



## Wykorzystanie hydrolizatów skrobiowych do biosyntezy oksydazy glukozy przez *Aspergillus niger*

Jan Fiedurek

Janusz Szczodrak

Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
Lublin

### 1. Wprowadzenie

Enzym oksydaza glukozy (GOD, EC 1.1.3.4) przekształcający w obecności tlenu glukozę do kwasu glukonowego i nadtlenu wodoru jest wytwarzany głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* (1). Znalazł on dość szerokie zastosowanie w przemyśle, analityce oraz w niektórych działach medycyny (2).

Podstawowym surowcem do produkcji GOD jest glukoza, której preparaty w ostatnich latach stają się coraz droższe. Uzasadnione jest zatem poszukiwanie tańszych surowców o zbliżonej przydatności do biosyntezy tego enzymu. Warunek ten może spełniać w Polsce skrobia ziemniaczana, szczególnie zaś jej hydrolizaty enzymatyczne. Różne typy hydrolizatów skrobi stosowano dotychczas z powodzeniem jako źródła węgla w procesie fermentacji cytrynowej (3, 4). W literaturze pojawiło się niewiele doniesień na temat wytwarzania GOD na surowcach skrobiowych. Lakshminarayana-

nan (5) w badaniach nad wytwarzaniem tego enzymu z *A. niger* stosował podłoże zawierające obok glukozy dodatek dekstryn kukurydzianych. Inni autorzy (1) donieśli, że *P. purpurogenum* rósł dobrze na podłożu ze skrobią, ale w tych warunkach nie obserwowano aktywności GOD. W naszych doświadczeniach (6), wolna grzybnia mutantu *A. niger* GIV-10, wytwarzała duże ilości zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej GOD na pożywce z dodatkiem skrobi jako jedynym źródłem węgla.

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania skrobi i jej hydrolyzatów enzymatycznych jako zastępczych w stosunku do glukozy źródeł węgla do biosyntezy GOD przez wolną i unieruchomioną na pumeksie grzybnię *A. niger* w warunkach hodowli węgłębnej.

## 2. Materiały i metody badań

### 2.1. Organizm i podłoża hodowlane

W badaniach użyto mutantu *A. niger* GIV-10 pochodzącego z Kolekcji Zakładu Mikrobiologii Stosowanej UMCS. Skład pożywki podstawowej z glukozą podano poprzednio (6). Podłoże skrobiowe o odczynie pH 5,0 zawierało w swoim składzie (g/l): mąkę ziemniaczaną typu superior standard (lub jej hydrolyzatek enzymatyczny) 60, Triton X-100 0,4. Pozostałe składniki były identyczne jak podano w podłożu podstawowym z glukozą. Sterylne pożywki (50 ml w kolbach stożkowych à 300 ml) szczepiono (w przypadku grzybni wolnej) wodną zawiesiną konidiów ( $2 \times 10^5$ /ml) w ilości 1% (v/v). Hydrolyzaty skrobiowe otrzymywano przy użyciu preparatów  $\alpha$ -amylazy (*A. oryzae*, Serva) i glukoamylazy (*A. niger*, Serva) immobilizowanych na szkle porowatym (Cormay, Lublin) według metody podanej przez Rogalskiego i wsp. (7).

### 2.2. Unieruchamianie grzybni i warunki hodowli

Konidia *A. niger* immobilizowano na pumeksie w kolbach stożkowych à 300 ml zgodnie z metodą podaną przez Fiedurka i Ilczuka (8). Niezadsorbowane na nośniku konidia odmywano wodą destylowaną, a do kolbek dodawano 50 ml pożywki podstawowej z glukozą. Po 24 godzinach hodowli podłoże podstawowe zamieniano na pożywkę skrobiową i dalej inkubowano. W wariantowych doświadczeniach, w których stosowano podłoże ze skrobią zhydrolyzowaną wcześniej przez unieruchomione amylazy, etap wstępnej inkubacji na pożywce podstawowej pomijano. Hodowle węgłębne wolnej i unieruchomionej na pumeksie grzybni *A. niger* prowadzono w temperaturze 30°C na wytrząsarce z łaźnią wodną przy 200 obr./min.



