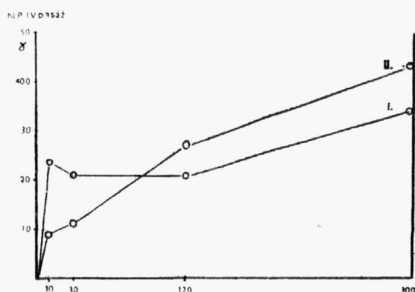
Graf 8. Desetidenní preparát *A. niger* z peptonové půdy na škrobu.

Enzymatický preparát *Aspergillus oryzae* na škrobu po třídenní kultivaci uvolňuje cukry ze škrobu v kvantitativním pořadí Y—X—M—G (2 hod.) a Y—G—X—M (5 hod.). Charakteristická je převaha dextrinů nad glukosou a maltosou. Analogický preparát po deseti dnech je jednak podstatně aktivnější, jednak jeho aktivita je charakterisována jiným pořadím nahromaděných cukrů: X—Y—M—G (2 hod.) a M—X—Y—G (5 hod.). Naproti tomu *Aspergillus niger* na téže půdě za tři dny vytváří velmi aktivní enzymatický systém, charakterisovaný vysoce převažující glukosou, jejíž nahromadění dosahuje maxima za 120 min. činnosti preparátu a je následováno úbytkem, dále stopami maltosy a velmi nízkými hodnotami ostatních oligosacharidů. Desetidenní kultura má nižší aktivitu, pořadí cukrů však není změněno. Glukosa se v průběhu reakce stále zvolna hromadí. Pokles, charakteristický pro první odběr, nebyl pozorován.

Obraz aktivity enzymů u *Aspergillus oryzae* kultivovaného na peptonové vodě je zcela jiný. V obou odběrech jsou přítomny enzymy odbourávající škrob (reakce s jodem je charakteristická pro t. zv. erythrodextriny), jejich aktivita je však velmi nízká. Glukosa, maltosa a oligosacharidy s nejbližší nižšími hodnotami R_f jsou uvolňovány v malých množstvích přibližně stejně velkých. *Aspergillus niger* na peptonové půdě si udržuje větší část aktivity

amylolytických enzymů. Jejich dynamika se podobá v případě glukosy preparátu ze škrobové půdy z druhého odběru (10. den). Souběžně s glukosou však přibývá i maltosy. Množství ostatních oligosacharidů (X a Y) v prvním odběru jde souběžně s maltosou, v druhém odběru po dosažení značného maxima jejich množství rychle klesá a za 5 hodin jsou zjištěny jen ve stopách.

Aby bylo možno určit, do jaké míry jsou stanovené hodnoty aktivity enzymů peptonových půd výrazem adaptace, byly oba kmeny čtyřikrát přepasážovány na peptonové půdě (sporové inkokulum). Čtvrtá pasáž *A. oryzae* uvolňovala pouze stopy maltosy a glukosy i nižších oligosacharidů. Hlavní součástí produktů hydrolysy byly vyšší dextriny, které nebyly kvantitativně určovány. *A. niger* si zachoval svoji schopnost hromadit glukosu a její přírůstek v průběhu hydrolysy, i když je nižší, odpovídá průběhu z první pasáže. Ostatní oligosacharidy (maltosa, X a Y) byly přítomny ve stopách. Na grafu 9 jsou uvedeny hodnoty ze dvou odběrů, t. j. třetí a desátý den kultivace (I. a II.).



Graf 9. Preparát *A. niger* po čtyřnásobném pasážování na peptonové půdě při účinku na škrob. I = preparát odebraný třetí den kultivace, II = preparát z desetidenní kultury.

