

Vplyv vybraných efektorov na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus*

MARTIN TOMÁŠKA - MIROSLAV STREĎANSKÝ - ERNEST ŠTURDÍK

Súhrn. Bol sledovaný vplyv niektorých iónov solí, sacharidov, kazeínu a mlieka na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus*. Dobrý stabilizačný účinok na enzým vykazovali ióny Mn^{2+} , Co^{2+} , laktóza, galaktóza a mlieko, zatiaľ čo ióny Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ca^{2+} daný enzým inaktivovali. Získané poznatky môžu byť využiteľné pri praktických aplikáciách β -galaktozidázy v potravinárskom priemysle.

Enzým β -galaktozidáza (laktáza 3.2.1.23) vďaka svojej schopnosti hydrolyzovať laktózu na glukózu a galaktózu nachádza široké uplatnenie v mnohých odvetviach potravinárskeho priemyslu [1]. V mliekárenstve ako dominantnej oblasti jeho využitia sa používa pri výrobe nízkolaktózového mlieka a niektorých typov mliečnych výrobkov, jednak z dôvodu zlepšenia senzorických a technologických vlastností daných produktov [2] ako aj ich sprístupnenia časti populácie trpiacej poruchami metabolizmu laktózy [3].

β -galaktozidáza je produkovaná mnohými druhmi mikroorganizmov [4]. Vlastnosti tohto enzýmu a efektívnosť jeho produkcie sú výrazne determinované samotným producentom [4]. Najvyššie výťažky laktázy sú dosahované pri použití kvasinkových druhov, avšak fungálna a bakteriálna laktáza je oproti kvasničnej termo- i acidostabilnejšia [5,6,7].

Nakoľko teplotné optimum kvasničnej β -galaktozidázy sa nachádza väčšinou v rozmedzí teplôt, ktoré ju inaktivujú [8], sústreďuje sa pozornosť vedeckých pracovísk na zlepšenie termostability tohto enzýmu vhodnou kombináciou zložiek prostredia, v ktorom má katalyzovať hydrolyzu laktó-

Ing. Martin Tomáška, Ing. Miroslav Stred'anský, doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

zy. Realizácia enzýmových reakcií pri vyšších teplotách je všeobecne výhodná jednak pre zvýšenie účinnosti príslušnej premeny, ako i obmedzenie nežiadúcej kontaminácie. Poznatky o ovplyvňovaní enzýmovej stability sú užitočné i z hľadiska prípravy komerčných preparátov, nakoľko prídavkom ekonomicky i hygienicky akceptovateľného stabilizátora sa môže zlepšiť ich dlhodobá skladovateľnosť.

V tejto práci je popísaný vplyv niektorých iónov, sacharidov, kazeínu a mlieka na termostabilitu nami pripravenej β -galaktozidázy, izolovanej z biomas *Kluyveromyces marxianus* CCY-51-1-1, kultivovanej na srvátke postupom popísaným Stredňanským a kol. [9]. Bol skúmaný vplyv najmä tých efektorov, ktoré sa môžu v reálnych situáciách pri použití β -galaktozidázy bežne vyskytovať.

Materiál a metódy

Ako producent β -galaktozidázy bol použitý kmeň *Kluyveromyces marxianus* CCY 51-1-1 (Zbierka kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava), ktorý bol kultivovaný na ultrafiltrovanej a rastovými faktormi obohatenej sladkej srvátke [9].

Nakultivovaná a odseparovaná biomasa bola lyzovaná prídavkom chloroformu s výslednou koncentráciou 1 % (v/v) pri 37°C v $1 \cdot 10^{-1}$ mol.l⁻¹ draselnofosforečnanovom tlmivom roztoku s pH 9,5 počas 2 h [10]. Uvoľnená β -galaktozidáza bola v bezbunkových extraktoch následne purifikovaná a koncentrovaná ultrafiltráciou (Amicon, RA2000, USA) [1]. Takto pripravený enzýmový preparát bol skladovaný pri teplote 5°C.

