

Tadeusz SKOWROŃSKI

Aktywność fitazowa u grzybów

Фитазная активность грибов

Phytase Activity in Fungi

WSTĘP

Fosforany inozytolu są ważnym składnikiem fosforu organicznego gleby (1, 2, 3, 4, 6, 14, 18, 19, 23, 24). Związki te ulegają mineralizacji przede wszystkim pod wpływem fitazy mikroorganizmów (13).

Jak wykazały badania Greavesa i wsp. (11, 12), 30—50% glebowych drobnoustrojów może rozkładać sześćiofosforan inozytolu. Należą one do pospolicie występujących rodzajów, np. *Bacillus*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Aspergillus* (6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 21, 22).

Niewiele jest publikacji, które dotyczą aktywności fitazowej grzybów, mimo że, jak wykazały badania Shieha i Ware (20), są to organizmy o znacznej aktywności.

Dążąc do uzyskania szczepu o wysokiej aktywności fitazowej przebadano kolekcję kilkudziesięciu grzybów, zwracając uwagę na aktywność pozakomórkową i endogenną.

MATERIAL I METODY

Do badań użyto szczepy własne wyizolowane z gleby, dla których określono przynależność gatunkową, oraz drobnoustroje muzealne, u których aktywności fitazowej dotychczas nie określono, pochodzące z następujących instytucji: Instytutu Antybiotyków w Warszawie, Ogrodu Botanicznego Instytutu Hodowli i Akli-

matyzacji Roślin (IHAR) w Bydgoszczy, Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie oraz Zakładu Mikrobiologii IUNG w Puławach.

Jako substrat stosowano sól sodową kwasu fitynowego firmy Sigma typ V. Preparat ten nie wykazuje zanieczyszczeń fosforanami nieorganicznymi ani też niższymi estrami fosforanowymi inozytolu, co sprawdzono stosując dwukierunkową chromatografię bibułą wg Andersona (1).

W celu oznaczenia aktywności fitazowej grzybni drobnoustroje hodowano przez 3 dni na pożywce Czapeka ze zmniejszoną do 168 mg/1000 ml ilością K_2HPO_4 (3 mg Pi/100 ml), na wytrząsarce (140 wychyleń/min.) w 250 ml kolbach kulistych z 50 ml pożywki. Inokulum stanowiły 3 krążki z zarodnikami o średnicy 10 mm, wycięte z brzezki zestalonej agarem. Przemytą grzybnię homogenizowano w szklanym homogenizatorze z buforem w proporcji 1 g mokrej masy grzybni na 6 ml 0,2 M buforu octanowego o pH 5,5 przez 5 min. Homogenat używano do oznaczania endogennej aktywności fitazowej.

W celu uzyskania aktywnych płynów pohodowlanych drobnoustroje hodowano na pożywce Czapeka z dodatkiem 8% skrobi oraz ze zmniejszoną do 168 mg/1000 ml ilością K_2HPO_4 przez 8 dni na wytrząsarce (140 wychyleń/min.). Inokulum stanowiły 3 krążki z zarodnikami o średnicy 10 mm, wycięte z brzezki zestalonej agarem. Szczepiono nimi 50 ml pożywki w 250 ml kolbach kulistych. Po skończonej hodowli grzybnię odsączano, a płyn pohodowlany odwirowywano przy względnej sile odśrodkowej 10 000 g. Supernatant używano do oznaczania egzogennej aktywności fitazowej.

Aktywność fitazowa określana była na podstawie uwalniającego się ortofosforanu. W skład mieszaniny inkubacyjnej wchodziło 0,9 ml 0,2 M buforu octanowego o pH 5,5, zawierającego 2,37 μ moła obojętnej soli sodowej sześcioposforanu inozytolu, oraz 0,1 ml płynu pohodowlanego lub homogenatu grzybni. Mieszaninę reagującą inkubowano w temp. 40°C w czasie 1—1,5 godz. Reakcję przerywano przez dodanie 1 ml 10% kwasu tróchlorooctowego. Po odwirowaniu (12 000 g, 10 min.) uwolniony fosforan nieorganiczny oznaczano metodą Fiske i Subbarowa (10).