### 2.3. Analityka

Wydajność biomasy określano wagowo przez wysuszenie grzybni do stałej wagi w temp. 105°C. Aktywność GOD mierzono metodą opisaną wcześniej (9) i wyrażano w jednostkach (U), definiowanych jako mole  $\mu$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min. Aktywność glukoamylazy określano według opisu podanego przez Paszczyńskiego i wsp. (10), a powstałą w wyniku reakcji glukozę analizowano metodą enzymatyczną (11). Białko oznaczano metodą Schacterle i Pollacka (12), zaś cukry redukujące w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (13). Stopień scukrzenia skrobi, oznaczony jako ekwiwalent glukozowy (DE), wyliczano ze wzoru:

$$DE(\%) = \frac{\text{ilość glukozy (mg/ml)} \times 0,9}{\text{zawartość węglowodanów (mg/ml)}} \times 100$$

### 3. Wyniki badań i ich omówienie

Pierwszy etap badań obejmował dobór warunków dla wytwarzania zewnątrzkomórkowej GOD na skrobi jako jedynym źródle węgla przez grzybnie *A. niger* unieruchomioną na pumeksie. W celu określenia optymalnej koncentracji skrobi w podłożu, hodowlę grzyba prowadzono w ciągu czterech cykli na różnych stężeniach tego wielocukru (w zakresie od 2 do 10%), przy codobowej wymianie pożywki. Z danych zawartych w tab. 1 (A) wynika, że największą aktywność GOD (1,63 U/ml), zawartość białka (2,05 mg/ml) i ilość suchej masy grzybni (57 g/l) wykazywał grzyb hodowany na pożywce z 6% zawartością skrobi i takiego stężenia cukru użyto w dalszych badaniach. Węglan wapnia warunkujący utrzymanie odpowiedniego odczynu podłoża jest dodawany do pożywki po zhydrolizowaniu skrobi przez grzybnie. Dla określenia czasu hodowli niezbędnego dla jego wprowadzenia do podłoża, prześledzono dynamikę hydrolizy skrobi przez immobilizowaną grzybnie *A. niger*. Po pierwszym cyklu hodowlanym proces hydrolizy skrobi przebiegał dość powolnie. Ulegała ona całkowitemu rozkładowi dopiero pod koniec całodobowej hodowli grzyba. W miarę upływu czasu hodowli (trzeci i czwarty cykl hodowlany) skrobia ulegała całkowitemu zhydrolizowaniu już po 12 godzinach (tab. 1B), w następstwie czego zwiększała się w podłożu ilość glukozy, osiągając maksymalny poziom 34 mg/ml. Aktywność glukoamylazy wydzielanej przez grzyba przyrastała regularnie w całym okresie hodowli, osiągając swoją maksymalną wartość (44,7 U/ml) po 24 godzinach. Ustalono, że czas wprowadzania węglanu do podłoża skrobiowego wyniósł dla pierwszego cyklu hodowlanego 24, a dla dalszych 12 godzin.

W następnym etapie prowadzono badania na hydrolizatach skrobiowych otrzymanych metodą enzymatyczną z wykorzystaniem unieruchomionych na szkle porowatym  $\alpha$ -amylazy i glukoamylazy. Nasze wcześniejsze doświadczenia (6), a także wyniki uzyskane przez innych autorów (4) wykazały, że grzybnia



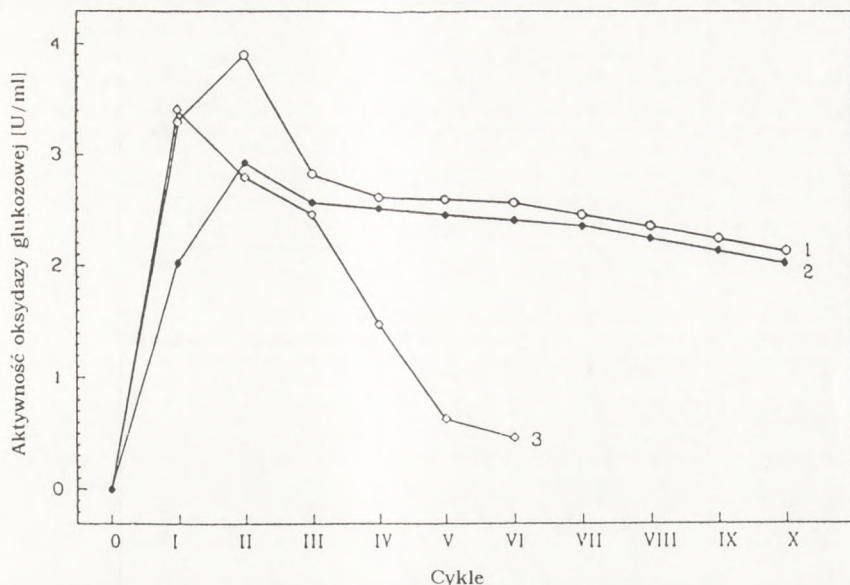
*A. niger* ma zdolność syntezy enzymów amylolitycznych warunkujących procesy hydrolizy skrobi. Wykorzystanie tej właściwości wydłuża jednak czas hodowli grzyba niezbędny do wytworzenia własnych amylaz. Z tego względu celowe jest przeprowadzenie hydrolizy skrobi przed wprowadzeniem pleśni do podłoża. W celu optymalizacji warunków hydrolizy skrobi zastosowano 11 wariantów uwzględniających różny stosunek  $\alpha$ -amylazy do glukoamylazy oraz odpowiedni odczyn środowiska reakcji (tab. 2). Najlepsze efekty jeśli chodzi o stopień scukrzenia skrobi (DE = 82,8%) uzyskano w wariantcie 7 w którym do hydrolizy tego polisacharydu preparaty  $\alpha$ -amylazy i glukoamylazy łączono w stosunku wagowym 1:5, a odczyn środowiska utrzymywano na poziomie pH = 5,0. Wybrany wariant wykorzystano w dalszych badaniach do otrzymywania hydrolizatów skrobiowych.

