

Amylolytické systémy kvasinek

664.2
663.13

RNDr. BLANKA JANDEROVÁ CSc., RNDr. FRANTIŠEK PŮTA, RNDr. PhMr. OLGA BENDOVIČOVÁ, DrSc., přírodovědecká fakulta UK, Praha

Klíčová slova: *kvasinky, štěpení škrobu, α -amylasa, glukoamylasa, STA geny*

Zvýšený zájem o kvasinky produkující amylolytické enzymy, který se projevuje v poslední době, je vyvoláván snahou o jejich využití při zpracování různých obnovitelných, zpravidla odpadních, škrobnatých substrátů a to zejména k produkci biomasy a výrobě ethanolu. Také v pivovarství by s výhodou mohly být využívány

kvasinkové kmeny, které by byly schopny štěpit dextriny.

Z taxonomického hlediska je za důkaz schopnosti utlizovat škrob považován růst kvasinky v přítomnosti škrobu jako jediného zdroje uhlíku. Na základě tohoto testu řadí *Lodderová* ve své taxonomii přes 100 druhů

kvasinek mezi škrobem využívající [1]. Růst kvasinky však může vyplývat z utilizace endogenních zdrojů energie nebo stopových příměsí jiného zdroje uhlíku. Proto se při testování kvasinek s cílem jejich využití v průmyslu používá průkaznějších metod: sledování schopnosti snižovat množství škrobu v kultivačním médiu, ztekucovat gel obsahující amylosu, uvolňovat glukosu ze škrobu nebo štěpit pullulan, tj. polymer maltotriosových jednotek spojených α -1,6 vazbami. Tak lze prokázat produkci amylolytických enzymů. Kvasinky různých druhů produkují následující enzymy: α -amylasu [1,4- α -D-glukan glukanohydrolasa — E.C.3.2.1.1], která náhodně endogenně hydrolyzuje α -1,4vazby škrobu, neštěpí α -1,6vazby (uvolňuje tedy oligosacharidy o různém počtu glukosových jednotek), postupně vzniká směs maltosy a dextrinů, gluukoamylasu [1,4- α -D-glukan glukosohydrolasa — E.C.3.2.1.2.3], která exogenním štěpením α -1,4vazby odštěpuje glukosové zbytky z neredukujících konců škrobu, obvykle štěpí i α -1,6vazby, vzniká směs glukosy a dextrinů a tzv. odvětvující enzymy, které štěpí α -1,6vazby, produktem jsou lineární polysacharidy. Hydrolýza škrobu probíhá vně buňky, zúčastněné enzymy jsou produkovány extracelulárně a ve většině případů jsou uvolňovány do média. U některých kvasinek však zůstává enzymová aktivita vázána na buňku [např. u *Lipomyces starkey* nebo *Torulopsis ingeniosa* [2].

Testování rozsáhlých souborů kvasinek ukázalo, že druhů kvasinek, které štěpí škrob rychle a kompletně, je velmi málo. Některé kvasinky v médiu se škrobem sice rostou, ale k prokazatelné hydrolýze škrobu nedochází; jiné degradují škrob pouze pomalu a částečně. Kompletní hydrolýza škrobu byla zjištěna pouze u 17 ze 119 testovaných druhů kvasinek [3, 4]. K obdobným zjištěním dospěli i další autoři [5, 6].

Kvasinkami, vykazujícími nejúčinnější zpracování škrobu jsou z askogenních kvasinek především *Schwanniomyces occidentalis* a další zástupci tohoto rodu, uváděni dříve jako samostatné druhy (*Sch. alluvius* a *Sch. castellii*), některé druhy rodu *Endomycopsis* — *E. capsularis*, *E. fibuligera* a rodu *Lipomyces* — *L. starkey*, *L. kononenkoae* a *L. traspurpurea*, ze skupiny neaskogenních kvasinek pak např. *Leucosporidium capsuligenum*, *Filobasidium capsuligenum*, *Candida silvanorum*, *C. homilientoma*, *C. tsukubaensis*, *Cryptococcus flavus*, *Torulopsis ingeniosa* [3, 4].