Stabilita β -galaktozidázy bola sledovaná pri teplotách 45, 50 a 55°C. Pokusy boli uskutočnené v dvojplášťovej temperovacej nádobke s pracovným objemom 5 ml, vybavenej magnetickým miešadlom. Ako základné prostredie bol zvolený draselnofosforečnanový tlmivý roztok s pH 6,5 ($5 \cdot 10^{-2}$ mol.l⁻¹), do ktorého boli pridávané sledované komponenty s výslednými koncentraciami: anióny $5 \cdot 10^{-2}$ mol.l⁻¹, kationy $5 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-2}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, sacharidy 2,5 a 5 %, kazeín 2 % (hmot.). Vplyv mlieka bol posudzovaný bez prítomnosti draselnofosforečnanového tlmivého roztoku. Výsledná koncentrácia β -galaktozidázy v uvedených zvolených maticiacich bola 15,3 U.ml⁻¹.

Vzorky odoberané v jednotlivých časových intervaloch boli riedené v draselnofosforečnanovom tlmivom roztoku ($c = 5 \cdot 10^{-2}$ mol.l⁻¹, pH 6,5) a

aktivita β -galaktozidázy bola stanovená reakciou s o-nitrofenol- β -D-galaktopyranozidom (ONPG), z ktorého sa hydrolytickým pôsobením enzýmu uvoľňoval o-nitrofenyl (ONP). Jeho množstvo bolo stanovované spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 416 nm. K 0,45 ml roztoku ONPG ($c_{\text{ONPG}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ v $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ draselnofosforečnanovom tlmivom roztoku, pH 6,5 a obsahom $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1} \text{ MnCl}_2$) bolo pridaných 0,05 ml nariadenej vzorky. Reakcia prebiehala 4 minúty pri teplote 25°C a bola zastavená prídavkom 1 ml Na_2CO_3 ($c = 2 \cdot 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$). Mólový absorpčný koeficient pre ONP $4600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bol stanovený za rovnakých podmienok a bol použitý pre výpočet enzýmovej aktivity. Jednotka β -galaktozidázovej aktivity (1 U) bola definovaná ako množstvo enzýmu potrebného na uvoľnenie 1 mol ONP za min v daných podmienkach [6].

Enzýmová aktivita vyjadrená v percentách bola počítaná ako pomer okamžitej a pôvodnej aktivity násobený faktorom 100.

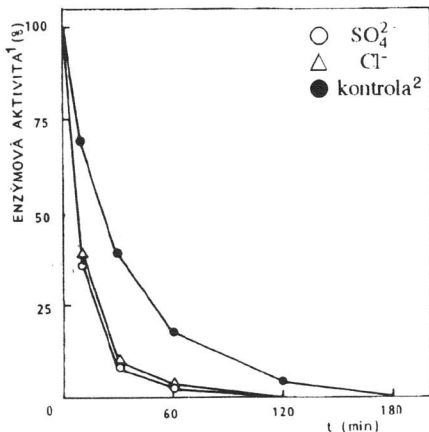
Výsledky a diskusia

Pripravený enzýmový preparát β -galaktozidázy mal špecifickú aktivitu $15 \text{ } 111 \text{ U.g}^{-1}$ bielkovín, teplotné optimum medzi $45\text{--}50^\circ\text{C}$ a pH optimum v intervale 6,2 - 6,4 [11].

Draselnofosforečnanový tlmivý roztok bol zvolený ako základné porovnávacie prostredie, jednak z dôvodu zachovania kontinuity pri samotnom analytickom stanovení, ako aj schopnosti monitorovať termostabilitu enzýmu v tomto roztoku pri nami zvolených podmienkach. Už 10-minútovou inkubáciou pri teplote 45°C aktivita laktázy v iných štandardných prostrediach (destilovaná voda, sodnofosforečnanový tlmivý roztok) nebola detegovateľná.

