

KATARZYNA SAMBORSKA

## WPLYW DODATKÓW STABILIZUJĄCYCH NA KINETYKĘ INAKTYWACJI CIEPLNEJ $\alpha$ -AMYLAZY Z *ASPERGILLUS ORYZAE*

### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu substancji dodatkowych na kinetykę inaktywacji cieplnej  $\alpha$ -amylazy z *Aspergillus oryzae*. Badano, czy efekt stabilizujący alkoholi wielowodorotlenowych (mannitolu, laktitolu, sorbitolu i glicerolu) i dwucukrów (trehalozy i sacharozy) związany jest z liczbą grup hydroksylowych występujących w ich cząsteczkach lub z ogólną liczbą tych grup w roztworze.

Zastosowane dodatki we wszystkich stężeniach spowodowały wydłużenie czasu dziesięciokrotnej redukcji aktywności enzymu w temperaturze 68°C, co świadczy o ich działaniu stabilizującym na enzym. Zauważalne były różnice efektywności stabilizacji w zależności od rodzaju substancji oraz jej stężenia. Zastosowanie cukrów okazało się bardziej korzystne niż alkoholi wielowodorotlenowych, a najbardziej skutecznym dodatkiem stabilizującym była sacharoza. Na podstawie wzrastających właściwości ochronnych analizowanych związków uszeregowano je następująco: mannitol < laktitol < sorbitol < glicerol < trehaloza < sacharoza. Otrzymane wyniki nie potwierdziły hipotezy o wpływie liczby grup hydroksylowych w cząsteczce substancji dodatkowej lub całkowitej liczby grup OH w jednostce roztworu na stabilność cieplną  $\alpha$ -amylazy. Wykazano, że większy wpływ miało stężenie i rodzaj zastosowanego związku - w systemach o tej samej zawartości grup OH czas dziesięciokrotnej redukcji różnił się w zależności od zastosowanej substancji.

**Słowa kluczowe:**  $\alpha$ -amylaza, inaktywacja cieplna, dodatki stabilizujące, mannitol, laktitol, sorbitol, glicerol, trehaloza, sacharoza

### Wprowadzenie

Substancje dodatkowe, takie jak cukry i alkohole wielowodorotlenowe, stosuje się w celu zwiększenia stabilności cieplnej enzymów występujących w formie ciekłej. Według Klibanova [6] dodatek tych substancji do wodnych roztworów enzymów wzmacnia hydrofobowe interakcje pomiędzy niepolarnymi grupami aminokwasowymi,

które razem z wiązaniami wodorowymi, interakcjami jonowymi i siłami van der Waalsa odgrywają istotną rolę w utrzymaniu natywnej, katalitycznie aktywnej struktury enzymów.

Combes i wsp. [3] oraz Graber i Combes [4] przedstawiają teorię na temat mechanizmu stabilizacji enzymów ( $\alpha$ -amylazy) przez alkohole wielowodorotlenowe, według której substancje te wchodzą w bezpośrednie interakcje z cząsteczką białka, a w niewielkim stopniu wpływają na stopień organizacji wody. Graber i Combes [4] stwierdzili, że alkohole wielowodorotlenowe są inhibitorami współzawodniczącymi  $\alpha$ -amylazy i ich interakcje z centrum aktywnym enzymu odgrywają decydującą rolę w stabilizacji tego enzymu. Ponadto, efekt stabilizacyjny jest związany z liczbą grup wodorotlenowych w cząsteczce substancji stabilizującej, jako że podobieństwo  $\alpha$ -amylazy do alkoholi wielowodorotlenowych wzrasta wraz ze wzrostem liczby tych grup w cząsteczce.

W dostępnej literaturze sugeruje się, że efekt stabilizujący alkoholi wielowodorotlenowych i cukrów związany jest z liczbą grup OH w cząsteczce danej substancji [2, 4] lub z ogólną liczbą grup OH w danym roztworze [5, 7]. Guiavarc'h i wsp. [5] stwierdzili, że ogólna liczba grup OH w roztworach była związana z ich efektem ochronnym wywieranym na pektynoesterazę, bez względu na rodzaj substancji zapewniającej źródło grup OH. Autorzy stwierdzili, że stabilność cieplna tego enzymu może być przewidywana na podstawie znajomości liczby grup OH w danym systemie [8, 9].