Z hlediska amylolytických schopností jsou dosud nejpodrobněji prostudovány druhy rodů *Schwanniomyces*, *Endomycopsis*, *Lipomyces* a *Saccharomyces diastaticus*. Důvody jsou zřejmé. *S. diastaticus* je jedinou kvasinkou rodu *Saccharomyces* schopnou, i když málo účinně, štěpit škrob. Další rody patří mezi kvasinky štěpící škrob dobře.

Schwanniomyces alluvius produkuje α -amylasu, gluukoamylasu a vykazuje i slabou odvětvující aktivitu [7]. Specifický odvětvující enzym však zřejmě neprodukuje, spíše jde o α -1,6aktivitu gluukoamylasy [8]. Tvoří zřejmě 2 typy gluukoamylasy, lišící se molekulovou hmotností [9]. Během exponenciální fáze růstu jsou enzymy produkovány pouze v malém množství, které však stačí velmi rychle rozštěpit škrob. Zvýšená syntéza enzymů nastává až na konci exponenciální fáze, aktivita enzymů je proto maximální ve stacionární fázi růstu. Enzymy jsou produkovány pouze za aerobních podmínek [10, 11]. α -amylasa má optimum aktivity při pH 6,3, teplotní optimum při 40 °C, gluukoamylasa má optima při pH 4,5 a teplotě 50 °C [7]. Oba enzymy jsou termolabilní, jsou inaktivovány pasterací při 60 °C během 5 minut [10]. U *Sch. castellii* a *Sch. occidentalis* byla zjištěna rovněž produkce α -amylasy, 2 typů gluukoamylasy a odvětvující aktivita. Teplotní i pH optima, termolabilita i podmínky jejich produkce jsou obdobné jako u *Sch. alluvius* [12, 13, 14, 15]. Nedávno byly ze *Sch. occidentalis* izolovány a do *S. cerevisiae* přeneseny geny AMY1 a GAM1 pro α -amylasu a gluukoamylasu. Zatímco exprese genu AMY1 probíhala z vlastního promotoru, exprese genu GAM1 bylo nutno zajistit vložení za promotor *S. cerevisiae* [36].

Extracelulární amylolytický systém *Endomycopsis fibuligera* je tvořen rovněž α -amylasou a gluukoamylasou. Dominantním enzymem je α -amylasa, která produkuje

oligosacharidy — substrát pro gluukoamylasu. Enzymový systém je schopen štěpit i nativní škrob, k jehož štěpení se váže. Gluukoamylasa vykazuje vysokou odvětvující aktivitu [16, 17]. Oba enzymy podléhají glukosové represi [17].

Oba geny — gen pro gluukoamylasu i gen pro α -amylasu — byly izolovány a analyzovány restriční mapováním. Byly získány z plasmidů izolovaných z klonů *Saccharomyces cerevisiae*, které po transformaci genomovou bankou připravenou z chromosomální DNA *E. fibuligera* získaly schopnost štěpit škrob. Z plasmidu pSfGlu1 byla extracelulárně produkována gluukoamylasa s teplotním optimem totožným (50 °C) a pH optimem blízkým optimu pro gluukoamylasu *E. fibuligera* (pH 5,8 u *E. fibuligera*, pH 6,0 u enzymu produkovaného *S. cerevisiae* — [18]. Z plasmidu pSf2 byla opět vně buňky produkována α -amylasa (teplotní optimum stejné jako u *E. fibuligera*, tj. 40 °C, pH optimum poněkud nižší než u *E. fibuligera* — 5,5 proti 5,9 — [19]. U genu pro gluukoamylasu byla zjištěna sekvence nukleotidů. Její porovnání s nukleotidovými sekvencemi genů pro gluukoamylasu ze *Saccharomyces diastaticus*, *Rhizopus oryzae* a *Aspergillus niger* ukázalo na přítomnost pěti vysoce homogenních úseků [20].

Lipomyces kononenkoae produkuje α -amylasu, gluukoamylasu a vykazuje odvětvující aktivitu [21]. Aktivita enzymů stoupá během exponenciální fáze růstu. Optima pH a teploty jsou podobná jako u předcházejících druhů kvasinek — pH 5,5 a teplota 40 °C pro α -amylasu, pH 4,6 a 50 °C pro gluukoamylasu [22]. U *Lipomyces starkey* 1807 byla zjištěna pouze produkce α -amylasy, která zůstává vázána ke stěně buňky [2], jiný kmen 1809 však uvolňuje do média α -amylasu a α -glukosidasu (štěpí krátké oligosacharidy). α -amylasa má vysoké teplotní optimum — 70 °C a nízké optimum pH 4,0. Příslušné geny nebyly dosud identifikovány.

