Wpływ taniny na aktywność tanazy w niektórych szczepach grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*

*The effect of tannin on tannase activity in some strains of fungi from the genus *Penicillium* and *Aspergillus**

L. BADURA, W. MEJBAUM-KÄTZENELLENBOGEN, J. WIŚNIEWSKA

WSTĘP

Badania dotyczące enzymatycznej degradacji tanin sięgają 1786 r. gdy Scheele zaobserwował wzrost niektórych grzybów na galasówkach. Van Tieghem (1867) zaobserwował rozkład taniny do kwasu galusowego i glukozy pod wpływem działania grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*. Knudson (1913a) wykazał, że kilkanaście przebadanych szczepów produkuje ten enzym tylko w obecności taniny w podłożu. W ściółkach leśnych obok lignin, celulozy, białek, występują w mniejszych lub większych ilościach garbniki. Ze względu na swe specyficznie toksyczne właściwości ulegają one wolniejszemu utlenianiu w procesie mineralizacji niż inne łatwo strawialne związki organiczne. Główną rolę w tym procesie, jak się przypuszcza, odgrywają grzyby. W Katedrze Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego do oznaczania aktywności tanazy opracowano turbidymetryczną mikrometodę, w której wykorzystano charakterystyczną dla garbników zdolność strącania białek. W tej pracy postawiono sobie za cel przebadanie niektórych gatunków z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* wyizolowanych bezpośrednio z gleby i ściółki boru sosnowego, fitosocjologicznie należącego do zespołu *Leucobryon-Pinetum* Matuszkiewicz (1962).

MATERIAŁ I METODY

Wyizolowano 13 szczepów grzybów z gleby rezerwatu Blok, pod względem fitosocjologicznym zaliczonym do zespołu *Leucobryo-Pinetum* Matuszkiewicz (1962):

Aspergillus niger v. Tieghem, *Aspergillus versicolor* (Vuill) Tiraboschi, *Aspergillus flavus* Link, *Penicillium claviforme* Bainier, *Penicillium frequentans* Westling, *Penicillium brevi-compactum* Dierckx, *Penicillium thomi* Maire, *Penicillium variabile* Sopp, *Penicillium granulatum* Bainier, *Penicillium spinulosum* Thom, *Penicillium nigricans* Bainier, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Penicillium notatum* Westling.

Tabela 1

Wpływ taniny w pożywce na wzrost grzybní i aktywność tanazy
The tannin effect on the growth of mycelium and tannase activity

Lp. No	Grupa Group	Rodzaj i gatunek Genus and strains	Częstość występowania Frequency of distribution	% taniny w pożywce % of tannin in culture medium	Proszek acetonowy grzybni Acetone powder of mycelium				Pożywka Medium		Proszek acetonowy całej grzybni Acetone powder of total mycelium		
					białko protein	tanaza tannase		aktywność właściwa specific activity	białko protein mg/ 100 ml mg/ 100 cc	tanaza tanna- se jedn./ 100 ml unit/ 100 cc	g	%	
						mg/ 100 mg	jedn./ 100 mg unit/ 100 mg						%
1		<i>Penicillium notatum</i>	+++	0,0	3,83	0,67	62	0,18	15,5	0,0	0,73	190	
2		<i>Penicillium thomii</i>	+	2,0	2,37	4,37	650	1,9	—	—	1,38	190	
3		<i>Penicillium nigrkans</i>	+++	0,0	4,47	0,33	169	0,08	0,5	0,0	1,04	192	
4		<i>Penicillium brevi-compactum</i>	+++	2,0	3,35	0,51	609	0,15	—	—	2,0	192	
5	I	<i>Penicillium variable</i>	+++	0,0	2,05	1,0	357	0,5	1,8	0,0	1,25	110	
6		<i>Penicillium frequentans</i>	+++	2,0	2,42	6,09	931	2,54	—	—	1,38	144	
7		<i>Penicillium spinulosum</i>	+++	0,0	1,85	0,42	—	0,24	0,5	0,0	0,65	144	
			+++	2,0	3,55	1,5	—	0,44	—	—	0,94	144	
			+++	0,0	2,0	0,8	—	0,4	0,5	6,1	1,1	136	
			+++	2,0	7,73	7,45	—	0,97	—	—	1,5	136	
			+++	0,0	1,52	2,9	—	1,93	0,5	3,3	0,95	126	
			+++	2,0	1,8	5,54	—	3,08	—	—	1,18	126	
			+++	0,0	1,83	1,26	—	0,70	0,5	2,1	1,76	74	
			+++	2,0	3,34	3,53	280	1,07	—	—	1,3	74	