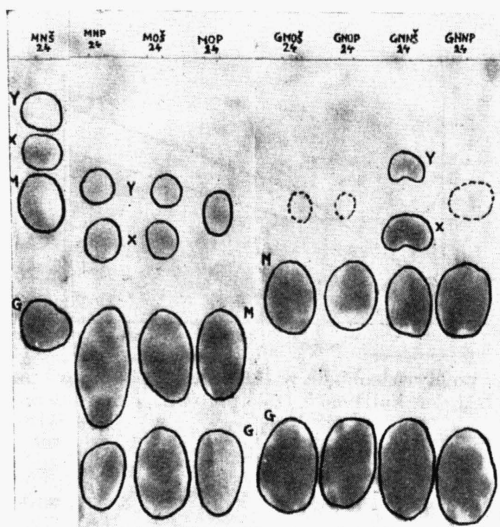
II. Transglykosidická aktivita *A. niger* a *A. oryzae*.

Z pohybů cukrů na papíře při sledování dynamiky hydrolysy škrobu enzymy *A. niger* a *A. oryzae* lze usuzovat na účast nejen typické plísňové α -amylasy, ale i transglukosidických enzymů. Bylo proto přikročeno k jejich experimentálnímu průkazu. Stejným způsobem připravený enzymový preparát (5 ml třídenní kultury prosté mycelia) byl inkubován s glukosou, maltosou a směsí obou cukrů (konečná koncentrace 2% cukru ve vzorku) při 28°, pH bylo udržováno acetátovým ústojem na 4,2, aby odpovídalo hodnotě při sledování amylas. Po čtyřia dvacetihodinovém působení byly vzorky naneseny na papír a chromatografovány. Výsledky jsou patrné na obrázku 1.

Oba kmeny vykazují transglykosidickou aktivitu bez ohledu na povahu specifického substrátu, na němž byly kultivovány. Preparáty z peptonových medií jsou ovšem podstatně slabší. K nejvýznačnější tvorbě vyšších oligosacharidů dochází na maltose. Přidání glukosy k maltose spíše oslabuje transglukosidickou aktivitu. Na čisté glukose k tvorbě vyšších oligosacharidů vůbec nedošlo.

Kromě pokusů s metabolickými tekutinami byla sledována transglykosidická aktivita plísňových otrub obou aspergilů. Byl připraven vodný výluh

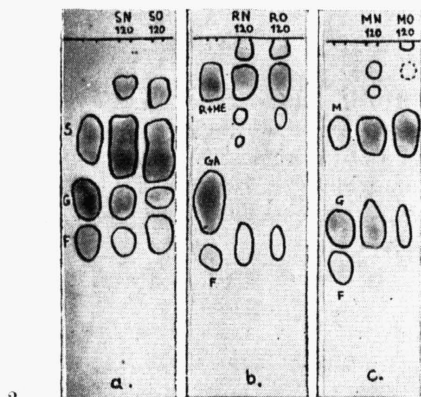
z plísňových otrub (Stárka 1954a) a doplněn roztokem zkoumaného cukru ve fosfátovém ústoji o $\text{pH} = 7,0$ (0,25 ml 0,2 M ústoje na 10 ml vzorku). Po dvouhodinové inkubaci enzymového preparátu *A. niger* a *A. oryzae* na sacharose (obr. 2a) dochází k tvorbě vyšších oligosacharidů především činností transfruktosidasy. Oligosacharid podle pohyblivosti na papíře je asi trisacharid-fruktosid (reaguje s floroglucinolovým reagens při postřiku). Na rafinose (obr. 2b) se opět hlavně uplatňují transfruktosidasy u obou plísní zhruba stejné. Zajímavé je, že transgalaktosidasa uvolňuje jen stopy galaktosy a sacharosy. Na maltose (obr. 2c) se uplatňuje transglukosidasa, která u *A. niger* vytváří zřetelný trisacharid a tetrasacharid, u *A. oryzae* se objevují hlavně vyšší dextriny, zůstávající těsně pod startem, jejichž vznik se děje zřejmě na účet glukosy. Její množství je zde zřetelně nižší než u *A. niger*.