V prvých experimentoch bolo potrebné overiť, či tie isté kationy viazané do rôznych typov solí odlišne modifikujú činnosť β -galaktozidázy. Vplyv aniónov bol sledovaný prídávaním sodných a amónnych solí o výslednej koncentrácii $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ pri teplote 45°C . Z obr.1 je zrejmé, že kationy sodíka pôsobia negatívne na aktivitu β -galaktozidázy tak vo forme síranov ako i chloridov. Sulfátová skupina v amónnych soliach destabilizovala prítomný enzým, kým chlorid amónny stabilitu laktázy temer neovplyvnil (obr.2).

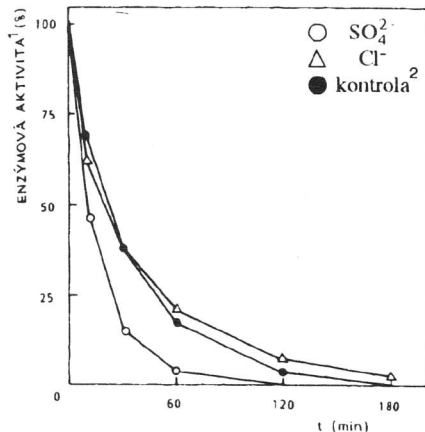
V nasledujúcich pokusoch zameraných na sledovanie vplyvu kationov boli vzhľadom na predchádzajúce výsledky použité soli kyseliny chlorovo-



Obr.1. Vplyv aniónov SO_4^{2-} a Cl^- vo forme sodných solí na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote 45°C . (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

Fig. 1. The influence of SO_4^{2-} and Cl^- anions as sodium salts on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature 45°C . (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)

1 - Enzyme activity, 2 - Control sample.

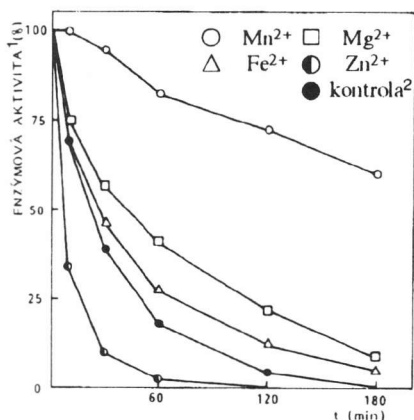


Obr.2. Vplyv aniónov SO_4^{2-} a Cl^- vo forme amónnych solí na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote 45°C . (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

Fig. 2. The influence of SO_4^{2-} and Cl^- anions as ammonia salts on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature 45°C . (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)

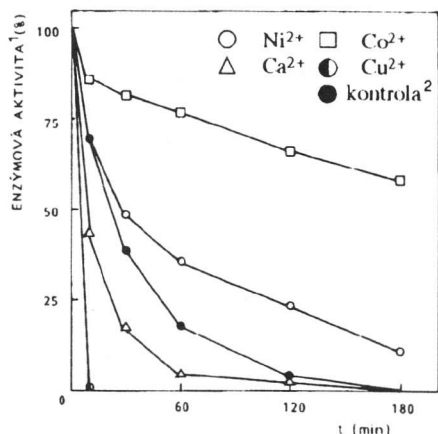
1 - Enzyme activity, 2 - Control sample.

díkovej. Voľba a koncentrácia katiónov bola podmienená ich možným a variabilným zastúpením v mlieku, srvátke a iných mliečnych výrobkoch (zvolená koncentrácia Ca^{2+} , Mg^{2+} bola $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$, u ostatných kovov $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Ako vyplýva z obr.3a,3b, stabilita β -galaktozidázy bola výrazne ovplyvnená prítomnosťou katiónov. V porovnaní s draselnofosforečnanovým tlmivým roztokom (kontrola) výborný stabilizačný efekt pri teplote 45°C vykazovali ióny Mn^{2+} a Co^{2+} , keď v tomto prostredí si laktáza aj po 180-minútovej inkubácii zachovala okolo 60 % pôvodnej aktivity. Chlorid nikelnatý, horečnatý a železnatý v uvedenom poradí taktiež mierne zvyšovali enzýmovú termostabilitu (5 - 11 % pôvodnej aktivity v 180 min). Čiastočná inaktivácia β -galaktozidázy nastala v prítomnosti Ca^{2+} a Zn^{2+} (strata aktivity po 120 min) a úplná účinkom Cu^{2+} . Práce autorov Changa a Mahoneya [5], Bhowmika a Martha [12] a Brandaoa a kol. [13] charakterizujúce vlastnosti a správanie bakteriálnej, resp. fungálnej laktázy poväčšinou korešpondujú s nami prezentovanými výsledkami, hoci niektoré