8	<i>Penicillium chrysogenum</i>	++	0,0	1,81	2,2	120	1,23	52	2,0	1,5	0,82	133
9	<i>Aspergillus niger</i>	+	2,0 0,0 2,0	3,89 0,27 0,73	2,44 0,32 2,76	209	0,64 1,21 3,8	52 323	— 2,7 —	— 1,8 —	1,09 0,7 0,97	133 140
10	<i>Aspergillus versicolor</i>	+++	0,0	4,0	2,4		0,6		2,1	2,5	1,2	
11	<i>Penicillium granulatum</i>	++	2,0	0,0	0,0	0	0,0	0	—	—	0,0	0,0
12	<i>Penicillium claviforme</i>	+++	2,0	0,0	3,8	0	2,0	0	0,5	0,0	0,44	0,0
13	<i>Aspergillus flavus</i>	+	0,0 2,0 0,0 2,0	1,98 0,0 3,08 0,0	0,0 0,0 0,0 0,0	0	0,0 0,0 0,0 0,0	0	1,0 — 0,5 —	0,0 — 0,0 —	0,1 0,0 0,17 0,0	0,0 0,0 0,0 0,0

++ rzadki — very rare +++ częsty — frequent
 ++++ rzadki — rare +++++ bardzo częsty — very frequent

Hodowano je na pożywkach płynnych Czapka bez taniny i z dodatkiem 2 % taniny przez 14 dni w temp. pokojowej. Na litr pożywki dodawano 1 ml mikroelementów wg Hoaglanda, doprowadzono do pH 5, rozlewano do kolbek po 100 ml i sterylizowano w autoklawie 15 min. w 1 atm. Grzybnię traktowano trzykrotnie zimnym acetonem (każdorazowo po 30 ml), rozcierano w moździerzu, a następnie sporządzano wyciąg chlorkowy dodając do 100 mg proszku acetonowego 1 ml 0,2 % NaCl, homogenizowano 3 min. w szklanym homogenizatorze Pottera, homogenat pozostawiano na okres 12 godzin w około 5°C, po czym wirowano 20 min. przy 5 tys. obrotów; osad odrzucano a płynny znad osadu służyły do badań.

Białko oznaczano turbidymetryczną mikrometodą (W. Mejbaum-Katzenellenbogen (1955)).

Mikrometoda oznaczania garbników*. Sporządzono krzywą standardową dla galotaniny w następujący sposób: 500 mg galotaniny rozpuszczono w 0,1 M buforze octanowym o pH 5 w kolbie miarowej na 100 ml. Macierzysty roztwór rozcieńczono buforem octanowym o pH 5 tak, aby w 1 ml znajdowało się od 200 do 400 µg taniny. Próby wykonywano następująco: Do 0,5 ml roztworu taniny dodawano 1 ml 2 % fenolu w 1 N HCl, ogrzewano w łaźni wodnej do 30° następnie odmierzano 0,5 ml 0,08 % odczynnika żelatynowego ogrzanego również do 30°; po 10 minutach inkubacji powstałe zmętnienie stabilizowano 2 ml 0,1 % gumy arabskiej. Ekstynkję odczytywano w fotometrze Pulfricha przy filtrze S-66 wobec próby ślepej. Zmętnienie nie zmienia się przez 30 minut. Krzywą wzorcową przedstawiono na wykresie 1. Odczynnik żelatynowy zawiera 400 mg żelatyny w 100 ml 0,9 % NaCl. Przed użyciem odczynnik rozcieńczono 5-krotnie.

Oznaczanie aktywności tanazowej w wyciągach chlorkowych grzybni. Do 0,4 ml roztworu substratu, zawierającego 200 µg taniny dodawano 0,1 ml wyciągu, próby mieszano i pozostawiano na okres 60 minut w 30° w łaźni wodnej. Po tym czasie reakcję przerywano dodając 1 ml 2 % fenolu w 1 N HCl i dalej postępowano jak w wyżej opisanej metodzie oznaczania taniny. W próbie kontrolnej zmieniano kolejność dodawania kwasu i enzymu. Różnica ekstynkji w próbie kontrolnej i badanej odpowiada ilości rozłożonej taniny.

Odczynniki. Żelatyna firmy Gröbler, służyła jako standard do oznaczania białka mikrometodą taninową. Żelatynę firmy Difco używano do sporządzania odczynnika żelatynowego, do oznaczania garbników. Preparaty suszono i przechowywano w eksykatorze próżniowym. Tanina import z ZSRR. Galotanię (pentadwugaloiloglukozę) uzyskiwano z handlowych preparatów taniny metodą Armitage (1961). Czystość sprawdzono w elektroforezie bibułowej metodą Mejbaum-Katzenellenbogen, Kudrewicz-Hubickiej (1966). Wyszuszony i przechowywany w eksykatorze próżniowym preparat galotaniny używany był jako standard.

