

Stimulácia produkcie α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005

579 663

RNDr. V. VOLLEK, Prof. Ing. B. ŠKÁRKA, DrSc., Ing. V. LUKÁČOVÁ, CSc. Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, CHTF SVŠT, 812 37 Bratislava.

Kľúčové slová: *Aspergillus oryzae*, α -amyláza, stimulácia, kyslá srvátka

Vzrastajúci záujem o aplikáciu enzýmov v priemyselných procesoch využívajúcich enzýmovú degradáciu škrobu vedie k sústavnému zvyšovaniu produkcie amyláz. Tieto enzýmy majú široké biotechnologické uplatnenie. Enzýmy v potravinárskej kvalite sa využívajú v pivovarníctve a liehovarníctve na scukornenie obilného alebo zemiakového škrobu, pri výrobe ovocných štiav a sirupov, v pekárskom, cukrovinkárskom a farmaceutickom priemysle. Enzýmy v technickej kvalite sa využívajú v papierenskom, textilnom priemysle a pri čistení odpadových vod, čo má značný význam z ekologického hľadiska. Okrem rastlín a živočíchov produkujú enzýmy amylázového systému aj baktérie, kvasinky a vláknité huby. Medzi producentov plesňových amyláz najčastejšie využívaných v potravinárskom priemysle patrí rod *Aspergillus*.

Z prírodného prostredia sme izolovali vyše 200 kmeňov húb prevažne z rodu *Aspergillus*, ktoré produkovali α -amylázu. Z nich dva kmene vykazovali vysokú produkciu α -amylázy. Tieto kmene sme uložili v Československej zbierke mikroorganizmov a s ich fyziologickými vlastnosťami sme sa podrobne zaoberali [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Je známe, že produkcia amyláz úzko súvisí s maximálnou tvorbou mycélia [7]. Fogarty a Benson [8] sledovali vplyv kovových iónov na rast mycélia, aktivitu a produkciu amyláz. V našej práci sme sa zamerali na látky pozitívne pôsobiace na rast produkčného organizmu.

MATERIÁL A METÓDY

Produkčný mikroorganizmus

Použili sme nami izolovaný kmeň *Aspergillus oryzae* CCM 8005, udržiavaný na šikmom sladínovom agare pod parafínovým olejom.

Kultivačné médium

Na kultiváciu produkčného mikroorganizmu sme použili nami modifikovanú Czapek-Doxovu pôdu nasledovného zloženia: NaNO_3 – 3 g, K_2HPO_4 – 1 g, KCl – 0,5 g, MgSO_4 – 0,5 g, CaCl_2 – 0,5 g, FeSO_4 – 0,01 g, melasa – 2,5 g, kukuričný šrot – 20 g, vodovodná voda – 1 l, pH 6,8 – 7,0. Sterilizácia 20 min. pri 121 °C. Kmeň sme kultivovali v 100 ml média v 500 ml bankách na rotačnej trepačke (2 s^{-1}) pri teplote 30 °C. Kultivačné médium sme inokulovali 1 ml spórovej suspenzie s $1,5 \cdot 10^7$ konidií. Tieto podmienky sme považovali za kontrolu (K).

Použité rastové stimulatory

K uvedenému médiu sme alternatívne pridávali kukuričný výluh (CSL), odtučnenú sójovú a arašidovú múčku, peptón z mäsa, peptón zo sóje, peptón z kazeínu (Trypton Oxoid), kvasničný extrakt (Oxoid) a sušenú sladkú srvátku (MILEX Levice). Z celého radu pokusov sme zistili, že optimálne množstvo prídavku týchto látok je $2,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Kvapalnú kyslú srvátku sme odobrali priamo z mliekárne MILEX Bratislava. V pokusoch sme použili koncentrácie 100, 50, 33, 20 a 11 % obj.

Stanovenie aktivity produkovanej α -amylázy

Aktivitu α -amylázy sme stanovovali tabletovým Spofa-S-testom v citrát-fosfátovom tlmivom roztoku o pH 5,25 pri teplote 44 °C. Intenzitu modrého sfarbenia sme merali spektrofotometricky a aktivitu enzýmu sme odčítali z kalibračného grafu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našich pokusoch sme zistili, že z použitých látok v danej koncentrácii najväčší stimulačný efekt mala sójová múčka a sušená sladká srvátka. Je zaujímavé, že napr. prídavok peptónu do média znížil produkciu α -amylázy oproti kontrole o 36 %. Tento fenomén možno vysvetliť tak, že peptón, hoci poskytuje ľahko dostupný zdroj dusíka, poskytuje aj ľahko dostupný zdroj uhlíka, čo sa prejaví čiastočnou inhibíciou tvorby α -amylázy. V tomto prípade ide o zjavný prípad diauxie, kedy organizmus najprv spotrebuje ľahšie dostupné zdroje živín a až po ich spotrebovaní sa orientuje na zdroje ťažšie dostupné [9, 10, 11]. Podobné účinky ako peptón mal v našich pokusoch aj tryptón; kvasničný extrakt a kukuričný výluh stimulovali produkciu α -amylázy len málo. Najlepšie výsledky sme dosiahli pri prídavku sójovej múky a sušenej sladkej srvátky zhodne po 96 h kultivácie. Aktivita produkovaného enzýmu dosiahla 145 a 143 % oproti kontrole. Najlepšie výsledky uvádzame v tabuľke 1. Výsledky sú priemerom troch paraleliek z troch pokusov.