Obr.3a. Vplyv katiónov Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} a Zn^{2+} na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote $45^{\circ}C$. (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

Fig.3a. The influence of Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} cations on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature $45^{\circ}C$. (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)
1 - Enzyme activity, 2 - Control sample.

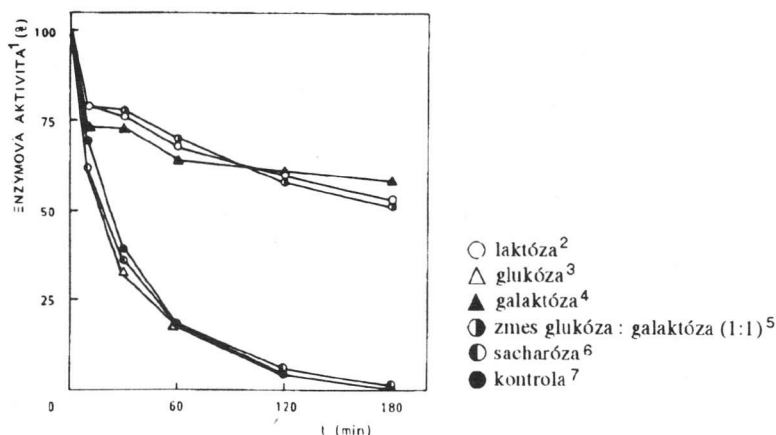


Obr.3b. Vplyv katiónov Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} a Cu^{2+} na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote $45^{\circ}C$. (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

Fig.3b. The influence of Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} cations on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature $45^{\circ}C$. (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)
1 - Enzyme activity, 2 - Control sample.

sledované katióny (Zn^{2+} , Mg^{2+}) vyvolávali pravdepodobne vzhľadom na odlišný pôvod enzýmu opačný efekt.

Sacharidy ako laktóza, galaktóza a glukóza sú priamo späté s činnosťou β -galaktozidázy. Sacharóza ako súčasť niektorých mliečnych výrobkov môže taktiež tvoriť zložku pracovného prostredia tohto enzýmu. Je pravdepodobné, že menované sacharidy budú ovplyvňovať činnosť laktázy. Galaktóza pôsobí ako kompetitívny inhibítor samotnej enzýmovej reakcie [8], čo vlastne znevýhodňuje použitie enzýmovej hydrolýzy pri koncentrovanejších laktózových roztokoch. Zaujímavé je sledovať ako prítomné sacharidy vplývajú na termostabilitu β -galaktozidázy. Pokusy uskutočnené s ich prídavkami do draselnofosforečnanového tlmivého roztoku (obr. 4) pri teplote $45^{\circ}C$ poukazujú na skutočnosť, že práve ten sacharid, ktorý kompetitívne inhibuje enzýmovú reakciu, zároveň zvyšuje stabilitu laktázy pri vyšších teplotách. Z takmer totožného priebehu inaktivačných kriviek v prostredí 5 %-nej laktózy, galaktózy a zmesi glukóza a galaktóza (1:1), kde v 180. minúte si enzým zachoval 50 - 60 % pôvodnej aktivity, vyplýva kľúčová



Obr.4

Obr.4. Vplyv laktózy, glukózy, galaktózy, zmesi glukóza, galaktóza (1:1) a sacharózy na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote 45°C. (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