Saccharomyces diastaticus produkuje extracelulární gluukoamylasu neschopnou štěpit α -1,6vazby [23]. Enzym se tvoří hlavně na konci exponenciální fáze a ve stacionární fázi růstu [24]. Produkce podléhá katabolické represi a je ovlivňována i konstitucí genů pro párovací typ [25, 26]. Teplotní optimum enzymu je při 50 °C, pH optimum při pH 5,4 [27]. Za produkci enzymu jsou odpovědné nealelické geny STA 1, STA 2 a STA 3 [29, 30]. Tyto geny byly izolovány, klonovány a určena jejich restriční mapa [31, 32, 33, 34]. Všechny vykazují značný stupeň homologie a je možné, že vznikly z téhož výchozího genu. V genomu *S. cerevisiae* existují nukleotidové sekvence homologní k některým úsekům STA genů [31, 32, 33]. Jednou z těchto sekvencí je zřejmě gen pro intracelulární gluukoamylasu, která je produkována u *S. cerevisiae* při sporulaci. Gen pro extracelulární enzym u *S. diastaticus* pravděpodobně vznikl spojením této oblasti s dalšími jednou či dvěma sekvencemi [18]. Gen STA 1 byl dokonce kompletně sekvencován [28] a na základě výsledku byl navržen model terciární struktury enzymu. Aminokyselinové složení izolované gluukoamylasy skutečně odpovídá složení předpovězenému na základě sekvencí analýzy [35].

Literatura

- [1] LODDER, J.: The yeasts. A taxonomic study. North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London, 1970.
- [2] MOULIN, G., GALZY, P.: Agric. Biol. Chem., **43**, 1979, s. 1165.
- [3] DE MOT, R., ANDRIES, K., VERACHTERT, H.: System. Appl. Microbiol., **5**, 1984, s. 106.
- [4] DE MOT, R., DEMEERSMAN, M., VERACHTERT, H.: System. Appl. Microbiol., **5**, 1984, s. 421.
- [5] SPENCER-MARTINS, I., VAN UDEN, N.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **13**, 1977, s. 24.
- [6] AUGUSTYN, J., ZEMEK, I., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., KUNIAK, L.: Folia Microbiol., **23**, 1978, s. 353.
- [7] SIMOES-MENDES, B.: Can. J. Microbiol., **30**, 1984, s. 1163.
- [8] DE MOT, R., VAN OUDENDIJK, E., VERACHTERT, H.: Biotechnol. Lett., **6**, 1984, s. 581.
- [9] MORANELLI et al., Fourth Bioenergy Research and Development Symp., Winnipeg, Man. Canada, 1982 in DHAWALE, M. R., INGLEDEW, W. M.: Biotechnol. Lett., **5**, 1983, s. 825.
- [10] CALLEJA, G. B., LEVY-RICK, S., MORANELLI, F., NASIM, A.: Plant Cell Physiol., **25**, 1984, s. 757.
- [11] LUSENA, C. V., CHAMPAGNE, C. C., CALLEJA, G. B.: Can. J. Biochem. Cell Biol., **63**, 1985, s. 366.