Obr. 1. Transglukosidická aktivita *A. niger* a *A. oryzae*, po 24hod. působení na maltosu. GM = glukosa + maltosa, M = maltosa, NŠ = *A. niger* ze škrobové půdy, NP = *A. niger* z peptonové půdy, OS = *A. oryzae* ze škrobové půdy, OP = *A. oryzae* z peptonové půdy. Whatman č. 1, butanol-pyridin-voda, vyvíjeno 40 hod., postřik benzidin-trichloroctová kyselina. Téhož postupu bylo užito i při přípravě chromatogramů na obr. 2 a 3.

Aby byla zachycena dynamika transglykosidací, byly chromatografovány odběry z reagující směsi cukrů a enzymů v časových intervalech 10, 30 a 60 min. Na obr. 3a je zachycena činnost *A. niger* na maltose, na obr. 3b *A. oryzae* na rafinose. Oba chromatogramy, vybrané jako příklad (zkoumána byla aktivita obou plísní na sacharose, rafinose a maltose) dokumentují dobře transglykosidickou aktivitu obou preparátů.

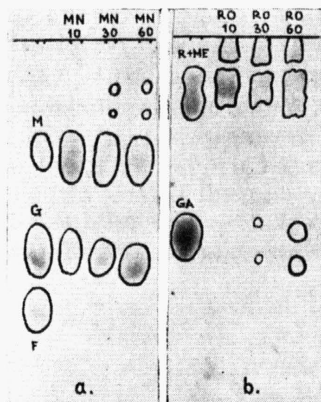
Protože pro hydrolysu škrobu přichází v úvahu prakticky pouze činnost transglukosidas, byla jejich aktivita u obou plísní prostudována též kvantitativním stanovením komponent reagující směsi. Byl zvolen stejný postup jako při předchozích pokusech, t. j. kvantitativní papírová chromatografie.



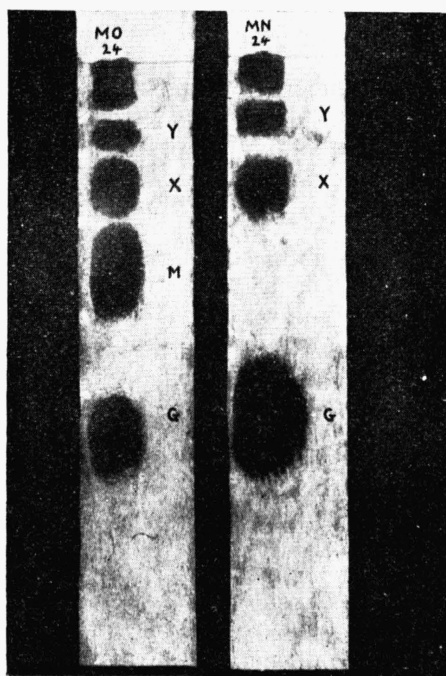
2.

Obr. 2. Transglykosidická aktivita *A. niger* a *A. oryzae*. a) výsledek působení na sacharosu za 120 min. — standard sacharosa, glukosa a fruktosa; b) substrát rafinosa, standard rafinosa, melibiosa (nerozděleny), galaktosa a fruktosa; c) substrát maltosa, standard maltosa, glukosa a fruktosa.

Obr. 3. a) Působení *A. niger* na maltosu za 10,30 a 10 min. Stand. maltosa, glukosa a fruktosa. b) *A. oryzae* na rafinose, standard rafinosa + melibiosa, galaktosa.



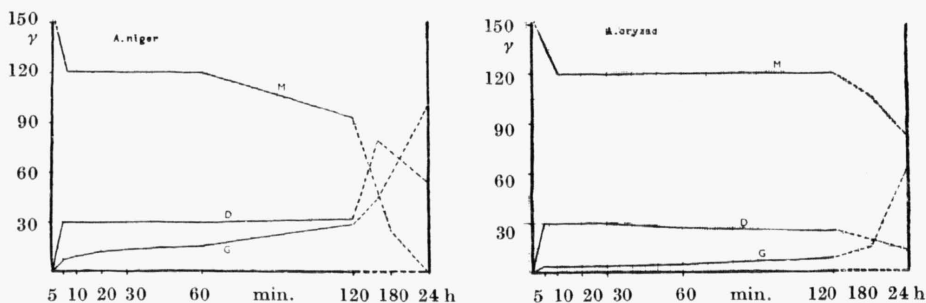
3.