TABELA 1

WPLYW NIEKTÓRYCH PARAMETRÓW PODŁOŻA HODOWLANEGO NA WZROST IMMOBILIZOWANEJ NA PUMEKSIĘ GRZYBNI *A. NIGER*. TEMPO HYDROLIZY SKROBI ORAZ AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY GLUKOZOWEJ

(A)			
Badany czynnik:	Sucha masa grzybni (g/l)	Aktywność GOD (U/ml)	Białko (mg/ml)
Stężenie skrobi (%)			
2	43,5	0,60	1,35
4	55,5	0,75	1,85
6	57,0	1,63	2,05
8	56,0	0,95	1,35
10	55,5	0,85	1,32
(B)			
Badany czynnik:	Ilość skrobi	Zawartość glukozy (mg/ml)	Aktywność glukoamylazy (U/ml)
Czas hodowli (godz.)			
0	60,0	0,0	0,0
3	45,0	15,0	10,0
6	33,0	32,0	26,0
12	0,0	34,0	31,0
18	0,0	21,0	40,0
24	0,0	20,0	44,7

Dynamikę aktywności GOD na hydrolizacie skrobi przez unieruchomioną na pumeksie grzybnię *A. niger* w czasie 10-dobowych cykli hodowlanych przedstawiono na rys. 1. Hodowle prowadzone na glukozie i natywnej skrobi włączono dodatkowo jako próby kontrolne. Wykazano, że obecność hydrolizatu skrobi w podłożu sprzyjała wzrostowi aktywności GOD w porównaniu z pożywką skrobiową. W okresie trwania pierwszych dwóch cykli hodowla-

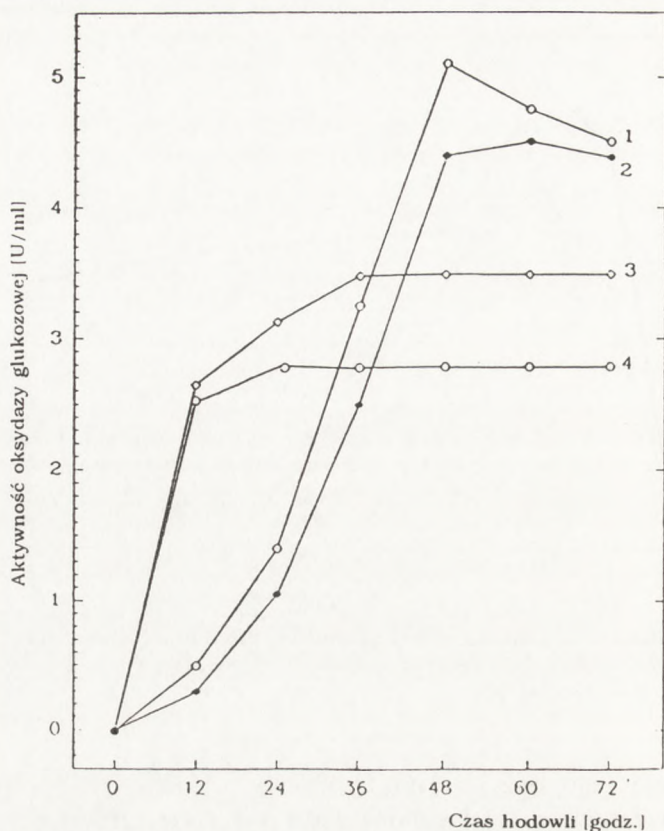


Rys. 1. Dynamika wytwarzania oksydazy glukozowej przez unieruchomioną grzybnię *A. niger* w ciągu 10-dobowych cykli hodowlanych na podłożach zawierających: 1- glukozę (8%), 2 — hydrolizat 6% skrobi, 3 — skrobieć (6%).