Na základe výsledkov dosiahnutých v pokusoch s prídavkom sušenej sladkej srvátky sme na stimuláciu rastu produkčnej kultúry a tvorby α -amylázy použili aj kyslú srvátku (vedľajší produkt z mliekárskej výroby). Kyslá srvátka obsahuje asi 4,2 % laktózy, 0,7 % proteínov, 0,6 % minerálnych látok, 0,1 % lipidov a 0,5 % kyseliny mliečnej [12].

V prvom pokuse sme v kultivačnom médiu nahradili vodu kyslou srvátkou. Dosiahnuté výsledky sa veľmi podo-

Tabuľka 1. Stimulácia produkcie α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005 niektorými vybranými látkami-rastlinného a živočíšneho pôvodu

Stimulátor	Aktivita (produkcia) α -amylázy v médiu					
	72 h		96 h		120 h	
	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)
Kontrola	990,4	100,0	1 107,7	100,0	910,2	100,0
Kvasničný extrakt	1 028,8	103,8	1 138,8	102,8	943,6	103,66
Peptón	666,8	67,3	1 072,7	96,84	756,9	83,15
Sušená sladká srvátka	1 288,7	130,1	1 582,5	142,86	1 038,1	114,05
CSL	1 039,5	105,0	962,4	86,88	894,8	98,3
Sójová múčka	1 284,8	129,72	1 601,6	144,58	958,4	105,29
Arašidová múčka	898,0	90,67	1 280,4	115,59	918,0	100,85

bali výsledkom dosiahnutým s prídavkom peptónu. Ľahko dostupné živiny boli rýchlo utilizované, podnietili rýchly rast mycélia, ale indukcia produkcie α -amylázy bola nízka. V ďalších pokusoch sme vodu v kultivačnom médiu nahradili zmesou vody a srvátky v pomere 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 a 1 : 8. Dosiahnuté výsledky sú v tabuľke 2. Výsledky sú priemerom troch paraleliet z troch pokusov.

Tabuľka 2. Stimulácia produkcie α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005 prídavkom kyslej srvátky do kultivačného média

Podiel srvátky v médiu	Aktivita (produkcia) α -amylázy v médiu					
	72 h		96 h		120 h	
	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)
Kontrola (0 %)	1 101,2	100,0	929,6	100,0	921,7	100,0
50 % (1 : 1)	1 043,4	94,75	992,7	106,78	1 124,2	121,97
33,3 % (1 : 2)	951,2	86,37	1 027,9	110,57	1 386,3	150,4
20 % (1 : 4)	998,0	90,62	1 304,2	140,29	1 281,3	139,01
11,1 % (1 : 8)	1 236,8	112,31	1 205,4	129,66	950,9	103,16

Z výsledkov v tabuľke 2 vidno, že stimulácia produkcie α -amylázy závisí od koncentrácie a času kultivácie. Po 72 h kultivácii má najväčší stimulačný efekt prídavok srvátky v pomere 1 : 8, a to 112,3 % oproti kontrole. Po 96 h kultivácie to bol prídavok srvátky v pomere 1 : 4, a to 140,3 % oproti kontrole, a po 120 h kultivácie prídavok srvátky v pomere 1 : 2, a to 150,4 % oproti kontrole. Je to zrejme spôsobené väčším množstvom ľahko využiteľných zdrojov živín v zmesiach s vyšším podielom srvátky, teda producent najprv rastie vďaka živinám zo srvátky a potom prejde na utilizáciu kukuričného šrotu, pričom sa uplatnia aj stimulatory zo srvátky.

Chceli sme zistiť, ktorá zložka kyslej srvátky zodpovedá za stimulačný efekt. Urobili sme preto sériu pokusov, v ktorých sme kompletnú kyslú srvátku ponechali len v druhej kontrole (K_2) v pomere 1 : 4. V ostatných vzorkách sme osobitne sledovali vplyv laktózy, kyseliny mliečnej a ich zmesi, a to v takom množstve, ktoré zodpovedá ich zastúpeniu v zmesi vody a kyslej srvátky v pomere 1 : 4. Získané výsledky sú v tabuľke 3. Výsledky sú priemerom troch paraleliet z troch pokusov.