Obr. 4. Výsledek účinku enzymových preparátů z plísňových otrub *A. niger* (MN) a *A. oryzae* (MO) na maltosu za 24 hod. G = glukosa, M = maltosa, X a Y = oligosacharidy (tri a tetrasacharidy). Detekce amoniakálním Ag.

Enzymové výluhy byly inkubovány na maltose a odebírány za 5, 10, 20, 30, 60, 120 a 180 min. a 24 hod. Rozdělené složky byly stanoveny a získané hodnoty vyneseny do grafů (graf 10 a 11).

Výsledek tohoto pokusu nejlépe ukázal rozdíl mezi aktivitou obou plísní. Zatím co preparát *A. niger* za 24 hod. odboural veškerou maltosu a její podstatnou část, t. j. asi 70 % převedl na glukosu a zbytek na vyšší oligosacharidy, *A. oryzae* dovedl zpracovat pouze asi 50 % maltosu (viz též obr. 4). Uvolněná glukosa tvoří pouze přibližně 10% podíl, vyšší oligosacharidy pak 40 % celkového množství cukrů v konečném vzorku.



Graf 10 a 11. Působení enzymových výluhů *A. niger* a *A. oryzae* na maltosu.

Porovnáme-li zjištěné poměry cukrů, vzniklé při účinku enzymových preparátů na škrob (Stárka 1954), kde při kratší době působení (5 hod.) u *A. niger* byl poměr glukosy k maltose a vyšším oligosacharidům 7 : 1 : 4 a u *A. oryzae* 1 : 2 : 6, s výše uvedenými výsledky činnosti plísňových transglukosidas (u *A. niger* 7 : 0 : 3, u *A. oryzae* 1 : 5 : 4), docházíme k nápadné shodě.

Rozdílem v aktivitě transglukosidasy (a případně maltasy, je-li tato odlišným enzymem) lze tedy do značné míry vysvětlit i rozdíly v aktivitě kompletních amylolytických enzymových systémů obou aspergilů při jejich účinku na škrob.

Diskuse

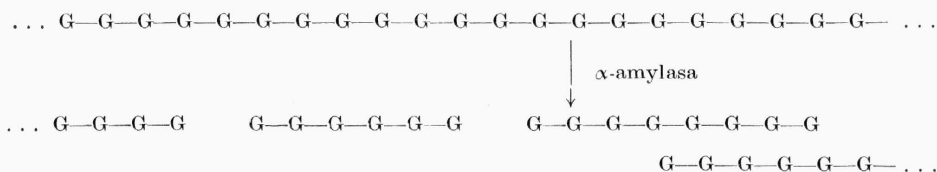
Aspergillus oryzae a *Aspergillus niger* vylučují do prostředí soubor enzymů podílejících se na rozkladu škrobu; u tohoto souboru není zřejmě zachováván stálý a stejný poměr mezi jeho složkami. Uplatňují se zde oba zkoumané faktory, t. j. stáří kultury a povaha specifického substrátu. Rozdíly v aktivitě složek enzymového souboru vyniknou při kvantitativním stanovení uvolněných cukrů a jejich poměru v závislosti na čase. Patrný je nejen již dříve pozorovaný rozdíl (Feniksova 1953, Stárka 1953) mezi *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*, ale též odlišné poměry u téhož kmene různě starého. Zajímavá je vysoká aktivita u desetidenní kultury *Aspergillus oryzae* na škrobové půdě na rozdíl od třidenní a opačný poměr u *Aspergillus niger*. Nahrazením škrobu v kultivační půdě peptonem, t. j. vyřazením specifického substrátu byl proveden významný zásah do tvorby amylolytických enzymů.