nych, aktywność tego enzymu na hydrolizacie sukcesywnie wzrastała, po czym następował niewielki jej spadek, aby następnie pozostać w okresie od III do X cyklu na prawie stałym poziomie. Po dziesiątym cyklu hodowlanym poziom aktywności GOD na hydrolizacie skrobi obniżył się jedynie o około 28% wobec aktywności maksymalnej uzyskanej przez ten enzym w II cyklu hodowli. Ubytek ten był jednak zdecydowanie mniejszy w porównaniu z tym jaki wystąpił na podłożu z niehydrolizowaną skrobią, gdzie osiągnął on wartość ponad 85% już w VI cyklu. W badaniach nad syntezą lizyny przez unieruchomione komórki *Corynebacterium glutamicum* (14), obserwowano dwukrotny spadek wyjściowej aktywności tych bakterii po czterech kolejnych cyklach hodowlanych. Porównanie aktywności GOD produkowanej przez grzybnię *A. niger* rosnącą na glukozie i hydrolizacie skrobiowym, wykazało wyższy poziom aktywności tego enzymu na podłożu z dodatkiem glukozy. Warto jednak podkreślić, że w początkowym okresie hodowli (cykl I i II) różnice te były znaczne (27,6%), po czym w dalszych jej etapach wyraźnie zmniejszyły się, osiągając w X cyklu jedynie 5%.

Przedmiotem kolejnych badań było porównanie aktywności GOD wytwarzanej przez wolną i unieruchomioną grzybnię *A. niger* hodowaną na pożywce z glukozą i hydrolizatem skrobiowym. Z danych zawartych na rys. 2 widać, że wolna grzybnia *A. niger* wykazywała na obydwu podłożach około 1,5 razy wyższą aktywność oksydazy glukozowej niż grzybnia immobilizowana, przy czym aktywności uzyskane przez wolną grzybnię na podłożu glukozowym były





Rys. 2. Porównanie aktywności oksydazy glukozowej grzybni *A. niger* wolnej i immobilizowanej na pumeksie, hodowanej na podłożu glukozowym i hydrolizacie skrobiowym.

1 — wolna grzybnia na roztworze 8% glukozy, 2 — wolna grzybnia na podłożu z hydrolizatem skrobi (6%), 3 — immobilizowana grzybnia na roztworze 8% glukozy, 4 — immobilizowana grzybnia na podłożu z hydrolizatem skrobi (6%).

średnio o 10% większe niż na hydrolizacie skrobiowym. Pomimo że aktywności GOD wydzielane przez grzybnię unieruchomioną nie osiągnęły na hydrolizacie skrobiowym tak znacznego poziomu jak w przypadku grzybni wolnej, to jednak ta pierwsza jest bardziej stabilna i uzyskuje swoje maksimum syntezy enzymu już po 24 godzinach (produktywność = 0,11 U/ml/godz.), podczas gdy wolna grzybnia w tych warunkach osiąga je dopiero po 60 godzinach (produktywność = 0,075 U/ml/godz.). Ponadto grzybnia immobilizowana może być z równie dużą wydajnością wykorzystywana wielokrotnie, przynajmniej przez VII – X dobowych cykli. Jej zaletą jest również to, że można ją łatwo oddzielić od produktów katalizowanej reakcji.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że uzyskane wyniki potwierdzają dużą przydatność hydrolizatów skrobi ziemniaczanej do celów efektywnej biosyntezy oksydazy glukozowej zarówno przez wolną jak i unieruchomioną grzybnię *A. niger*. Wydaje się również, że zastosowane źródło węgla może z dobrym

skutkiem zastąpić tradycyjnie używaną do produkcji tego enzymu glukozę, przyczyniając się przez to do zwiększenia jego produkcji.

