

CHARAKTERYSTYKA BAKTERYJNEJ GALAKTANAZY NA POLISACHARYDACH ROŚLINNYCH

Ryszard Zamorski

Zakład Biochemii Wydziału Rolniczego, Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy

WSTĘP

Hemicelulazy, do których zalicza się galaktanazy, występują powszechnie w przyrodzie. Najlepszym ich źródłem są mikroorganizmy glebowe, szczególnie fitopatogenne grzyby. W świecie roślin spotyka się je jedynie w okresie kiełkowania nasion [2]. W praktyce izolowano hemicelulazy z płynów hodowlanych mikroorganizmów, którym w pożywcę dostarczano mniej lub bardziej oczyszczone hemicelulozy, które inicjowały wytworzenie przez dostosowujący się do środowiska mikroorganizm odpowiedniego enzymu (enzymów). Inną, czasami wygodniejszą możliwością jest wykorzystanie gotowych preparatów enzymatycznych, które są dość powszechnie wykorzystywane w przetwórstwie. Wyróżnia się dwa typy galaktanaz: rozkładające wiązania 1-4 β -D-galaktanu oraz atakujące wiązania 1-3 β -D-galaktanu [4]. Te pierwsze enzymy otrzymano z bakterii *Bacillus subtilis* różnych szczepów [5,10]. W cytowanych badaniach jako substrat wykorzystywano galaktan soi. Głównym produktem hydrolizy prowadzonej przez enzymy był tetragalaktozyd [10] lub digalaktoza [5]. Zawsze wykrywano obecność galaktozy i różnych oligomerów [3]. Wskazywało to na fakt, że enzymy działały według mieszanego mechanizmu endo, jak i egzozymy. Jeden z czterech enzymów *Rhizopus niveus* typu 1-3 badanych przez Hashimoto i in. [7] wykazywał prawdopodobnie specyficzność multisubstratową, uwalniając z arabinogalaktanu ziarna kawowego arabinozę, galaktozę i szereg oligosacharydów.

Wychodząc z założenia, że tylko dobrze oczyszczone enzymy działające na dobrze poznane substraty mogą dostarczać prawidłowych wniosków dla ich właściwych zastosowań, podjęto próbę izolowania galaktanazy *Bacillus subtilis*, pełnej charakterystyki enzymu oraz sprawdzenia jego działania na preparaty ścian komórkowych jabłka i buraka cukrowego.

MATERIAŁ I METODY

Induktor wytwarzania galaktanazy – arabinogalaktan soi otrzymano z mąki sojowej, poprzez jej inkubację z 0,5 M NaOH w 121° C i rutynowe oczyszczenie polisacharydu, który znajdował się w supernatancie.

Substrat dla enzymu – galaktan ziemniaka uzyskano z włóknistej pozostałości z produkcji skrobii. Ekstrakcję prowadzono 4 M NaOH w temperaturze 90° C przez

20 godzin. Po dializie i odwirowaniu, rozłożono enzymatycznie rozpuszczoną skrobię, ponownie prowadzono dializę i galaktan wytrącono i przemyto etanolem. Wydajność wynosiła 16%.

Materiał ścian komórkowych świeżych jabłek i buraka cukrowego (prasowane wysłodki) izolowano jak opisano wcześniej [11].

Hodowlę prowadzono dwukrotnie przez 72h w temperaturze 28° C w inkubatorze obrotowym (50 rpm) wykorzystując bakterie *Bacillus subtilis* w pożywkach zawierających w 1 dm³: 0,5% arabinogalaktanu soi, 5 g peptonu (Difco), 1,3 g K₂HPO₄×3H₂O, 0,5 g MgSO₄×7H₂O, 2,4 g KNO₃ oraz 0,4 cm³ 2% FeCl₃. Po odwirowaniu komórek bakteryjnych otrzymano łącznie 1,5 dm³ płynu hodowlanego, który zagęszczono przez ultrasączenie. Dalej postępowano w zasadzie podobnie do metodyki Labavitcha i in.[10], z tym, że w chromatografii powinowactwa wykorzystano galaktan ziemniaka jako efektor.

Cukry obojętne analizowano jako octany alditoli wg Jonesa i Albersheima [9], a reszty glikozydowe tworzące polisacharydy jak opisał Hakomori [6]. Ogólne stężenie monosacharydów ustalano za pomocą kwasu siarkowego i fenolu, stężenie uroni-dów z m-hydroksydwufenylem [1], a ilość grup redukujących klasyczną metodą Nelsona i Somogyi.