Za jednostkę aktywności enzymatycznej przyjęto tę ilość enzymu, która uwalnia 1 μ mol fosforu nieorganicznego w ciągu 1 min. w wyżej podanych warunkach.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Problem występowania aktywności fitazowej u drobnoustrojów jest nadal aktualny. Informacje zawarte w piśmiennictwie na ten temat są bowiem często ogólne. Prócz tego, przy określaniu aktywności fitazowej drobnoustrojów nie stosowano jednolitych metod oraz substratu. Stąd wyniki czasem trudno jest porównywać. Cosgrove (6, 7) podkreśla, że handlowe preparaty fityny są często zanieczyszczone niższymi estrami fosforanowymi inozytolu, które mogą być rozkładane przez fosfatazy niezdolne do hydrolizy pięcio- i sześcioposforanów, co może zmienić obraz aktywności fitazowej.

W niniejszej pracy oznaczono aktywność fitazową u 99 szczepów grzybów należących do rodzajów *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*,

Mucor, *Trichoderma* i *Truncatella*. Większość szczepów reprezentowała rodzaj *Aspergillus*.

Endo- i egzogenną aktywność badanych drobnoustrojów zestawiono w tab. 1. Widać z niej, że największa liczba szczepów z endo- i egzogenną aktywnością fitazową należała do rodzaju *Aspergillus*. Na 75 jego przedstawicieli aktywność endogenną posiadało 60 szczepów, czyli 80%, a egzogenną — 41, czyli 54,6%. Wysoka aktywność fitazowa endo- i egzogenna charakteryzowała w tym doświadczeniu zwłaszcza szczepy należące do gatunku *Aspergillus niger* oraz zaliczane do rodzaju *Aspergillus* (dokładniej nie oznaczone) drobnoustroje izolowane z gleby. Szczep *Aspergillus* sp. nr 5 wyizolowany z gleby wykazywał najwyższą aktywność endogenną, natomiast najwyższą aktywność egzogenną stwierdzono u *Aspergillus niger* III A.n./8. Zaobserwowano również, że u pozostałych przedstawicieli rodzaju *Aspergillus* oraz u innych rodzajów badanych grzybów aktywność endogenna, a zwłaszcza egzogenna występowały rzadziej i były zwykle mniejszego rzędu. Na 6 przedstawicieli rodzaju *Penicillium* dwa szczepy wykazywały aktywność endo- i egzogenną, a na 7 szczepów należących do *Mucor* żaden nie wykazywał aktywności egzogennej, a tylko 1 odznaczał się słabą aktywnością endogenną. Wszystkie badane szczepy *Fusarium* izolowane z gleby nie wykazywały aktywności fitazowej.

Uzyskane wyniki potwierdzają doniesienia Shieha i Ware (20) o występowaniu wysokiej egzogennej aktywności fitazowej u *Aspergillus niger* oraz stosunkowo małej częstości występowania tej cechy u przedstawicieli takich rodzajów, jak *Penicillium* i *Mucor*. W dostępnym mi piśmiennictwie brak jest dokładniejszych informacji o występowaniu endogennej aktywności fitazowej u innych niż *Aspergillus* rodzajów grzybów.

W wykonanym doświadczeniu nie zostały potwierdzone doniesienia Kotielewa (16) o aktywności fitazowej *Fusarium*. Być może, przyczyna rozbieżności wyników leży w stosowaniu odmiennych metod i substratu. Powyższą obserwację należałoby jednak sprawdzić na szerszym materiale.

WNIOSKI

1. Najwyższą aktywnością fitazową zarówno endo-, jak i egzogenną odznaczały się drobnoustroje należące do gatunku *Aspergillus niger* oraz szczepy rodzaju *Aspergillus*, wyizolowane z gleby.