Celem pracy było określenie wpływu substancji dodatkowych: mannitolu, laktitolu, sorbitolu, glicerolu, trehalozy i sacharozy na kinetykę inaktywacji cieplnej  $\alpha$ -amylazy z *Aspergillus oryzae* oraz zbadanie czy efekt stabilizujący związany jest z liczbą grup hydroksylowych występujących w cząsteczkach substancji stabilizujących, czy też z ogólną liczbą tych grup w roztworze.

### **Materiał i metody badań**

Podstawowym materiałem do badań był płynny preparat  $\alpha$ -amylazy z *Aspergillus oryzae* Fungamyl 800L (Novozymes A/S). Aktywność enzymu gwarantowana przez producenta wynosiła 800 FAU/g. 1 FAU (Fungal  $\alpha$ -Amylase Unit) jest to ilość enzymu, która rozkłada 5,26 g suchej substancji skrobi w czasie jednej godziny w warunkach standardowych (pH 4,7; temperatura 37°C).

Kinetykę inaktywacji cieplnej  $\alpha$ -amylazy badano w obecności następujących substancji dodatkowych: mannitolu, laktitolu, sorbitolu, glicerolu, trehalozy i sacharozy. Substancje stabilizujące dodawane były do 20 mM roztworu buforowego Bis-Tris o pH równym 7,0. Ilości dodawanych substancji były dobrane tak, aby zapewnić tę samą liczbę grup OH, ale pochodzących z różnych źródeł. Stosowane stężenia substancji stabilizujących i odpowiadające im liczby grup OH w roztworach przedstawiono w tab. 1.

T a b e l a 1

Stężenia substancji dodatkowych i odpowiadające im liczby grup OH w roztworach.  
Concentrations of additional substances and corresponding number of OH groups.

Liczba grup [OH/cm <sup>3</sup> ] Number of OH groups	Mannitol Mannitol [mg/cm <sup>3</sup> ]	Laktitol Lactitol [mg/cm <sup>3</sup> ]	Sorbitol Sorbitol [mg/cm <sup>3</sup> ]	Glicerol Glycerol [% (v/v)]	Trehaloza Trehalose [mg/cm <sup>3</sup> ]	Sacharoza Sucrose [mg/cm <sup>3</sup> ]
0,198 x 10 <sup>22</sup>	100	-	100	8,1	140	140
0,281 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	-	200	200
0,314 x 10 <sup>22</sup>	-	200	-	13,0	-	-
0,396 x 10 <sup>22</sup>	-	-	200	-	-	-
0,595 x 10 <sup>22</sup>	-	-	300	24,8	420	420
0,725 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	30,0	-	-
0,992 x 10 <sup>22</sup>	-	-	500	41,0	705	-

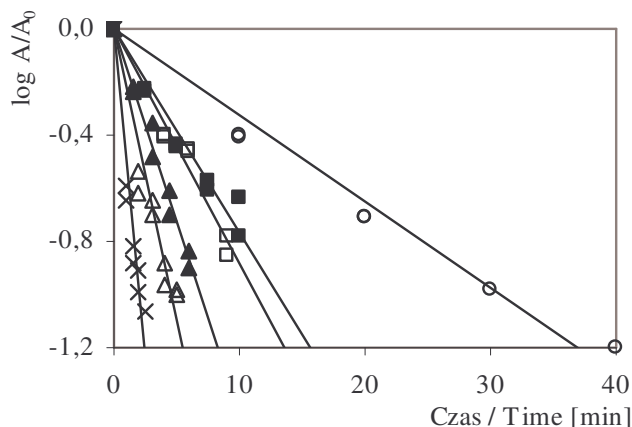
Inaktywację cieplną  $\alpha$ -amylazy (a także w roztworze buforowym bez żadnych dodatków) prowadzono w łaźni wodnej o kontrolowanej temp. 68°C. Temperaturę inaktywacji dobrano uwzględniając wyniki przedstawione przez Samborską i wsp. [10] Kapilary szklane o średnicy 1,15 mm wypełnione badanym roztworem zanurzano w łaźni wodnej na określony czas, po którym przenoszono je do łaźni wodno-lodowej w celu przerwania inaktywacji cieplnej.

Do opisu inaktywacji enzymów zastosowano model czasu śmierci cieplnej (Thermal Death Time) [1], z którego wyprowadza się parametr kinetyczny  $D$ , nazywany czasem dziesięciokrotnej redukcji, definiowany jako czas potrzebny, w danej temperaturze, do zmniejszenia aktywności enzymu o 90% (równanie 1).