Aktywność galaktanazy oznaczano inkubując enzym w temperaturze 37° C przez 2h z 0,25% roztworem galaktanu ziemniaka w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0. Jednostkę aktywności zdefiniowano jako ilość enzymu, która uwalniała w ciągu 1 minuty 1 mikromol redukujących grup. Optymalne warunki działania enzymu badano w zakresie pH 3,6-5,8 (bufor octanowy) i od 5,8-8,0 (bufor fosforanowy) i temperatury 10-90° C używając 0,04U enzymu.

Mechanizm działania galaktanazy określono analizując próbki za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej po 2h i 20h reakcji. Używano 0,08U enzymu, podobnie jak i w doświadczeniu mającym na celu próbę hydrolyzy materiału ścian komórkowych jabłka i buraka cukrowego. W tym ostatnim zastosowano 15 mg substratów i bufor octanowy zamiast fosforanowego, prowadząc doświadczenie jak opisano wcześniej [11].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Arabinogalaktan soi składał się z galaktozy i arabinozy z niewielkimi domieszkami glukozy, mannozy i dezoksyheksoz (tabela 1). Wykazano obecność przede wszystkim reszt piranozowych galaktozy powiązanych 1-4 i mniejsze ilości reszt końcowych i bardziej rozgałęzionych. Arabinoza występowała w dwóch postaciach: reszt furanozowych powiązanych 1-5 i furanozowych reszt końcowych. Reszty mannozy i część reszt glukozy uczestniczyła w rozgałęzieniach łańcucha. Pozostała część glukozy łączyła się także wiązaniami 1-4. Nieliczne reszty dezoksyheksoz występowały jako zakończenia łańcuchów.

Galaktan ziemniaka różnił się od poprzednio opisanego wyższą zawartością galaktozy i niższą arabinozy i glukozy. Ponadto nie wykryto dezoksycukrów, natomiast pojawiła się ksyloza. Reszty galaktozy powiązane były prawie wyłącznie 1-4.

Tabela 1

Skład monosacharydowy arabinogalaktanu, galaktanu i materiału ścian jabłka i buraka oraz reszty glikozydowe tworzące izolowane polisacharydy (% wag.).

Monosaccharide composition of arabinogalactan, galactan, and apple and sugar beet cell wall material, and glycoside residues of both isolated polisaccharides (%).

Monosacharyd Monosaccharide Reszta glikozydowa Glycoside residue	Arabino- galaktan	Galaktan	Ściany komórkowe Cell wall material	
	Arabino- galaktan	Galactan	jabłka apple	buraka sugar beet
Rha/Fuc	0,9	-	2,3	2,1
końcowa-terminal	0,9	-		
Ara	39,1	20,4	14,8	21,9
końcowa-terminal	16,3	2,0		
związana-linked: 1,5	22,8	16,4		
1,2,3,5	-	2,0		
Xyl	-	3,6	9,2	3,4
związana-linked: 1,4	-	3,6		
Man	3,2	3,2	5,2	11,9
związana/linked: 1,4,6	3,2	3,2		
Gal	51,1	71,4	7,3	9,8
końcowa-terminal	5,1	2,8		
związana-linked: 1,4	36,1	61,0		
1,2,4	3,8	6,0		
1,2,4,6	6,1	1,6		
Glu	5,7	1,4	25,5	15,4
związana-linked: 1,4	2,3	1,0		
1,6	3,4	0,4		
GalUA	-	-	22,7	23,3
Białko-protein (micro Kjeldahl)	-	-	7,2	6,8
Rha-ramnoza, rhamnose	Fuc-fukoza, fucose	Ara-arabinoza, arabinose	Xyl-ksyloza, xylose	Man-mannose mannose
Gal-galaktoza, galactose	Glu-glukoza, glucose	GalUA-kwas galakturonowy galacturonic acid		

Występowały nierzadkie, bardziej skomplikowane reszty galaktozy. Arabinofuranoza tworzyła głównie reszty końcowe łańcucha. Wykryto także reszty arabinozy, których cztery grupy hydroksylowe tworzyły wiązania glikozydowe.

Homogenność izolowanych polisacharydów sprawdzono na kolumnie wypełnionej żelom BioGel P-2.

Kompleksy polisacharydowe ścian komórkowych jabłka i buraka cukrowego, wydzielone jako materiał nierozpuszczalny w alkoholu, zawierały podobną ilość

cukrów obojętnych, uronidów i białka. W przypadku jabłka glukoza stanowiła większość cukrów obojętnych. Wykryto mniejsze ilości pozostałych monosacharydów. Natomiast u buraka cukrowego przeważała arabinoza.