Aspergillus oryzae vykazuje zřejmě slabou aktivitu samotné α -amylasy, u *Aspergillus niger* k ní přistupují nepochybně další složky, vyznačující se hromaděním glukosy a maltosy. Význačné je hromadění vyšších oligosacharidů v preparátu z tří denní kultury *A. niger*, zatím co desetidenní po přechodném nahromadění je odbourává. Ani pasážováním nedochází k úplné ztrátě schopnosti štěpit škrob, je tedy tato vlastnost adaptivní pouze kvantitativně.

Původ rozdílů v dynamice amylolytických preparátů použitých v této práci je třeba hledat v poměru aktivity α -amylasy, transglukosidas a konečně maltasy nebo obdobného enzymu.

Především transglukosidas jsou známy svou schopností měnit poměr mezi oligosacharidy přenášením glukosylových jednotek na glukosidové akceptory. Uvažujeme-li současně o aktivitě maltasy, která nahromaduje v prostředí glukosu, rovnovážný stav celé reakce bude výsledkem intenzity vzájemně závislých dílčích reakcí.

Dynamiku amylas za účasti transglukosidas lze vyjádřit schematicky:



(G = glukosylové jednotky v lineárním amylosovém řetězci nebo v dextrinech.) Na vzniklé fragmenty amylosových a případně amylopektinových řetězců s α -1,4 vazbami uplatňují svoji činnost transglukosidas:



Amylasy jsou individuálně různé a liší se tvorbou různých dlouhých dextrinů, resp. jejich poměrem. Obdobné individuální rozdíly jsou u transglukosidas, jak ostatně bylo dokázáno v našich pokusech.*)

Protože je možno aktivitu amylas a transglukosidas řídit úpravou vnějších podmínek produkujícího mikroorganismu a jeho výběrem, lze vysloviti uzávěr, že příprava amylolytického enzymového preparátu se žádanými vlastnostmi pro použití v technické praxi je záležitostí, kterou lze především ovládat vhodnými zásahy do fyziologických poměrů produkčního kmene a teprve v druhé řadě technologickou úpravou hotového produktu.

Děkuji upřímně Z. Stárkové za obětavou spolupráci na experimentální části této práce.

*) Poznámka při korektuře: Když byl rukopis připraven pro tisk, publikovali M. Burger a K. Beran (Chem. listy 48:1394, 1954) pojednání s experimentálními výsledky, které silně podporují nebo potvrzují výsledky naše, i když jich bylo dosaženo zcela jinými metodami.

Hydrolysa škrobu enzymovými preparáty *Aspergillus niger* a *A. oryzae* je procesem, ovlivňovaným jednak kultivačními podmínkami produkujícího mikroorganismu, jednak jeho individuálními vlastnostmi. U preparátů z téhož kmene *A. oryzae* různě starého, kultivovaného na Czapek-Doxově mediu se škrobem, jsou rozdíly především ve vylučování maltosy při účinku na škrobový substrát. Preparát z třídenní kultury má celkově slabší aktivitu a maltosa po krátkém vzestupu opět klesá. Desetidenní kultura již částečně autolysování vylučuje podstatně aktivnější amylolytické enzymy s charakteristickým nahromadováním maltosy. U *A. niger* je vzájemný poměr aktivity různých starých preparátů zhruba opačný, t. j. třídenní preparát je poněkud aktivnější než desetidenní. Význačná a i zvyšující se aktivita amylolytických enzymů dlouho po vyčerpání specifického substrátu vyvolala otázku, jaká je jejich adaptivita. Nahrazením škrobu v kultivační půdě peptonem chromatograficky prostým cukrů byl proveden významný zásah do tvorby amylolytických enzymů. *A. oryzae* za těchto podmínek vykazoval zřejmě převládající aktivitu samotné α -amylasy, u *A. niger* k ní přistupovaly nepochybně další složky, vyznačující se hromaděním glukosy a maltosy. Rovněž zajímavé bylo hromadění vyšších oligosacharidů u preparátů z třídenní kultury, zatím co desetidenní je po přechodném nahromadění odbourává. Ani po vícenásobném pasážování nedochází k úplné ztrátě schopnosti štěpit škrob, je tedy tato vlastnost adaptivní jen kvantitativně.