2. Fitazowa aktywność endogenna występowała częściej u badanych grzybów niż aktywność pozakomórkowa.

Tab. 1. Aktywność fitazowa badanych grzybów
Phytase activity of fungi examined

Gatunek i numer szczepu	Pochodzenie szczepów	Aktywność endogenna j/g mokrej masy grzyba	Aktywność egzogenna j/ml
<i>Aspergillus niger</i> A	Inst. Antybiot.	0,4	0,28
<i>Aspergillus niger</i> C	Inst. Antybiot.	0,56	0,07
<i>Aspergillus niger</i> v.T.	Inst. Antybiot.	0,34	0,15
<i>Aspergillus niger</i> v.T.E-1	IHAR	0,64	0,06
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./2	Inst. Przem. Ferment.	1,6	0,18
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./3	Inst. Przem. Ferment.	1,3	0,08
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./7	Inst. Przem. Ferment.	0,3	0,32
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./8	Inst. Przem. Ferment.	1,3	0,42
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./17	Inst. Przem. Ferment.	1,7	0,19
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./21	Inst. Przem. Ferment.	1,8	0,14
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./23	Inst. Przem. Ferment.	1,72	0,2
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./28	Inst. Przem. Ferment.	1,4	0,08
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./31	Inst. Przem. Ferment.	0,7	0,08
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./32	Inst. Przem. Ferment.	0,46	0,33
<i>Aspergillus niger</i> IIIA.n./34	Inst. Przem. Ferment.	1,2	0,32
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./1	Inst. Przem. Ferment.	0,2	0
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./2	Inst. Przem. Ferment.	0,18	0
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./3	Inst. Przem. Ferment.	0,32	0
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./4	Inst. Przem. Ferment.	0,12	0
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./6	Inst. Przem. Ferment.	0,12	0,02
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./7	Inst. Przem. Ferment.	0,1	0
<i>Aspergillus oryzae</i> IIIA.or./8	Inst. Przem. Ferment.	0,02	0,03
<i>Aspergillus oryzae</i> Ahlburg IIIA.or./13	Inst. Przem. Ferment.	0,64	0
<i>Aspergillus oryzae</i> Ahlburg E5	IHAR	0	0
<i>Aspergillus flavus oryzae</i>	Inst. Antybiot.	0,18	0,06
<i>Aspergillus flavus</i> A.s.3.800	Inst. Antybiot.	0,28	0,18
<i>Aspergillus flavus</i> Link E-4	IHAR	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> Link IIIA.fl.1	Inst. Przem. Ferment.	0,1	0
<i>Aspergillus flavus</i> Link IIIA.fl.2	Inst. Przem. Ferment.	0,18	0
<i>Aspergillus flavus</i> Link IIIA.fl.3	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus batatae</i> A.s.3.324	Inst. Antybiot.	0,22	0,06
<i>Aspergillus candidus</i> Link IIIA.c./1	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus candidus</i> Link IIIA.c./2	Inst. Przem. Ferment.	1,3	0
<i>Aspergillus candidus</i> Link IIIA.c./3	Inst. Przem. Ferment.	0,48	0,08
<i>Aspergillus candidus</i> E28	IHAR	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> IIIA.f./1	Inst. Przem. Ferment.	0,4	0,07
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. A.f./3	Inst. Przem. Ferment.	0,06	0,03
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. A.f./4	Inst. Przem. Ferment.	0,14	0,03
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres. E34	IHAR	0,16	0
<i>Aspergillus versicolor</i> IIIA.v./1	Inst. Przem. Ferment.	0	0

ciąg dalszy tab. 1

Gatunek i numer szczepu	Pochodzenie szczepów	Aktywność endogenna j/g mokrej masy grzyba	Aktywność egzogenna j/ml
<i>Aspergillus versicolor</i> IIIA.v./2	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i> Tiraboschi E215	IHAR	0	0
<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer IIIA.w./1	Inst. Przem. Ferment.	0,18	0,16
<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer IIIA.w./2	Inst. Przem. Ferment.	0,2	0
<i>Aspergillus wentii</i> E7	IHAR	2,08	0,19
<i>Aspergillus tamarii</i> IIIA.tm./1	Inst. Przem. Ferment.	0,16	0,02
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita E204	IHAR	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i> IIIA.o./1	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i> IIIA.o./2	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm E 38	IHAR	0	0
<i>Aspergillus terreus</i> 56 B	Inst. Antybiot.	0,16	0,06
<i>Aspergillus terreus</i> IIIA.tr./1	Inst. Przem. Ferment.	0,16	0
<i>Aspergillus terreus</i> IIIA.tr./2	Inst. Przem. Ferment.	0,24	0
<i>Aspergillus ruber</i> IIIA.rb./1	Inst. Przem. Ferment.	0,14	0
<i>Aspergillus ruber</i> Thom IIIA.rb./2	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus amstelodami</i> IIIA.am./1	Inst. Przem. Ferment.	0,2	0
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm. IIIA.d./1	Inst. Przem. Ferment.	0,1	0
<i>Aspergillus elegans</i> Gasparini IIIA.e./1	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus flavescens</i> IIIA.fs./1	Inst. Przem. Ferment.	0,18	0,11
<i>Aspergillus flavescens</i> Wreden E 39	IHAR	0,14	0
<i>Aspergillus flavipes</i> IIIA.fp./1	Inst. Przem. Ferment.	0	0
<i>Aspergillus itaconicus</i> IIIA.i./1	Inst. Przem. Ferment.	0,16	0,15
<i>Aspergillus luchuensis</i> IIIA.l./1	Inst. Przem. Ferment.	0,84	0,02
<i>Aspergillus repens</i> de Bary IIIA.r./1	Inst. Przem. Ferment.	0,1	0
<i>Aspergillus fonsecaeus</i> Thom et Raper E 43	IHAR	0,9	0,05
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Wint E 246	IHAR	0,14	0
<i>Aspergillus</i> sp. 1	Izolowano z gleby	1,74	0,15
<i>Aspergillus</i> sp. 2	Izolowano z gleby	1,4	0,11
<i>Aspergillus</i> sp. 3	Izolowano z gleby	2	0,12
<i>Aspergillus</i> sp. 4	Izolowano z gleby	0,5	0,2
<i>Aspergillus</i> sp. 5	Izolowano z gleby	2,32	0,13
<i>Aspergillus</i> sp. 6	Izolowano z gleby	1,9	0,18
<i>Aspergillus</i> sp. 7	Izolowano z gleby	1,92	0,09
<i>Aspergillus</i> sp. 8	Izolowano z gleby	0,52	0,15
<i>Aspergillus</i> sp. 9	Izolowano z gleby	0,48	0,35
<i>Fusarium</i> sp. 1	Izolowano z gleby	0	0
<i>Fusarium</i> sp. 2	Izolowano z gleby	0	0
<i>Fusarium</i> sp. 3	Izolowano z gleby	0	0
<i>Fusarium</i> sp. 4	Izolowano z gleby	0	0
<i>Fusarium</i> sp. 5	Izolowano z gleby	0	0
<i>Fusarium</i> sp. 6	Izolowano z gleby	0	0