Galaktanazę izolowano z zagęszczonego płynu hodowlanego rozpoczynając od sączenia na anionicie (tabela 2). Enzym wymyto z kolumny roztworem NaCl o stężeniu 0,2M. Aktywność specyficzna wzrosła ponad 8 razy. W kolejnym etapie usunięto następną część zanieczyszczających białek. Enzym był słabo zatrzymywany przez żel i został wymyto za pomocą niskiego stężenia fosforanu sodowego. Bardzo skutecznym sposobem była wykorzystana następnie chromatografia powinowactwa. Białko enzymatyczne, które opuściło kolumnę było jednakże zanieczyszczone pozostałością efektora – galaktanu ziemniaka, który oddzielono w wyniku sączenia żelowego. Enzym był zatrzymywany przez ziarna żelu w mniejszym stopniu niż wielocukier, który był związkiem o mniejszej masie molowej. Ostatecznie białko zostało oczyszczone 104 razy, a aktywność specyficzna wynosiła 34,5U/mg białka. W procesie izolowania uzyskano 30U enzymu, co stanowiło 53% aktywności stwierdzonej w płynie hodowlanym.

Tabela 2

Etapy oczyszczenia galaktanazy *Bacillus subtilis*.
Purification of the *Bacillus subtilis* galactanase.

Etap oczyszczenia Purification step	Objętość Volume (cm ³)	Białko Protein (mg/cm ³)	Ogółem Total (mg)	Aktywność galaktanazy Galactanase activity	
				Specyficzna (U/mg) Specific	Ogółem (U) Total
Płyn hodowlany- Broth	1500	0,114	171	0,33	57
Stężony-Concentrated	160	0,96	153,6	0,34	52
DEAE BioGel A	160	0,11	17,6	2,84	50
HTP BioGel	105	0,058	6,09	6,24	38
AH Sepharose	110	0,010	1,10	31,82	35
BioGel P-100	58	0,015	0,87	34,48	30

Białko enzymatyczne poddano procesowi SDS elektroforezy, w wyniku której stwierdzono na żelu plamkę główną i nieco powyżej niej drobne zaciemnienie, które mogło świadczyć o obecności jeszcze małej ilości zanieczyszczeń. Porównanie z serią wzorców pozwoliło określić masę cząsteczkową białka na około 40000 Da.

Galaktanaza okazała się stosunkowo mało wrażliwa na zmiany pH środowiska. Jej optimum stwierdzono przy pH 6,0. Optymalna temperatura działania wyniosła 45° C, przy dość łagodnym nachyleniu krzywej.

W doświadczeniu, którego celem było oznaczenie typu mechanizmu reakcji, produkty reakcji dwukrotnie poddano analizie chromatografii cieczerwowej. Galaktanaza początkowo rozkładała galaktan ziemniaka do oligomerów: tetrameru, trimeru i di-

meru galaktozy. Po 20h stale był obecny nierozłożony polimer, a proporcje ilościowe oligomerów nie uległy zmianie. Stwierdzono natomiast niewielką ilość galaktozy. Enzym ujawnił więc działanie typu endo.

Enzymatyczny rozkład kompleksowych preparatów ścian komórkowych prowadzono w taki sposób, aby osiągnąć maksymalny możliwy stopień hydrolizy. Rozwój niepożądanych mikroorganizmów w środowisku reakcji był hamowany przez azydek sodowy. Wyniki hydrolizy zamieszczono w Tabeli 3, dodając analizę kontrolnych prób bez enzymu, aby można było ocenić powolne działanie hydrolizujące buforu octanowego.

Galaktanaza była stosunkowo aktywna w stosunku do preparatu pochodzącego z jabłka uwalniając ponad 13% dezoksyheksoz, 45% galaktozy i kwasów uronowych, a prawie 24% wszystkich cukrów. Średni stopień polimeryzacji uzyskanych oligomerów wynosił około 8.