- [12] SILLS, A. M., SAUDER, M. E., STEWART, G. G.: J. Inst. Brew., **90**, 1984, s. 311.
- [13] OTENG-GYANG, K., MOULIN, G., GALZY, P.: Zeitschr. Allgem. Microbiol., **21**, 1981, s. 537.
- [14] VAN DER SPIEGLE, K., ISERENTANT, D. I.: VI. Symp. Internat. sur Levures, Montpellier, 1984, s. IX-4-P.
- [15] MALFAIT, M., MOULIN, G., GALZY, P.: J. Ferment. Technol., **64**, 1986, s. 279.
- [16] UEDA, S., SAHA, B. CH.: Enzyme Microb. Technol., **5**, 1983, s. 196.
- [17] STEVENSON, E. M., KORUS, R. A., ADMASSU, W., HEIMSCH, R. C.: Enzyme Microb. Technol., **6**, 1984, s. 549.
- [18] YAMASHITA, I., ITOH, T., FUKUI, S.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **23**, 1985, s. 130.
- [19] YAMASHITA, I., ITOH, T., FUKUI, S.: Agric. Biol. Chem., **49**, 1985, s. 3089.
- [20] ITOH, T., OHTSUKI, I., YAMASHITA, I., FUKUI, S.: J. Bacteriol., **169**, 1987 s. 4171.
- [21] SPENCER - MARTINS, I., VAN UDEN, N.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **6**, 1979, s. 241.
- [22] ESTRELA, A. I., LEMOS, M., SPENCER - MARTINS, I.: J. Appl. Bacteriol., **52**, 1982, s. 465.
- [23] HOPKINS, R. H.: Proc. EBC, Baden-Baden, Elsevier, Amsterdam, 1955, s. 52.
- [24] SEARLE, B. A., TUBB, R. S.: FEMS Microbiol. Lett., **111**, 1981, s. 211.
- [25] YAMASHITA, I., MARUYAMA, T., FUKUHARA, K., SUZUKI, K., MAEMURA, T., FUKUI, S.: Abstract of papers, Annual Meeting of Agric. Chem. Soc. Japan, 1983, s. 352.
- [26] PRETORIUS, I. S., MODENA, D., VANONI, M., ENGLAND, S., MARMUR, J.: Molec. Cell. Biol., **6**, 1986, s. 3034.
- [27] ERRATT, J. A., STEWART, G. G.: Current Development in Yeast Research, Ed. Stewart, G. G., Russell, I., Pergamon Press, 1981, s. 177.
- [28] YAMASHITA, I., SUZUKI, K., FUKUI, S.: J. Bacteriol., **161**, 1985, s. 567.
- [29] TAMAKI, H.: Mol. Gen. Genet., **164**, 1978, s. 205.
- [30] PANCHAL, C. J., STEWART, G. G.: The Brew. Digest, 1979, s. 36.
- [31] YAMASHITA, I., MAEMURA, T., HATANNO, T., FUKUI, S.: J. Bacteriol., **161**, 1985, s. 574.
- [32] PRETORIUS, I. S., CHOW, T., MODENA, D., MARMUR, J.: Mol. Gen. Genet., **203**, 1986, s. 29.
- [33] MEADEN, P., OGDEN, K., BUSSEY, H., TUBB, R. S.: Gene, **34**, 1985, s. 325.
- [34] PARDO J. M., POLAINA, J., JIMENEZ, A.: Nucl. Acid Res., **14**, 1986, s. 4701.
- [35] YAMASHITA, I., SUZUKI, K., FUKUI, S.: Agric. Biol. Chem., **50**, 1986, s. 475.

- [36] DOHMEN, R. J., STRASSER, A. W. M., DAHLEMS, U. M., SEEBOTH, P. G., HOLLENBERG, C. P.: Yeast 4 — Special issue, 1988, s. S 145.

Lektoroval Ing. Jan Káš, DrSc.

Janderová, B. - Půta, F. - Bendová, O.: Amylolytické systémy kvasinek. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 5, s. 147—149.

Článek podává přehled o kvasinkách schopných kompletně štěpit škrob, uvádí vlastnosti amylytických systémů několika rodů kvasinek a současný stav znalostí o genetické determinaci příslušných enzymů.

Яндерова, Б. - Пута, Ф. - Бендова, О.: Амилолитические системы дрожжей. Квас. прум., **35**, 1989, № 5, стр. 147—149.

Статья приводит обзор по дрожжам, способным комплексно расщеплять крахмал, приводит свойства амилолитических систем нескольких видов дрожжей и описывает современное состояние познания по генетической детерминации соответствующих энзимов.

Janderová, B. - Půta, F. - Bendová, O.: Amylolytic Systems of Yeasts. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 5, pp 147—149.

A review on the yeasts that are able of a complete starch degradation including properties of amylytic systems of some yeast strains and the uptodate state of knowledges on a genetic determinations of the enzymes are discussed in the article.

Janderová, B. - Půta, F. - Bendová, O.: Amylolytische Systeme der Hefe. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 5, s. 147—149.

Der Artikel bietet eine Übersicht der Hefe, die Stärke komplett spalten kann, und gibt die Eigenschaften der amylytischen Systeme einiger Hefestämme und den gegenwärtigen Stand der Kenntnisse der genetischen Determination der entsprechenden Enzyme an.