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right) = -\frac{1}{D} \cdot t \quad (1)$$

## Wyniki i dyskusja

Kinetyka inaktywacji  $\alpha$ -amylazy w 20 mM roztworze buforowym Bis-Tris oraz w tym roztworze z dodatkami alkoholi wielowodorotlenowych i cukrów mogła być ściśle opisana modelem czasu śmierci cieplnej. Świadczy o tym linearność zależności  $\log A/A_0$  od czasu. Na rys. 1. przedstawiono przykładowy wykres kinetyki inaktywacji  $\alpha$ -amylazy w roztworach o różnym stężeniu glicerolu. Czas dziesięciokrotnej redukcji aktywności  $\alpha$ -amylazy  $D$  w temp. 68°C we wszystkich roztworach o różnej zawartości dodatków stabilizujących przedstawiono w tab. 2.



Rys. 1. Kinetyka inaktywacji  $\alpha$ -amylazy w temp. 68°C w roztworze buforowym 20 mM Bis-Tris (×) oraz z dodatkiem glicerolu [% v/v]: 8,1 (△), 13,0 (▲), 24,8 (□), 30,0 (■), 41,0 (○)

Fig. 1. Isothermal inactivation of  $\alpha$ -amylase at 68°C in 20 mM Bis-Tris buffer (×) and with addition of glycerol [% v/v]: 8,1 (△), 13,0 (▲), 24,8 (□), 30,0 (■), 41,0 (○)

Tabela 2

Czas dziesięciokrotnej redukcji (D) inaktywacji cieplnej  $\alpha$ -amylazy w temp. 68°C w 20 mM roztworze buforowym Bis-Tris oraz z dodatkami substancji stabilizujących.

Decimal reduction time (D) for  $\alpha$ -amylase isothermal inactivation at 68°C in 20 mM Bis-Tris buffer and with addition of stabilizing compounds.

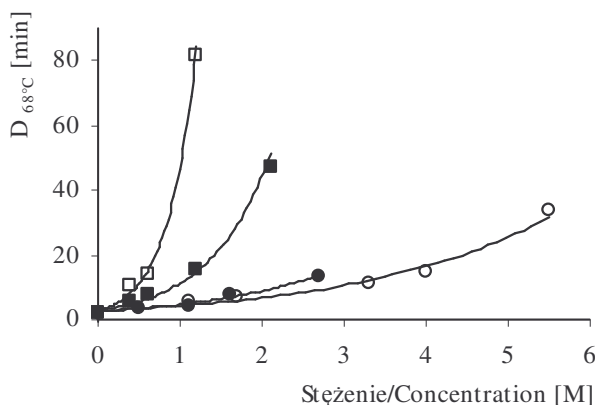
Liczba grup OH/cm <sup>3</sup> * Number of OH groups*	20 mM Bis-Tris, pH 7,0	20 mM Bis-Tris, pH 7,0 z dodatkiem / with addition of:					
		mannitolu mannitol	laktitolu lactitol	sorbitolu sorbitol	glicerolu glycerol	trehalozy trehalose	sacharozy sucrose
		<i>D</i> <sub>68°C</sub> [min]					
0	2,4 ± 0,2	-	-	-	-	-	-
0,198 x 10 <sup>22</sup>	-	3,1 ± 0,2	-	3,8 ± 0,2	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,7	10,2 ± 0,4
0,281 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	-	-	7,5 ± 0,5	14,2 ± 0,4
0,314 x 10 <sup>22</sup>	-		4,2 ± 0,3	-	6,9 ± 0,4	-	-
0,396 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	4,5 ± 0,2	-	-	-
0,595 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	7,9 ± 0,4	11,4 ± 1,0	15,4 ± 0,9	81,3 ± 1,5
0,725 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	-	14,5 ± 1,2	-	-
0,992 x 10 <sup>22</sup>	-	-	-	13,2 ± 0,7	33,7 ± 1,8	47,4 ± 4,1	-

\* Stężenia roztworów podano w tab. 1. / \*Concentrations as presented in Tab. 1.