* J. Wiśniowska, B. Żurawska, W. Mejbaum-Katzenellenbogen (praca nie opublikow.) „Mikrometoda oznaczania garbników za pomocą odczynnika żelatynowego”.

WYNIKI

Przebadane szczepy grzybów, trzy z rodzaju *Aspergillus* i dziesięć z rodzaju *Penicillium* różniły się między sobą wrażliwością na dodatek taniny do pożywki. Do pierwszej grupy zaliczono grzyby dobrze rosnące na pożywce z taniną, do drugiej te, które nie rosły w obecności taniny. Wyniki oznaczania białka i tanazy w grzybni oraz w pożywce przedstawiono w tabeli 1.

Proszek acetonowy z grzybni wszystkich szczepów pierwszej grupy zawierał tanazę, która ekstrahowała się wraz z innymi białkami 0,2 % NaCl. Aktywność tanazy okazała się najniższa u *Penicillium thomi* i *Aspergillus niger* a najwyższa

Ryc. 1. Krzywa standardowa gallotanniny

Zakres metody 100—200 μg w próbce, objętość końcowa 4 ml, odczyt w fotometrze Pulfricha przy filtrze S 66

u *Penicillium frequentans* i *Penicillium chrysogenum*. Stężenie tanazy wynosiło odpowiednio 0,33, 0,32, 2,9 i 2,2 jednostek tanazowych w przeliczeniu na 100 mg proszku acetonowego z grzybni. Najwyższą aktywność właściwą wykazywały białka ekstrahujące się z grzybni *Penicillium frequentans* (1,9 jedn./mg) a najniższą — z *Penicillium thomi* (0,08 jedn./mg).

Grzyby pierwszej grupy można podzielić w zależności od wydzielania tanazy do pożywki na dwie podgrupy. Cztery szczepy z rodzaju *Penicillium* a mianowicie: *notatum*, *thomi*, *nigricans* i *brevicompactum* nie wydzielaly tanazy, z pozostałych pięciu szczepów najwięcej tanazy znaleziono w pożywkach, w których rósł *Penicillium variable*. Dodatek taniny do pożywki wywoływał wzrost w produkcji tanazy u wszystkich grzybów przy czym ponad dziewięciokrotnie wzrastało stężenie tanazy w grzybni *Penicillium variable*, ośmiokrotnie w *Aspergillus niger* i ponad sześciokrotnie w *Penicillium nigricans* oraz *notatum*. Najślabszy wzrost aktywności tanazy zaobserwowano w *Penicillium chrysogenum*. W większości badanych szczepów tej grupy, bo u siedmiu gatunków tanina pobudzała syntezę białka ekstrahującego się chlorkiem sodowym. Stężenie białka wzrastało od 118 do 386 % wartości znajdo-

wanych dla grzybów rosnących w nieobecności taniny. Tylko u dwu gatunków a mianowicie: *Penicillium notatum* i *Penicillium thomi*, stężenie białka ekstrahującego się roztworem chlorku sodowego spadało pod wpływem obecności taniny w pożywce. Obserwowany wzrost syntezy białka znalazł potwierdzenie w przyroście masy całej grzybni, która stanowiła od 120 do 190 % wartości kontrolnej.

Tanina hamowała wzrost czterech szczepów w tym dwu z rodzaju *Penicillium* i dwu z rodzaju *Aspergillus*. *Penicillium claviforme* i *Aspergillus flavus* nie zawierały tanazy w grzybni i nie wydzielaly jej do pożywki. Pozostałe dwa a mianowicie: *Aspergillus versicolor* i *Penicillium granulatum* w nieobecności taniny w podłożu produkowały tanazę. Z wszystkich trzynastu badanych szczepów *Penicillium granulatum* wyróżniał się najwyższym stężeniem tanazy (3,8 jedn. na 100 mg grzybni), oraz mimo tak dużej produkcji enzymu brakiem wydzielania go do podłoża. *Aspergillus versicolor* zawierał tanazę w grzybni (2,4 jedn./mg) i wydelał ją do pożywki. Obecność tanazy nie chronila tych dwu gatunków przed toksycznym wpływem taniny obecnej w pożywce.