Materiał ściany komórkowej buraka był rozkładany bardzo energicznie (30% cukrów), w tym ponad 60% arabanu i 50% uronidów. Polisacharydy zawierające galaktozę zostały rozłożone jedynie w 27,1%. Średni stopień polimeryzacji był wyższy niż wymieniony poprzednio i wynosił 11,9.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Arabinogalaktan soi, jako jeden z nielicznych wielocukrów galaktozy powiązanej β 1-4, został otrzymany i użyty także w doświadczeniach Labavitch'a i in. [10]. Autorzy ci wykazali obecność 52% galaktozy, 43% arabinozy, 3% glukozy i 1% glukozy. Nie analizowali oni rodzajów wiązań łączących reszty glikozydowe. Polisacharyd pochodzący z włóknistej pozostałości ziemniaka otrzymany został w prostszy sposób, niż opisany u innych autorów [8], a ponadto nie wymagał użycia dużych ilości amylazy do rozłożenia skrobi. Galaktoza zawarta w tym materiale ziemniaczanym prawie w całości została ekstrahowana jako galaktan. Labavitch i in. [10] zastosowali do charakterystyki enzymu galaktan z pektyny cytryny, który był prawie czystym galaktanem z kilkuprocentowymi domieszkami innych monosacharydów.

Znakomite wyniki hodowli bakterii osiągnęli Labavitch i in. [10]. Ich metodyka izolacji była podobna do tej użytej w prezentowanych badaniach, z tym, że nie wystąpił etap chromatografowania na hydroksypatycie, a efektem w chromatografii powinowactwa był produkt reakcji – tetragalaktoza. Otrzymany enzym był najbardziej zbliżony właściwościami do tego, który otrzymali wymienieni autorzy. W pracy Emi i Yamamoto [5] oznaczono mniejsze masy molowe galaktanaz, wyższe optimum temperaturowe oraz równe lub wyższe optimum pH. Mechanizm działania enzymu przypominał kombinowany mechanizm endo/egzo opisany przez Labavitch'a i in. W innych pracach komunikowano o otrzymywaniu galaktozy i szeregu oligomerów, co byłoby świadectwem mechanizmu typu egzo [3,5]. Galaktanaza uwalniała z preparatu ściany komórkowej jawora 60% galaktozy i 30% arabinozy [10], ale tylko około 30% galaktozy w wypadku badań z ziemniakiem [3,8]. Z proporcji arabinozy i galaktozy odczepianych przez enzym wynika, że budowa bocznych

Tabela 3

Analiza hydrolizatów po rozkładzie preparatów ścian komórkowych jabłka i buraka cukrowego przez oczyszczoną galaktanazę.
Results of analysis of hydrolysates after decomposition of apple and sugar beet cell walls by the purified galactanase.

	Ramnoza/ Fukoza	Arabinoza	Ksyloza	Mannoza	Galaktoza	Glukoza	Cukry obojętne	Kwasy uronowe	Cukry razem	Redukujące grupy	Stopień po- limeryzacji	
	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Neutral sugars	Uronic acids	Sugars total	Reducing end-groups	Polymeriza- tion degree	
	Ściana komórkowa jabłka											
	Apple cell wall preparation											
Kontrola Control												
µg	9,0	192,0	44,4	37,6	119,7	34,2	436,9	481,6	918,5			
µM/10 ²	6,1	145,3	33,6	23,2	73,8	21,5	303,5	273,4	576,9	49,0	11,8	
%	2,6	8,7	3,7	4,8	11,0	0,9	4,6	14,1	7,1			
µg	46,3	606,1	108,0	90,6	488,7	146,7	1486,3	1561,9	3048,2			
µM/10 ²	31,8	458,8	81,7	55,9	301,3	90,4	1019,9	886,8	1906,7	240,0	7,9	
%	13,5	27,4	9,1	11,5	44,7	3,8	15,7	45,9	23,7			
Kontrola Control												
	Ściana komórkowa buraka											
	Sugar beet cell wall preparation											
µg	5,1	148,3	25,9	79,9	78,3	41,8	379,3	116,1	495,4			
µM/10 ²	3,4	112,3	19,6	49,3	48,4	25,8	258,8	66,0	324,8	15,6	20,8	
%	1,6	4,5	5,1	4,5	5,3	1,8	3,9	3,3	3,7			
µg	39,0	2046,0	100,5	225,9	400,2	97,3	2908,9	1786,5	3923,3			
µM/10 ²	26,7	1548,6	76,0	139,5	246,7	60,0	2097,5	1014,4	3111,9	261,5	11,9	
%	12,2	62,5	19,9	12,6	27,1	4,2	30,0	51,2	29,8			

Stopień polimeryzacji oligosacharydów obliczono dzieląc ilość mikromoli cukrów przez ilość mikromoli redukujących grup końcowych.
Degree of polymerization was calculated by dividing total number of monosugar molecules by number of reducing end groups (both expressed in µM/cm³.)