TABELA 2  
OPTIMALIZACJA PROCESU HYDROLIZY\* SKROBI  
PRZY UŻYCIU UNIERUCHOMIONYCH NA SZKLE POROWATYM ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH

Wariant	Preparat enzymatyczny (mg)		pH	Stopień scukrzenia DE (%)
	$\alpha$ -amylaza	glukoamylaza		
1	300,0	0,0	5,6	0,0
2	0,0	300,0	4,5	45,0
3	150,0	150,0	5,0	53,0
4	99,9	200,1	5,0	72,0
5	75,0	225,0	5,0	81,0
6	60,0	240,0	5,0	81,0
7	50,1	249,9	5,0	82,8
8	200,1	99,9	5,0	46,8
9	225,0	75,0	5,0	52,2
10	240,0	60,0	5,0	46,8
11	249,9	50,1	5,0	46,8

\* — warunki hydrolizy: kolby stożkowe à 300 ml zawierające 50 ml 6% roztworu skrobi, temperatura 30°C, czas 4 godz., wytrząsanie (200 obr./min).

## 4. Wnioski

1. Zoptymalizowano wytwarzanie oksydazy glukozy na hydrolizacie skrobiowym poprzez wielokrotne użycie immobilizowanej grzybni *A. niger*. Zastosowanie amylaz do hydrolizy skrobi w podłożu umożliwiło efektywne wykorzystanie grzybni do syntezy oksydazy glukozy w ciągu 10-dobowych cykli przy stosunkowo nieznacznym tylko zmniejszeniu (o 28%) aktywności tego enzymu.

2. Wykazano, że aktywność wydzielanej do podłoża oksydazy glukozy przez wolną grzybnię *A. niger* jest około 1,5 razy wyższa aniżeli przez grzybnię unieruchomioną na pumeksie. Ta ostatnia jest jednak bardziej stabilna, szybciej uzyskuje swoje maksimum syntezy enzymu i może być wykorzystana z równie dużą wydajnością, przynajmniej przez siedem kolejnych cykli hodowlanych.

## Literatura

1. Nakamatsu T., Akamatsu T., Miyajima R., Shio J., (1975), Agr. Biol. Chem., 39, 1803 – 1811.
2. Fiedurek J., Ilczuk Z., (1993), Post. Mikrobiol., 32, 33 – 51.



3. Bolach E., Leśniak W., (1982), *Przem. Ferm. Owocowo-Warzywny*, 26(11 - 12), 38 - 41.
4. Bolach E., Leśniak W., Ziobrowski J., (1985), *Acta Aliment. Polon.*, 11, 97 - 104.
5. Lakshminarayanan K., US Patent (1972), 3701175.
6. Fiedurek J., (1991), *Acta Microbiol. Polon.*, 40, 197 - 203.
7. Rogalski J., Dawidowicz A., Jamroz J., (1993), *Acta Biotechnol.*, (w druku).
8. Fiedurek J., Ilczuk Z., (1991), *Word J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 379 - 384.
9. Fiedurek J., Rogalski J., Ilczuk Z., Leonowicz A., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 734 - 736.
10. Paszczyński A., Miedziak J., Łobarzewski J., Kochmańska J., Trojanowski J., (1982), *FEBS Letters*, 149, 63 - 66.
11. Lloyd J.B., Whelan W.J., (1969), *Anal. Biochem.*, 30, 467 - 470.
12. Schacterle G.R., Pollack R.L., (1973), *Anal. Biochem.*, 51, 654 - 655.
13. Miller G.L., (1959), *Anal. Chem.*, 31, 426 - 428.
14. Moszczyński P., Gołąbczak J., Nyks G., Zimińska M., (1991), *Przem. Ferm. Owocowo-Warzywny*, 35(2), 11 - 13.

### Utility of starch raw materials for biosynthesis of glucose oxidase by *Aspergillus niger*

#### Summary

Potato starch and its hydrolyzates were used to substitute glucose carbon sources to synthesize glucose oxidase (GOD) by free and immobilized on pumice stones *A. niger* mycelium. The basic conditions for starch hydrolysis, securing the maximal enzyme yields, were optimized. The immobilized *A. niger* mycelium was able to produce the enzyme at a small loss of its activity (about 28%) during ten 24-h batches. Free mycelium produced about 1.5 times higher GOD activity than the immobilized mycelium on glucose and starch hydrolyzates. However, the latter was more stable, reaching faster the maximum of enzyme productivity, and it could be used many times with almost the same efficiency. Thus, the total enzyme yields produced by immobilized mycelium were much higher than those obtained using the free one.

#### Key words:

glucose oxidase, *Aspergillus niger*, starch hydrolyzates, free and immobilized mycelium, pumice stone.

#### Adres dla korespondencji:

Jan Fiedurek, Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.