

Abstrakt

Anaerobní bachorová houba *Orpinomyces joyonii* KF2 byla izolována z bachorové tekutiny krávy. Byl studován její chitinolytický systém ve třech frakcích, a to v médiu, v cytosolu a v buněčných stěnách. Houba byla kultivována v médiu M10 [26] s 20 % bachorové tekutiny a 3 g/l glukosy jako zdroji uhlíku. Byly zjištěny jen velmi nízké aktivity exochitinasy, N-acetylglucosaminidasy a deacetylasy. Jako nejvýznamnější chitinolytický enzym byla prokázána endochitinasasa. Nejvyšších endochitinasových aktivit dosahovala cytosolová frakce a frakce z buněčných stěn. Endochitinasasa produkovaná extracelulárně nedosahovala takových aktivit jako ve dvou ostatních frakcích a ani zakoncentrování média srážením síranem amonným a dělením přes polyethersulfonové filtry (10 - 300 kDa) nevedlo ke zvýšení její aktivity. Také enzymy cytosolové frakce byly děleny ultrafiltrací, avšak veškerá endochitinasová aktivita zůstala ve frakci obsahující proteiny o velikosti nad 300 kDa.

Endochitinasasa ze všech buněčných frakcí houby KF2 byla charakterizována. Optimální pH endochitinasy v médiu bylo 5 a v cytosolové frakci a frakci z buněčných stěn 6. Optimální teplota působení enzymu byla 30°C pro endochitinasu v médiu, 50°C pro cytosolovou endochitinasu a 40°C pro endochitinasu buněčných stěn. Endochitinasy byly stabilní v rozmezí pH 4-7 a ztratily funkci při 50°C v médiu a 60°C v ostatních buněčných frakcích. Endochitinasy rozkládaly všechny námi studované substráty. Nejvhodnější substrát pro cytosolovou chitinasu byl houbový chitin a pro chitinasu buněčných stěn CM-chitin. Enzymová aktivita byla inhibována ionty Mn^{2+} , thimerosalem, SDS a EDTA. Naopak ionty Mg^{2+} , iodoacetamid a iodoctová kyselina měly aktivační účinek. Zymografy prokázaly, že endochitinasy se nacházejí ve všech buněčných frakcích ve formě několika izoenzymů, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 43 až 134 kDa.