Původ rozdílů v dynamice amylolytických preparátů je třeba hledat v poměru aktivity α -amylasy, transglykosidas a případně maltosy, pokud tato není totožná s α -transglukosidasou. Uvažujeme-li tedy účast tohoto enzymového systému s nestejným poměrem složek při odbourávání škrobu, konečný stav celé reakce bude výsledkem intenzity vzájemně závislých dílčích reakcí. Oba aspergily vykazují skutečně značnou aktivitu transglykosidas, a to jak transglukosidas, tak i transfruktosidas. Při porovnání aktivity těchto enzymů obou plísni na maltose, sacharose a rafinose byl nalezen nejvýznačnější rozdíl v aktivitě transglukosidas. Při kvantitativním sledování tohoto enzymu u obou plísni na maltose byl za 24 hodin poměr glukosy k maltose a vyšším oligosacharidům u *A. niger* 7 : 0 : 3, u *A. oryzae* 1 : 5 : 4. Ze srovnání s poměry na škrobovém substrátu (*A. niger* 7 : 1 : 4, *A. oryzae* 1 : 2 : 6) lze vyvodit závěr, že rozdíl mezi oběma plísněmi při jejich účinku na škrob je způsoben rozdílem v aktivitě transglukosidas.

L i t e r a t u r a

- Aronson M. (1952) Transgalactosidation during lactose hydrolysis. Arch. Bioch. Biophys. 39 : 370—378.
- Bacon J. S. D., Bell D. J. (1953) A new trisaccharide produced from sucrose by mould invertase. J. Chem. Soc. 2528—2530.
- Bacon J. S. D., Edelman J. (1951) The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other Compositae. Biochem. Journ. 48 : 114—126.
- Barker S. A., Bourne E. J. (1951) The oligosaccharides synthesized by *Escherichia coli* from maltose. Biochem. Journ. 49 : LXI.
- Bealing F. J. (1953) Mould “glucosaccharase” : a fructosidase. Biochem. Journ. 55 : 93—101.
- Bealing F. J., Bacon J. S. D. (1953) The action of mould enzymes on sucrose. Biochem. Journ. 53 : 277—285.
- Bell D. J., D. J. Manners (1952) The action of crystalline β -amylase on some glycogens. J. Chem. Soc. 3641—3644.
- Bird R., R. H. Hopkins (1954a) The action of some α -amylases on amylose. Biochem. Journ. 56 : 86—99.
- Bird R., R. H. Hopkins (1954b) The mechanism of β -amylase action. II. “Multichain” action on amylose fission products. Biochem. Journ. 56 : 140—146.
- Blanchard P. H., N. Albon (1950) The inversion of sucrose; a complication. Arch. Biochem. 29 : 220—222.
- Blažka P. (1949) Nová metoda stanovení cukrů. Čas. lék. č. 88 : 1487.
- Blažka P. (1953) Několik poznámek k metodice stanovení sacharidů anthronovým reagens. Čas. lék. č. 92 : 1270.
- Dimler R. J., W. C. Schaefer, C. S. Wise, C. E. Rist (1952) Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides. Anal. Chem. 24 : 1411—1414.
- Feníksova R. V. (1953) Plesnevyje griby iz roda *Aspergillus* kak producenty amilazy. 1. Ob amilolitičeskich fermentnyh sistemach u dvuch vidov gribov *Aspergillus*. Mikrobiologija 22 : 28—37.
- French D. (1951) Structure of Pan's crystalline trisaccharide. Science 113 : 352—353.
- Gross D., P. H. Blanchard, D. J. Bell (1954) Neo-kestose : a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. J. Chem. Soc. 1727—1730.