Zastosowane dodatki we wszystkich stężeniach spowodowały wydłużenie czasu dziesięciokrotnej redukcji, co świadczy o ich działaniu stabilizującym na enzym. Zauważalne były różnice efektywności stabilizacji w zależności od rodzaju związku

oraz jego stężenia. W przypadku mannitolu i laktitolu wzrost wartości  $D$  w stosunku do roztworu buforowego były niewielkie. Zastosowanie sorbitolu, glicerolu i trehalozy, zwłaszcza w wyższych stężeniach, spowodowało większy wzrost stabilności enzymu. Najbardziej skutecznym dodatkiem stabilizującym okazała się sacharoza. Zastosowanie 1,2 M roztworu ( $420 \text{ mg/cm}^3$ ) pozwoliło na uzyskanie ponad trzydziestokrotnego wzrostu czasu dziesięciokrotnej redukcji w porównaniu z roztworem buforowym bez żadnych dodatków. Na podstawie wzrastających właściwości ochronnych zastosowanych związków można je uszeregować następująco: mannitol < laktitol < sorbitol < glicerol < trehaloza < sacharoza. Zastosowane cukrów było bardziej korzystne niż alkoholi wielowodorotlenowych.

Pozytywny wpływ zastosowanych dodatków na odporność cieplną  $\alpha$ -amylazy zwiększał się wraz ze wzrostem ich stężenia. Zwiększenie to, w badanym zakresie stężeń, miało charakter wykładniczy o współczynniku determinacji  $R^2$  od 0,97 do 0,99. Wpływ stężenia dodatków stabilizujących na czas dziesięciokrotnej redukcji  $D$  w temp.  $68^\circ\text{C}$  przedstawiono na rys. 2. Podobną zależność między stężeniem sorbitolu a „efektem ochronnym” wywieranym na  $\alpha$ -amylazę z *Aspergillus oryzae* podali wcześniej Graber i Combes [4].



Rys. 2. Wpływ stężenia (M) sorbitolu (●), glicerolu (○), trehalozy (■) i sacharozy (□) na czas dziesięciokrotnej redukcji  $D$  [min] w temp.  $68^\circ\text{C}$ .

Fig. 2. The influence of concentration of sorbitol (●), glycerol (○), trehalose (■) and sucrose (□) on the decimal reduction time  $D$  [min] at  $68^\circ\text{C}$ .

Wielu autorów rozważa wpływ liczby grup OH na stabilność cieplną enzymów. Sugeruje się, że efekt stabilizujący alkoholi wielowodorotlenowych i cukrów związany jest z liczbą grup OH w cząsteczce danej substancji [2, 4] lub z ogólną liczbą grup OH w danym roztworze [5, 7]. Na podstawie pierwszej z cytowanych hipotez (liczba grup OH w cząsteczce substancji stabilizującej) należałoby spodziewać się następującego uszeregowania substancji zastosowanych w bieżącej pracy pod względem ich wzrastającego wpływu ochronnego: glicerol ( $3^*\text{OH}$ ) < mannitol, sorbitol, ( $6^*\text{OH}$ ) < trehaloza, sacharoza ( $8^*\text{OH}$ ) < laktitol ( $9^*\text{OH}$ ). Jednakże otrzymane wyniki

nie potwierdzają powyższej hipotezy. Laktitol, który ma największą liczbę grup OH w cząsteczce spośród zastosowanych substancji, wykazał mniejszy wpływ na czas dziesięciokrotnej redukcji  $D$  niż inne związki. Również efekt ochronny substancji o tej samej liczbie grup OH w cząsteczce (sacharoza, trehaloza) był zróżnicowany.

W przypadku drugiej z cytowanych hipotez – o wpływie ogólnej liczby grup OH w danym roztworze – w tab. 2. przedstawiono czas dziesięciokrotnej redukcji  $D$  uzyskany po zastosowaniu różnych stężeń dodatków w odniesieniu do ogólnej liczby grup OH w danym roztworze. Można zauważyć, że w systemach o tej samej zawartości grup OH wartość  $D$  różniła się w zależności od źródła tych grup. Ogólna liczba grup OH w danym roztworze nie jest więc czynnikiem decydującym o stabilności cieplnej  $\alpha$ -amylazy. Bardziej istotny jest rodzaj zastosowanej substancji. Istnienie zależności między ogólną liczbą grup OH w roztworze a otrzymaną wartością  $D$  podczas badania wpływu substancji dodatkowych (takich samych jak w bieżącej pracy) na kinetykę inaktywacji cieplnej pektynoesterazy (PME) wyekstrahowanej z pomidorów, stwierdzili Guiavarc'h i wsp. [5]. Ogólna liczba grup OH w roztworach była związana z ich efektem ochronnym, bez względu na rodzaj substancji zapewniającej źródło grup OH. Autorzy stwierdzili, że stabilność cieplna PME może być przewidywana na podstawie znajomości liczby grup OH w danym systemie.