Tabuľka 3. Vplyv srvátky, laktózy a kyseliny mliečnej na produkciu α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005

Médium	Aktivita (produkcia) α -amylázy v médiu					
	72 h		96 h		120 h	
	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)
K	1 369,9	100,0	1 192,8	100,0	912,0	100,0
K_2	1 518,9	110,87	1 702,6	142,73	1 618,4	177,45
médium + laktóza	1 338,1	97,67	1 333,9	111,82	1 628,0	178,50
médium + kyselina mliečna	934,7	68,23	879,8	73,75	1 146,2	125,67
médium + laktóza + kyselina mliečna	1 352,5	98,72	1 390,5	116,57	1 122,0	123,02

Z výsledkov vidno, že ani samotná laktóza, ani kyselina mliečna, ani ich zmes nedosahujú stimulačný efekt kompletnej kyslej srvátky (K_2). Zrejme aj proteíny, minerálne látky, prípadne iné látky kyslej srvátky sa spolupodieľajú na stimulácii tvorby α -amylázy.

Literatúra

- [1] VOLEK, V.—MAJERÍKOVÁ, I.—ŠKÁRKA, B.: A new amylase producing strain of *Aspergillus niger*. In: Abstr. 4th Symposium on Biotechnology. Varna. 1986.

- [2] Pat. ČS: AO — 264 816.
[3] VOLLEK, V.—MAJERÍKOVÁ, I.—ŠKÁRKA, B.: Prům. potr. 38, 1987, s. 224.
[4] VOLLEK, V. et al.: Bull. PV (Bratislava) 27 (7), 1988, s. 113.
[5] VOLLEK, V.—ŠKÁRKA, B.—ČANIGOVÁ, M.: Kvas. prům. 34, 1988, s. 138.
[6] VOLLEK, V.—ŠKÁRKA, B.: Kvas. prům. 36, 1990, s. 169.
[7] KELLY, C. T.—MORIARTY, M. E.—FOGARTY, W. M.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 1985, s. 352.
[8] FOGARTY, W. M.—BENSON, C. P.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 1983, s. 271.
[9] KOSARIC, N. et al.: Ethanol fermentation. In: Biotechnology. Vol. 3. Weinheim 1983, s. 257.
[10] ALEXANDER, M.: Microbial ecology. J. Wiley and Sons Inc., New York 1971, s. 511.
[11] KAPRÁLEK, F.: Fyziologie bakterií. SPN Praha, 1986, s. 286.
[12] ČANIGOVÁ, M.: Srvátka a jej využitie vo výžive. [Kand. diz. práca.] ČHTF SVŠT, 1988.

Lektoroval Ing. F. Machek, CSc.

Vollek, V.—Škárka, B.—Lukáčová, V.: Stimulácia produkcie α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Kvas. prům., 37, 1991, č. 7, str. 197–198.

Autori sledovali vplyv prídavku rôznych látok rastlinného a živočíšneho pôvodu do kultivačného média na rast biomasy produkčného mikroorganizmu *Aspergillus oryzae* CCM 8005 a na produkciu α -amylázy. Zistili, že najvyšší stimulačný efekt má odtučnená sójová múka a kyslá srvátka. Obe látky zvyšujú produkciu α -amylázy o 40 až 78 % oproti kontrole. Ukazuje sa tak ďalšia možnosť priemyslového využitia kyslej srvátky.

Воллек, В.—Шкарка, Б.—Лукачова, В.: Стимулирование продукции α -амилазы *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Квас. прум., 37, 1991, № 7, стр. 197–198.

Авторы исследовали влияние добавки разных веществ растительного и животного происхождения к культивирующей среде, оказанное на рост биомассы продуктивного микроорганизма *Aspergillus oryzae* CCM 8005 и на продукцию α -амилазы. Было найдено, что наиболее высокий эффект получается при применении обезжиренной соевой муки и кислой сыворотки.

Оба вещества повышают продукцию α -амилазы на 48–78 % по сравнению с контрольным процессом. Таким образом показывается новая возможность промышленного использования кислой сыворотки.

Vollek, V.—Škárka, B.—Lukáčová, V.: Stimulation of α -Amylase Production by *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Kvas. prům., 37, 1991, No. 7, pp. 197–198.

The effect of an addition of different vegetable and animal compounds into the culture medium on the growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* CCM 8005 was tested. The maximum stimulation effect has soya flour and sour whey. Both compounds increase α -amylase production by 40 to 78 %. This is another way of and industrial utilization of sour whey.

Vollek, V.—Škárka, B.—Lukáčová, V.: Stimulation der α -Amylase-Produktion bei *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Kvas. prům., 37, 1991, Nr. 7, s. 197–198.

Die Autoren verfolgten den Einfluss der Zugabe verschiedener Substanzen pflanzlicher oder animalischer Herkunft zu dem Kultivationsmedium auf das Wachstum der Biomasse des Produktionsmikroorganismus *Aspergillus oryzae* CCM 8005 und auf die Produktion der α -Amylase. Sie stellten fest, dass der höchste Stimulationseffekt durch Zugabe von entfettetem Sojamehl und Sauermolke erzielt wurde. Beide Substanzen erhöhen die Produktion der α -Amylase um 40 bis 78 % gegenüber der Kontrollkultivation. Die Forschungsergebnisse zeigen auf eine weitere Möglichkeit der industriellen Ausnutzung der Sauermolke.