- Hestrin S. (1953) Mechanism of degradation and synthesis and some biological activities of intercellular bacterial polysaccharides. Symp. *Metabolismo microbico*, Roma.
- Hestrin S., J. Goldblum (1953) Laevanpolyase. *Nature* 172 : 1046.
- Hopkins R. H., B. Jelinek (1954) The mechanism of β -amylase action. I. Multichain action on amylose. *Biochem Journ.* 56 : 136—140.
- Ierusalimskij N. D. (1951) Problema ontogeneza bakterij i puti k jeho razrešeniju. *Trudy Inst. mikrob. AN SSSR* 1 : 5—43.
- Koehler L. H. (1952) Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Anal. Chem.* 24 : 1576—1579.
- Koepsell H. J., H. M. Tsuchiya, N. N. Hellman, A. Kazenko, C. A. Hoffman, E. S. Sharpe, R. W. Jackson (1953) Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. *J. Biol. Chem.* 200 : 793—801.
- Monod J., A. M. Torriani (1948) Synthèse d'un polysaccharide du type amidon aux dépens du maltose, en présence d'un extrait enzymatique d'origine bactérienne. *C. R. Ac. Sci.* 227 : 240—241.
- Montreuil J., R. Scriban (1952) Les glucides de l'orge, du moût et de la bière. *Bull. Soc. Chimie Biologique* 34 : 674—690.
- Partridge S. M. (1949) Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature* 164 : 443.
- Pan S. C., A. A. Andreasen, P. Kolachov (1950) Enzymic conversion of maltose into unfermentable carbohydrate. *Science* 112 : 115—117.
- Pazur J. H., D. French (1951) The transglucosidase of *Aspergillus oryzae*. *J. Am. Chem. Soc.* 73 : 3536.
- Pazur J. H. (1952) Transfructosidation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Chem.* 199 : 217—225.
- Pazur J. H., D. French (1952) The action of transglucosidase of *Aspergillus oryzae* on maltose. *J. Biol. Chem.* 196 : 265.
- Pigman W. W. (1944) *J. Res. Natl. Bur. Standards* 33 : 105 (cit. podle Sumner-Myrbäck 1950).
- Sörensen H. (1952) On the specificity and products of action of xylanase from *Chaetomium globosum* Kunze. *Physiologia Plant.* 5 : 183—198.
- Sörensen H. (1953) Enzymatic hydrolysis of xylan. *Nature* 172 : 305.
- Stárka J. (1952) Příprava plísňových amylytických preparátů na pšeničných otrubách. *Prům. potravin* 3 : 488—489.
- Stárka J. (1953) Tvorba amylytických enzymů u *Aspergillus oryzae*. *Preslia* 25 : 289—304.
- Stárka J. (1954a) Hodnocení amylytických enzymových preparátů papírovou chromatografií. *Čs. biologie* 3 : 230—234.
- Stárka J. (1954b) Enzymatické odbourávání škrobu plísňovými preparáty v hydrolysátech jablečného pektinu. (V tisku.)
- Sumner J. B., Myrbäck K. (1950) *The Enzymes*. N. York.
- Wallenfels K., E. Bernt (1952) Über die gruppenübertragende Wirkung von Disaccharid-spaltenden Enzymen. *Angew. Chemie* 64 : 28—29.
- De Whalley H. C. S. (1952) Kestose and sugar losses. *Int. Sugar Journ.* 127.
- Whistler R. L., Chen-Chuan Tu (1952) Isolation and properties of a series of crystalline oligosaccharides from xylan. *J. Am. Chem. Soc.* 74 : 3609—3612.

И. Старка :

Динамика гидролиза крахмала амилазами *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*

Гидролиз крахмала энзиматическими препаратами *Asp. niger* и *Asp. oryzae* зависит от условий культивации организма и его собственных свойств. Установленно, что препараты из одного и того же штамма *A. oryzae*, но разного возраста, отличаются друг от друга прежде всего образованием мальтозы при действии на субстрат с крахмалом. Препарат, приготовленный из трехдневной культуры, отличается меньшей актив-

ностью (количество мальтозы после повышения снижается), чем препарат из частично автолизированной 10-дневной культуры, амилалитические энзимы которого характерно накапливают мальтозу в среде.