łańcuchów arabinogalaktanowych ramnogalakturonianu musi być zupełnie inna dla jabłka i buraka cukrowego. Uwalnianie dużych ilości uronidów przez galaktanazę, obserwowane także przez Jarvisa i in. [8], może być interpretowane jako możliwość obecności odcinków galaktozowych w łańcuchu ramnogalakturonianu. Zgodnie z oczekiwaniami [11] mannan, ksylan i celuloza, szczególnie w wypadku buraka cukrowego, były odporne na działanie oczyszczonej hemicelulazy. Wyższy stopień polimeryzacji uwolnionych produktów hydrolizy wydaje się potwierdzać większy stopień usieciowania struktury ściany komórkowej buraka cukrowego w stosunku do jabłka.

LITERATURA

1. Ahmed A.E.R., Labavich J.M. (1977). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.*, 1, 361-365.
2. Bateman D.F., Basham H.G. (1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. W: *Physiological plant pathology*. Heitefuss R., Williams P.H. eds., Springer Verlag, Berlin, pp. 316-355.
3. Bauer W.D., Bateman D.F., Whalen G.H. (1977). Purification of an endo- β -1,4 galactanase produced by *Sclerotinia sclerotiorum*: effect on isolated plant cell walls and potato tissue. *Phytopathology*, 67, 862-868.
4. Emi S., Yamamoto T. (1972). Hemicellulolytic enzymes of *Bacillus subtilis*. III. Purification and properties of several galactanases of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 36, 1945-1954.
5. Dekker R.F.H., Richards G.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. W: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Tipson R.S., Horton D. eds., Academic Press, New York, pp. 277-352.
6. Hakomori S. (1964). A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methyl sulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, 55, 205-208.
7. Hashimoto Y., Tsujisaka Y., Fukumoto J. (1969). Enzyme treatment of coffee beans. III. Purification and some properties of galactanase from *Rhizopus niveus*. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 43, 831-836.
8. Jarvis M.C., Threfall D.R., Friend J. (1981). Potato cell walls polysaccharides: degradation with enzymes from *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Botany*, 32, 1309-1319.
9. Jones T.M., Albersheim P. (1972). A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, 49, 926-936.
10. Labavitch J.M., Freeman L., Albersheim P. (1976). Structure of plant cell walls. Purification and characterization of a β -1,4-galactanase which degrades a structural component of the primary cell walls of dicots. *J. Biol. Chem.*, 251, 5904-5910.
11. Zamorski R., Voragen A.G.J. (1982). Enzymatyczna hydroliza polisacharydów jabłka i buraka cukrowego. *Zesz. Nauk. ATR, Rolnictwo* 15, 26-39.

STRESZCZENIE

Opisano izolację bakteryjnej galaktanazy, której wytwarzanie indukowano za pomocą arabinogalaktanu izolowanego z mąki sojowej. Charakterystyki oczyszczonego białka enzymatycznego dokonano w oparciu o galaktan otrzymany z włóknistej pozostałości z produkcji skrobi ziemniaczanej. Masa molowa enzymu wyznaczona za pomocą elektroforezy wynosiła około 40000Da, optimum pH 6,0, a temperatury 40° C. Mechanizm działania galaktanazy określono jako przede wszystkim typu endo. Enzym dość energicznie rozkładał preparaty ścian komórkowych jabłka i buraka cukrowego (odpowiednio 23,7 i 29,8% cukrów), uwalniając głównie galaktozę i uronidy, jednakże jego zdolności macerowania tkanek roślinnych były ograniczone.

CHARACTERISTICS OF A BACTERIAL GALACTANASE ON PLANT
POLYSACCHARIDE SUBSTRATES

Ryszard Zamorski

Department of Biochemistry, University of Technology and Agriculture, Bydgoszcz

S u m m a r y

Purification of a bacterial galactanase with soybean arabinogalactan as a triggering agent has been described. The purified enzyme protein was characterized with a help of potato galactan isolated from the fibre residue from the starch production. Molecular weight of the enzyme, determined by SDS electrophoresis was 40000Da, optimum pH 6.0, and optimum temperature 40° C. Mechanism of action was found to be mainly of an endo type. The enzyme decomposed apple and sugar beet cell wall preparations moderately well (23.7% and 29.8% of sugars, respectively), releasing predominantly galactose and uronides. Any effective maceration of a plant tissue by this enzyme would be doubtful.

Dr Ryszard Zamorski
Akademia Techniczno-Rolnicza
Zakład Biochemii
ul. Bernardyńska 6/8
85-029 Bydgoszcz