DYSKUSJA

Turbidymetryczna mikrometoda oznaczania bialek, polega na tym iż białko w granicach stężeń od 20 do 100 µg/ml w obecności bardzo znacznego nadmiaru taniny (10 % taniny, 2 % fenolu i 1 N HCl) daje proporcjonalny wzrost zmętnienia (Mejbaum-Katzenellenbogen 1955). W metodzie tej wykorzystuje się charakterystyczną właściwość garbnika, jaką jest tworzenie nierozpuszczalnych połączeń z białkami. Na tej samej zasadzie opiera się opisana w tej pracy metoda oznaczania taniny: odwrócono jedynie stosunek taniny do białka, oznacza się bowiem mikrogramy taniny nadmiarem białka z zachowaniem pozostałych warunków metody. Czułość metody jest tak duża, że pozwoliła na wykrywanie nawet bardzo niewielkich ubytków taniny po inkubacji z rozcieńczonymi roztworami tanazy.

Knudson (1913b) aktywność tanazową oznaczał poprzez pomiar ilości uwalnianego kwasu galusowego metodą Jeana (1900) i stwierdził, że tak pożywki, jak i wyciążi z grzybów hodowanych w nieobecności taniny nie zawierają tanazy. Tanaza według niego należy do enzymów wytwarzanych tylko w obecności substratu w podłożu. Jednakże zastosowanie czulej metody oznaczania nie rozłożonej taniny pozwoliło stwierdzić, że prawie wszystkie gatunki przebadanych szczepów produkują tanazę w nieobecności taniny w podłożu oraz że niektóre z nich wydzielają ją do pożywki.

Z przebadanych trzynastu szczepów tylko dwa (*Aspergillus flavus*, *Penicillium claviforme*) nie produkowały tanazy na standardowej pożywce Czapka, również obecność substratu w podłożu nie indukowała u nich wydzielania tanazy. Tanina działała na te szczepy toksycznie, hamując ich wzrost na podłożu z taniną. Enzymy tworzą z taniną kompleksy nieposiadające aktywności biologicznej. Produkcję tanazy w komórkach grzybni można uważać za jeden z mechanizmów detoksykacji, tanaza pozbawia bowiem taninę jej właściwości „toksycznych”, tzn. łączenia się

z białkiem. Prawie połowa przebadanych szczepów wydzielala enzym do podłoża. W obecności substratu w podłożu wszystkie grzyby produkowały więcej tanazy, w niektórych szczepach obserwowano bardzo znaczne nasilenie produkcji tanazy, np. aktywność właściwa białek ekstrahowanych z grzybni *Penicillium notatum* wzrastała dziesięciokrotnie. Szczepy, które rosły na pożywce z taniną wytwarzały grzybnię o większej masie a wyciągi chlorkowe zawierały więcej białka, wynika z tego że dla większości grzybów tanina jest czynnikiem stymulującym wzrost. Ciekawie zachowują się *Aspergillus versicolor* i *Penicillium granulatum*, bo mimo posiadania tanazy nie rosły na pożywce z taniną. Być może jak stwierdził Knudson (1913a) przeprowadzając badania nad wrażliwością grzybów na stężenie taniny w podłożu, przyczyną było zbyt wysokie dla nich stężenie taniny w pożywce.

STRESZCZENIE

Oznaczono aktywność tanazową w wyciągach z grzybni kilkunastu szczepów z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* wyizolowanych z gleby, hodowanych na podłożu bez taniny i w obecności taniny. Większość przebadanych gatunków wytwarza tanazę w obecności substratu w podłożu a dodatek taniny do podłoża wywołuje kilkakrotny wzrost produkcji tanazy. Większość gatunków wydzielala enzym do podłoża.

Katedra Ekologii i Geografii Roślin
Uniwersytetu Wrocławskiego
Katedra Biochemii
Uniwersytetu Wrocławskiego

(Wpłynęło dn. 13.VII.1968 r.)

SUMMARY

Tannase activity was determined in extracts from the mycelium of some strains of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* isolated from the soil. The fungi were grown in a medium with or without tannin. It was found that in the majority of the examined species tannase was produced when tannin was absent in the medium. Addition of tannin to the medium resulted in an increase of the total tannase activity of the fungi. The enzyme of most of the studied species is released into the medium.

LITERATURA

- Armitage R., 1961, J. Chem. Soc. 1842.
Jean F., 1900, Chem. Centralbl. 1107.
Knudson L., 1913 a, J. Biol. Chem. 14: 159.
Knudson L., 1913 b, J. Biol. Chem. 14: 185.
Król S., 1966, Ekologia Polska, ser. A-14 (24): 395.
Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1955, Acta Biochim. Polon. 2: 279.
Mejbaum-Katzenellenbogen W., Kudrewicz-Hubicka Z., 1966, Acta Biochim. Polon. 13: 56.
Van Tieghem Ph., 1867 Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 5, 8: 210.