ciąg dalszy tab. 1

Gatunek i numer szczepu	Pochodzenie szczepów	Aktywność endogenna j/g mokrej masy grzyba	Aktywność egzogenna j/ml
<i>Fusarium</i> sp. 7	Izolowano z gleby	0	0
<i>Fusarium</i> sp. 8	Izolowano z gleby	0	0
<i>Penicillium brevi-compactum</i> Dierckx E 25	IHAR	0,3	0,05
<i>Penicillium cyclopium</i> Westl. E 183	IHAR	0	0
<i>Penicillium expansum</i> E 29	IHAR	0,2	0,22
<i>Penicillium notatum</i> Westl. E 30	IHAR	0	0
<i>Penicillium purpurogenum</i> E 56	IHAR	0	0
<i>Penicillium vermiculatum</i> Dangeard E 154	IHAR	0	0
<i>Mucor circinelloides</i> v. Tiegh E 72	IHAR	0	0
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer E 45	IHAR	0	0
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer E 46	IHAR	0	0
<i>Mucor mucedo</i> L. E 69	IHAR	0,24	0
<i>Mucor racemosus</i> Fres E 71	IHAR	0	0
<i>Mucor ramannianus</i> Moller E 116	IHAR	0	0
<i>Mucor spinosus</i> v. Tiegh E 240	IHAR	0	0
<i>Trichoderma coniugi</i>	Zakład Mikrob. IUNG w Puławach	0	0
<i>Trichoderma viridae</i>	Zakład Mikrob. IUNG w Puławach	0,3	0
<i>Truncatella truncata</i>	Zakład Mikrob. IUNG w Puławach	0	0

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson G.: The Identification and Estimation of Soil Inositol Phosphates. J. Sci. Food Agr. 6, 437, 1956.
2. Anderson G.: Inositol Phosphates. Soil Biochemistry (A. D. Mc Laren and G. H. Peterson Eds.) Marcel Dekker N.Y. 78, 1967.
3. Bower C.A.: Separation and Identification of Phytin and its Derivatives from Soils. Soil Sci. 59, 4, 277, 1945.
4. Caldwell A.G., Black C.A.: Inositol Hexaphosphate: III. Content in Soils. Soil Sci. Soc. Proc. 22, 4, 296, 1958.
5. Casida L.E.: Phosphatase Activity of Some Common Soil Fungi. Soil. Sci. 87, 6, 305, 1959.
6. Cosgrove D. J.: Metabolism of Organic Phosphates in Soil. Soil Biochemistry (A. D. Mc Laren, G. H. Peterson Eds). Marcel Dekker N.Y. 216, 1967.
7. Cosgrove D.J.: Inositol Phosphate Phosphatases of Microbiological Origin. Inositol Phosphate Intermediates in the Dephosphorylation of the Hexaphosphates of Myo-Inositol, Scyllo-Inositol and D-Chiro-Inositol by a Bacterial (*Pseudomonas* sp.) Phytase. Aust. J. Biol. Sci. 23, 1207, 1970.
8. Cosgrove D.J., Irving G.C., Bromfield S.M.: Isolation Phosphate