### Wnioski

1. Kinetyka inaktywacji cieplnej  $\alpha$ -amylazy w roztworach z dodatkami substancji stabilizujących może być opisana modelem czasu śmierci cieplnej.
2. Wszystkie zastosowane alkohole wielowodorotlenowe oraz dwucukry wpływały na zwiększenie stabilności cieplnej  $\alpha$ -amylazy.
3. Efekt stabilizujący nie zależy od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce zastosowanego związku ani od ogólnej liczby tych grup w roztworze, lecz od rodzaju i stężenia substancji dodatkowej, wykazując znacznie większy wpływ na stabilność  $\alpha$ -amylazy w przypadku dwucukrów niż w przypadku alkoholi wielowodorotlenowych.
4. Najlepszymi właściwościami ochronnymi (z zastosowanych związków) charakteryzuje się sacharoza.

*Praca była prezentowana na XI Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Warszawa, 24–25 maja 2006.*

### Literatura

- [1] Bigelow W.D.: The logarithmic nature of thermal death time curves. J. Infect. Dis., 1921, **29** (5), 528-536.
- [2] Busto M.D., Apenten R.K., Robinson D.S., Wu Z.: Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. Food Chem., 1999, **65**, 323-329.

- [3] Combes D., Auzanneau I., Zwick A.: Thermal stability of enzymes: influence of solvation medium (a Raman spectroscopy study). In: Stability and stabilisation of enzymes (eds. WJJ Van den Tweel, A Harder, RM Buitelaar). Elsevier, Maastricht 1992, pp. 29-36.
- [4] Graber M., Combes D.: Effect of polyols on fungal alpha-amylase thermostability. Enzyme Microb. Technol., 1989, **11**, 673-677.
- [5] Guiavarc'h Y.P., Sila D., Duvetter T., Van Loey A., Hendrickx M.: Influence of sugars and polyols on the thermal stability of purified tomato and cucumber pectinmethylesterases: a basis for TTI development. Enzyme Microb. Technol., 2003, **33**, 544-555.
- [6] Klivanov A.M.: Thermostabilisation of enzymes. Adv. App. Microbiol., 1983, **29**, 1-29.
- [7] Noel M., Combes D.: Rhizomucor miehei lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. Enzyme Microb. Technol., 2003, **33**, 299-308.
- [8] Samborska K. Wpływ suszenia rozpyłowego na degradację preparatu  $\alpha$ -amylazy z *Aspergillus oryzae*. Praca doktorska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa 2004.
- [9] Samborska K, Guiavarc'h Y, van Loey A, Hendrickx M. The thermal stability of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase in presence of sugars and polyols. J. Food Process Eng., 2006, **29**, 287-303.
- [10] Samborska K, Guiavarc'h Y, van Loey A, Hendrickx M. The influence of moisture content on the thermostability of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase. Enzyme and Microbial Technology, 2005, **37**, 167-174.

#### THE INFLUENCE OF STABILISING ADDITIVES ON THE THERMAL INACTIVATION KINETICS OF *ASPERGILLUS ORYZAE* ALPHA-AMYLASE

##### S u m m a r y

The aim of this study was to investigate the thermal stability of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase in presence of different sugars (sucrose and trehalose) and polyols (mannitol, sorbitol, lactitol and glycerol). Additional hypothesis was tested – if it is possible to estimate the heat stability of the enzyme based on the amount of hydroxyl (OH) groups provided in a buffer solution (by different compounds).

Additives used in all concentrations caused the extension of the decimal reduction time of enzyme activity at 68°C and shows its stabilizing treatment on enzyme. The differences of effectiveness of stabilization were observed on dependence of the type of substance and its concentration. The usage of saccharides was more profitable than usage of multi hydroxyl alcohol, but the most effective additive was sucrose.

Stabilizing compounds can be classified, in terms of their protective effect on  $\alpha$ -amylase heat stability, as follows: mannitol < lactitol < sorbitol < glycerol < trehalose < sucrose, sugars being more favorable than polyols. Among all stabilising compounds investigated, sucrose exhibited the largest protective effect. The number of hydroxyl groups per molecule and the total amount of hydroxyl groups provided by additives to the system were not correlated with the heat stability of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. The source of OH groups was found to be more important, sugars (especially sucrose) being more effective than polyols for similar number of OH groups.

**Key words:** thermal inactivation, protective additives, mannitol, lactitol, sorbitol, glycerol, trehalose, sucrose ☒