У культур *A. niger* наблюдается обратное явление: трехдневной культуры препарат отличается большей активностью, чем десятидневной. Отличительная, повышающаяся активность амилалитических энзимов, которая наблюдается после истощения специфического субстрата, вызвала вопрос о характере адаптации этих энзимов. Замещение крахмала в среде пептоном, хроматографически простым сахаром, произвело значительное вмешательство в образовании амилалитических ферментов. У *A. oryzae* преобладала в этом случае активность α -амилазы, между тем как у *A. niger* к ней присоединялись, повидимому, остальные составные части, накапливающие глюкозу и мальтозу в среде. Интересно тоже накопление высших олигосахаров препаратами трехдневной культуры. Десятидневная культура, по нашим наблюдениям, после временного накопления эти олигосахары разлагает. Даже после многократных пассажей культура не теряет способность разлагать крахмал. Следовательно, эта способность культур является адаптивной только в количественном отношении.

Разница в динамике амилалитических препаратов заключается в отношении между активностью α -амилазы, трансглюкозидазей, а иногда мальтазы, не тождественная ли с α -трансглюкозидазой. Принимаем ли во внимание участие этой энзиматической системы, состоящей из различного количества составных частей, при разложении крахмала, будет конечная реакция результатом интенсивности всех взаимно зависимых отдельных реакций. Оба организма отличаются значительной активностью трансглюкозидазей, как трансглюкозидазы, так и трансфруктозидазы. При сравнении активности этих энзимов обоих организмов в отношении мальтозы, сахарозы и рафинозы, установлена наибольшая разница между активностью трансглюкозидазей. При количественном исследовании активности этого фермента у обоих грибов на среде с мальтозой было через 24 часа количество глюкозы в отношении к мальтозе и высшим олигосахарам у *A. niger* 7 : 0 : 3 и *A. oryzae* 1 : 5 : 3. Из сравнений количественных отношений отдельных сахаров на среде с крахмалом *A. niger* (7 : 1 : 4, *A. oryzae* 1 : 2 : 6) можно заключить, что разница между активностью грибов при разложении крахмала обусловлена различием между активностью трансглюкозидазей.

Jiří Stárka:

Dynamics of starch hydrolysis by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* amylases.

Enzymatic hydrolysis of starch by amylase preparations of *A. niger* and *A. oryzae* is influenced by environmental conditions of producing organisms just as by their individual properties. Main differences were found in ratios glucose : maltose : higher oligosaccharides. Results of experiments undertaken to elucidate this, based on quantitative paper chromatography using anthrone test for carbohydrates are summarized as follows:

1. Three-day culture preparation of *A. oryzae* (metabolic fluid) is less active with relatively small maltose accumulation. Preparation of ten-day culture (partially autolyzed) is more active and produces chiefly maltose. *A. niger* preparations from three-day culture are on the other hand most active with glucose as chief component of the hydrolysate.

2. Substitution of starch with glucose-free source of energy and carbon (peptone) resulted in sole α -amylase activity of *A. oryzae*. *A. niger* under the same conditions accumulates maltose, glucose and higher oligosaccharides which are further splitted after temporary accumulation by ten-day preparations. The starch-splitting potency is not lost even after several transfers in the same medium.

3. Both *Aspergilli* exhibit considerable transglycosidase activity (transglucosidase and transfructosidase) on maltose, sucrose and raffinose. Most striking difference was in transglucosidase activity. After 24 hours of incubation of mold-bran extract on maltose in case of *A. niger* the ratio glucose : maltose : higher oligosaccharides was 7 : 0 : 3, in case of *A. oryzae* 1 : 5 : 4. Replacing maltose with starch the ratio of the same components was 7 : 1 : 4 by *A. niger* and 1 : 2 : 6 *A. oryzae*.

From these results it may be concluded that the difference between both *Aspergilli* in their starch-splitting action is due to the difference of activity of their transglucosidases.