- Phosphatases of Microbiological Origin. The Isolation of Soil Bacteria Having Inositol Phosphate Phosphatase Activity. *Aust. J. Biol. Sci.* 23, 339, 1970.
9. Dox A.W., Golden R.: Phytase in Lower Fungi. *J. Biol. Chem.* 10, 183, 1911—1912.
 10. Fiske C.H., Subbarow Y.: The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925.
 11. Greaves M.P., Anderson G., Webley D.M.: A Rapid Method for Determinating Phytase Activity of Soil Microorganisms. *Nature* 200, 4912, 1261, 1963.
 12. Greaves M.P., Webley D.M.: A Study of the Breakdown of Organic Phosphates by Microorganisms from the Root Region of Certain Pasture Grasses. *J. Appl. Bact.* 28, 3, 454, 1965.
 13. Jackman R.H., Black C.A.: Phytase Activity in Soils. *Soil Sci.* 73, 117, 1952.
 14. Mc Kercher R.B., Anderson G.: Content of Inositol Penta and Hexaphosphates in Some Canadian Soils. *J. Soil Sci.* 19, 1, 47, 1968.
 15. Kobus J.: Udział drobnoustrojów w przemianach związków fosforowych w glebie. *Roczn. Nauk Roln.* 91-D-5, 1961.
 16. Kotielew W.W., Miehtiewa E.A., Smirnow W.J.: Mineralizacja organicznych sojedinenij fosfora niekotorymi poczwinnymi mikroorganizmami. *Izwestija Akademii Nauk Moldawskiej SRR* 7, 34, 1962.
 17. Mahmoud S.A.Z., Abdel-Hafez A.M., El Sawy H., Hanafy E.A.: Phytin Hydrolyzing Bacteria in Soil and Rhizosphere of Wheat and Broad Bean in Soils of Egypt. *Zbl. Bakt.* II, 128, 528, 1973.
 18. Martin J.K.: Soil Organic Phosphorus. a) Methods for the Extraction and Partial Fractionation of Soil Organic Phosphorus. b) Nature of Soil Organic Phosphorus. *New Zealand J. Agr. Res.* 7, 723, 736, 1964.
 19. Pedersen E.J.N.: On Phytin Phosphorus in the Soil. *Plant and Soil* IV, 3, 252, 1953.
 20. Shieh T.R., Ware J.H.: Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase. *Applied Microbiology* 16, 1348, 1968.
 21. Szember A.: Influence on Plant Growth of the Breakdown of Organic Phosphorus Compounds by Microorganisms. *Plant and Soil*. XIII, 2, 147, 1960.
 22. Szember A.: Uprzyspejanie roślinom fosforu z jego organicznych połączeń przez drobnoustroje glebowe. Cz. I. Występowanie u drobnoustrojów glebowych uzdolnień od mineralizowania organicznych związków fosforu. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E*, vol. XV, 6, Lublin 1960.
 23. Thomas R.L., Lynch D.L.: Quantitative Fractionation of Organic Phosphorus Compounds in Some Alberta Soils. *Can. J. Soil Sci.* 40, 113, 1960.
 24. Williams C.H., Anderson G.: Inositol Phosphates in Some Australian Soils. *Aust. J. Soil Res.* 6, 1, 121, 1968.

РЕЗЮМЕ

Определялась фитазовая, эндогенная и экзогенная активность штаммов рода *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Truncatella*. Фитазовой активностью прежде всего характеризовался род *Aspergillus*. Наивысшей эндо- и экзогенной активностью отличались штаммы вида *Aspergillus niger* и выделен-

ные из почвы штаммы рода *Aspergillus*. Фитазная активность у остальных изучаемых родов грибов наблюдалась реже и была обычно более низкого ряда.

SUMMARY

In the presented work endo- and exogenous phytase activities of the strains of: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Trichoderma* and *Truncatella* genera were examined. First of all, phytase activity was characteristic of *Aspergillus* genus. The highest endo- and exogenous activities showed the strains of *Aspergillus niger* species and the strains of *Aspergillus* genus isolated from soil. Phytase activity in the representatives of the remaining fungi genera was more rare and usually lower.