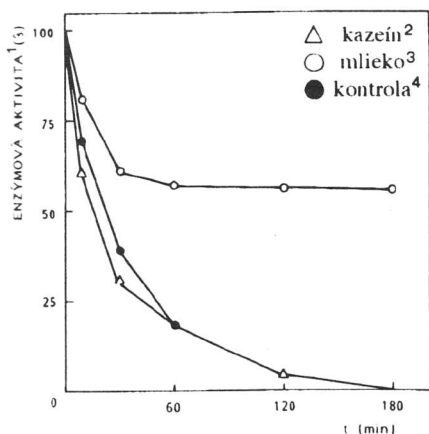
Fig. 4. The influence of lactose, glucose, galactose, blend of glucose and lactose (1:1) and saccharose on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature 45°C. (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)

1 - Enzyme activity, 2 - Control sample, 3 - Glucose, 4 - Galactose, 5 - Glucose galactose blend (1:1), 6 - Saccharose, 7 - Control sample.

stabilizačná schopnosť galaktózy. Prítomná laktóza je totiž činnosťou enzýmu konvertovaná na galaktózu a glukózu a jej stabilizačný efekt sa teda prejavuje najmä v počiatočných minútach inaktivácie. Naproti tomu glukóza a sacharóza v rovnakých výsledných koncentráciách termostabilitu laktázy neovplyvnili. Túto rozdielnú stabilizačnú schopnosť sacharidov možno vysvetliť na základe poznania mechanizmu β -galaktozidázovej enzýmovej reakcie, v priebehu ktorej dochádza k vytvoreniu pravdepodobne stabilizujúceho komplexu enzým - galaktóza [14].

Pred sledovaním aktivity laktázy v mlieku pri teplote 45°C, bol overený vplyv kazeínu (výsledná koncentrácia 2 % hmot.) ako jednej z majoritných bielkovinových frakcií mlieka. Z obr.5 je evidentné, že jeho prítomnosť neovplyvňovala enzýmovú stabilitu. Dobrá termostabilita β -galaktozidázy v mlieku, ako pomerne zložitej matrici, je zrejme daná kombinovaným účinkom laktózy, galaktózy a prítomných iónov (obr.5).

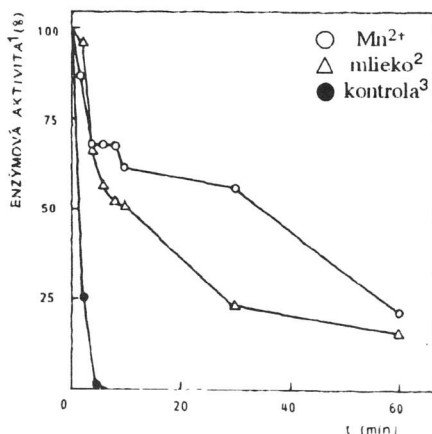
Na záver bola odskúšaná termostabilita laktázy pri teplotách 50 a 55°C v dvoch vytipovaných prostrediach: v draselnofosforečnanovom tlmivom roztoku s prídavkom $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ a v mlieku. Ako vidieť z obr.6, stabilizačný efekt bol u oboch matríc temer rovnaký, keď v 60. minúte bolo



Obr. 5. Vplyv kazeínu a mlieka na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote 45°C. (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

Fig. 5. The influence of casein and milk on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature 45°C. (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)

1 - Enzyme activity, 2 - Casein, 3 - Milk, 4 - Control sample.



Obr. 6. Vplyv katiónov Mn^{2+} a mlieka na termostabilitu β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus* pri teplote 50°C. (Porovnávacie prostredie - draselnofosforečnanový tlmivý roztok, pH 6,5.)

Fig. 6. The influence of Mn^{2+} and milk cations on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* at the temperature 45°C. (Comparative environment - potassiumphosphate buffer solution, pH 6,5.)

1 - Enzyme activity, 2 - Milk, 3 - Control sample.

nameranych 21, resp. 15 % pôvodnej aktivity (teplota 50°C). Pri teplote 55°C bola laktáza v mlieku úplne inaktivovaná už v 6. minúte, kým za prítomnosti Mn^{2+} si enzým v 10. minúte zachoval ešte 9 % pôvodnej aktivity (nezobrazené údaje).

Z uvedených výsledkov je zrejmé, že optimálne teploty pre činnosť študovanej β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus*, zohľadňujúc interval teplotného optima i jej termostabilitu, sú teploty blížiac sa zľava k 45°C. Za predpokladu prítomnosti tých komponentov, ktoré pozitívne ovplyvňujú stabilitu enzýmu (ióny Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , laktóza, galaktóza), možno efektívne s laktázou pracovať i na hornej hranici tohto intervalu. I z hľadiska dlhodobej skladovateľnosti bude pravdepodobne vhodné stabilizovať enzýmový preparát prídavkom uvedených zložiek.

Za technickú pomoc autori ďakujú pani Alene Balogovej.

Literatúra

1. RYDER, D.N., Hydrolysis of lactose in whey products, Bull. Int. Dairy Fedr., 233, 1988, s. 45.
2. GEKAS, V. - LOPEZ-LEIVA, M., Hydrolysis of lactose: a literature review. Process Biochem., 20, 1985, s. 2.
3. DAHLQVIST, A., - ASP, N.-G. - BURVALL, A. - RAUSING, H., Hydrolysis of lactose in milk and whey with minute amounts of lactase. J. Dairy Res., 44, 1977, s. 541.
4. FROST, G.M. - MOSS, D.A., Production of enzymes by fermentation. In: Biotechnology, Rehm, H.-J.-Reed, G. (Eds.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987, s. 69.
5. CHANG, B. - MAHONEY, R.R., Factors affecting the thermostability of β -galactosidase (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) in milk: a quantitative study. J. Dairy Res., 56, 1989, s. 785.
6. CHAMPLUVIER, B. - KAMP, B. - ROUXHET, P.G., Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp., Enzyme Microb. Technol., 10, 1988, s. 611.
7. AGRAWAL, S. - SONAWAT, H.M. - DUTTA, S.M., Thermostable β -galactosidase from fungi. J. Dairy Sci., 65, 1982, s. 866.
8. GONCALVES, J.A. - CASTILLO, F.J., Partial purification and characterization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. J. Dairy Sci., 65, 1982, s. 2088.
9. STREĎANSKÝ, M. - ŠTURDÍK, E. - TOMÁŠKA, M. - MALIAR, T. - KREMnický, L., Produkcia biomasy *Kluyveromyces marxianus* na srvátke. Kvasný prům., 37, 1991, s. 137.
10. STREĎANSKÝ, M. - TOMÁŠKA, M. - ŠTURDÍK, E. - KREMnický, L., Optimization of β -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. Enzyme Microb. Technol., v tlači.
11. TOMÁŠKA, M., Získavanie, charakterizácia a využitie β -galaktozidázy *Kluyveromyces marxianus*. Diplomová práca. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 1990.
12. BHOWMIK, T. - MARTIN, E.H., β -Galactosidase of *Pediococcus* species: induction, purification and partial characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 1990, s. 317.
13. BRANDAO, R.L. - NICOLI, J.R. - FIGUEIREDO, A.F.S., Purification and characterization of β -galactosidase from *Fusarium oxysporum* var. *lini*. J. Dairy Sci., 70, 1987, s. 1331.
14. SHUKLA, T.P., β -Galactosidase technology: a solution to the lactose problem. CRC. Crit. Rev. Food Technol., 5, 1975, s. 325.

Do redakcie došlo 1.12.1992.

Selected effectors influence on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*

Summary

Influence of some salts, saccharides, casein and milk ions on thermostability of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* was observed. Good stabilization effect on enzyme produced ions Mn^{2+} , Co^{2+} , lactose, galactose and milk, while the ions Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Ca^{2+} inactivated the enzyme. Obtained information may be utilizable at applications of β -galactosidase in food industry.