

## Vplyv zloženia kukuričného výluhu na produkciu $\alpha$ -amylázy kultúrou *Bacillus subtilis*

JURAJ ZEMEK — JOZEF AUGUSTÍN — LUDOVÍT KUNIAK — OLGA BUČKOVÁ

**Súhrn.** Práca sa zaoberá vplyvom zloženia fermentačnej pôdy, predovšetkým jednotlivých zložiek kukuričného výluhu na produkciu  $\alpha$ -amylázy pomocou produkčného kmeňa *Bacillus subtilis*. Porovnáva sa zloženie 18 kukuričných výluhov použitých v prevádzke Slovenské škrobárne, n. p., Trnava, závod Dolná Krupá, v rokoch 1979—1980. Popri tvorbe  $\alpha$ -amylázy sa sledujú aj ďalšie hydrolázové enzýmy, ako tvorba  $\beta$ -glukanázy a proteolytická aktivita. Uvedené enzýmové aktivity sa stanovujú pomocou chromolytických substrátov na báze sieťovaných biopolymérov.

Bakteriálna  $\alpha$ -amyláza patrí medzi prvé známe a popri proteázach druhé najdôležitejšie priemyselné enzýmy. S produkciou bakteriálnej  $\alpha$ -amylázy sa stretávame už roku 1920. U nás sa produkciou tohto enzýmu zaoberala Bendová [1].

Použitím syntetických pôd pre experimentálne laboratórne práce sa dosiahla štandardizácia kultivačných pôd, čo nemožno dosiahnuť používaním bežných priemyselných pôd. Syntetické pôdy Yeast Nitrogen Base (YNB) a merkaptoacetátová sa ukázali ako vhodné pre väčšinu testovacích mikroorganizmov s prípadnou modifikáciou pre špecifické požiadavky jednotlivých mikroorganizmov, ako napr. úprava pH a pod. V priemyselnej prevádzke pri produkcii  $\alpha$ -amylázy *Bacillus subtilis* sa používajú dva typy základných fermentačných pôd. Základným zdrojom dusíka sú vodné zahustené kukuričné výluhy, prípadne gluténové výpalky, resp. kombinácia oboch. Pôda obsahuje okrem spomínaných zdrojov uhlíka a dusíka aj fosforečnan dvojamónny, odpeňovací olej a vodu.

Produkcia  $\alpha$ -amylázy je všeobecnou vlastnosťou *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. natto*, *B. circulans*, *B. macerans*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus* a *B. brevis*, ako opisujú Borris a spol. (1980) a Zemek a spol. (1981). Pazlarová a Fencel (1978) rozlišujú u *B. subtilis* morfológicky podmienené produkčné varianty s charakteristicky lesklými, priesvitnými kolóniami špecifickej aktivity produkcie okolo 5 U/mg a neprodukčné varianty (okolo 1,5 U/mg), vytvárajúce matne biele kolónie. Zemek a Augustín (1980) dokázali, že sieťovaná

Ing. Juraj Zemek, CSc., PhMr. Jozef Augustín, Ing. Ludovít Kuniak, CSc., Ing. Olga Bučková, Chemický ústav Centra chemického výskumu SAV, Dúbravská 9, 842 38 Bratislava.

amylaza sa môže utilizovať ako C-zdroj iba v prítomnosti producenta  $\alpha$ -amylázy a to využili na selekciu produkčných kmeňov. Predkladaná práca sa zaoberá charakterizáciou kukuričných výluhov a vplyvom ich zloženia na produkciu extracelulárnych enzýmov, predovšetkým  $\alpha$ -amylázy.

### Experimentálna časť

#### Použité chemikálie a suroviny

Kukuričný výluh, 18 rôznych preparátov poskytli Slovenské škrobárne, n. p., Trnava, závod Dolná Krupá. Všetky použité aminokyseliny boli od fy SERVA. Škrob a ostatné chemikálie, ktoré sa pri stanoveniach používali, boli p. a. (Lachema, Brno).

#### Použité chromolytické substráty

SPOFA TEST  $\alpha$ -amyláza (Slovakofarma, Hlohovec), kompletný tabletový test, ktorý obsahuje chromolytický sieťovaný škrob, albumín hovädzieho séra, chlorid sodný, zložky tlmivého roztoku a mikrokryštalickú celulózu [6].

S-TEST PROTEÁZA UNIVERZÁL (ChZJD, n. p., Bratislava) na báze chromolytických proteínov, obsahujúcich 10 % kovalentne viazaného Remazol Brilliant Blue R, sieťovaných 2-chlórmetyloxiránom (2 %), pripravené z albumínu hovädzieho séra (BSA) [7]. Keďže pri proteolytických enzýmoch nie je k dispozícii ani jeden prírodný substrát, zvolená jednotka aktivity zodpovedá 1 mg hydrolytický rozštiepeného proteínu 1 l účinného roztoku za 1 h pri 37 °C.

$\beta$ -1,4-xylán z *Fagus silvaticus*, na stanovenie xylanázovej aktivity, sieťovaný 2-chlórmetyloxiránom (2 %) a farbený kovalentne viazaným Remazol Brilliant Blue R [8].

Celuláza (Cx) sa stanovila pomocou sieťovanej a farbenej hydroxyetylcelulózy [8].

Lichenan na stanovenie  $\beta$ -glukanázovej aktivity, sieťovaný a farbený (pozri  $\beta$ -1,4-xylán [8]).

#### Použité mikroorganizmy

Produkčný kmeň *Bacillus subtilis* CCM 2722 poskytla Československá zbierka mikroorganizmov Brno a prevádzka Slovenských škrobární, n. p., Trnava, závod Dolná Krupá.

#### Charakterizácia kukuričných výluhov

Pôsobením roztoku 0,02 mol/l  $\text{BaCl}_2$  na vodný roztok kukuričného výluhu dochádza k vyzrážaniu bárnatých solí karboxylových kyselín za súčasného uvoľnenia ekvivalentného množstva kyseliny chlorovodíkovej. Kyselina chlorovodíková sa stanovila titráciou roztoku 0,02 mol/l NaOH.

Glukóza sa stanovila glukozooxidázovým testom Combination Glucose (Bergmeyer a Bernt, 1970). Aminokyseliny sa stanovili automatickým analyzátorom aminokyselín (Vývojové dílny ČSAV, typ 6020). Sušina v rôznych kukuričných výluhoch sa stanovila obvyklým vážkovým spôsobom. Hodnota pH sa stanovila na pH-metri OP-205.

### Hydrolyza kukuričných výluhov

Zo vzoriek vodných roztokov kukuričných výluhov sa odpipetuje po 1 ml, pridá sa 1 ml koncentrovanej HCl a nechá hydrolyzovať na olejovom kúpeli 8 h pri 100 °C. Napokon sa vzorky za súčasného zriedovania destilovanou vodou odparili na vákovej odparke do sucha, až kým nevykazovali neutrálnu reakciu.

### Zloženie pôd pre kultivácie

Fosforečnan dvojamonny	10 g,
škrob rozpustný	20 g,
destilovaná voda	do 1000 ml,
pH (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	6,6.

Do pripravenej pôdy rozdelenej po 50 ml v 250 ml kónických bankách sa pridalo 0,5 g z 18 rozličných kukuričných výluhov.

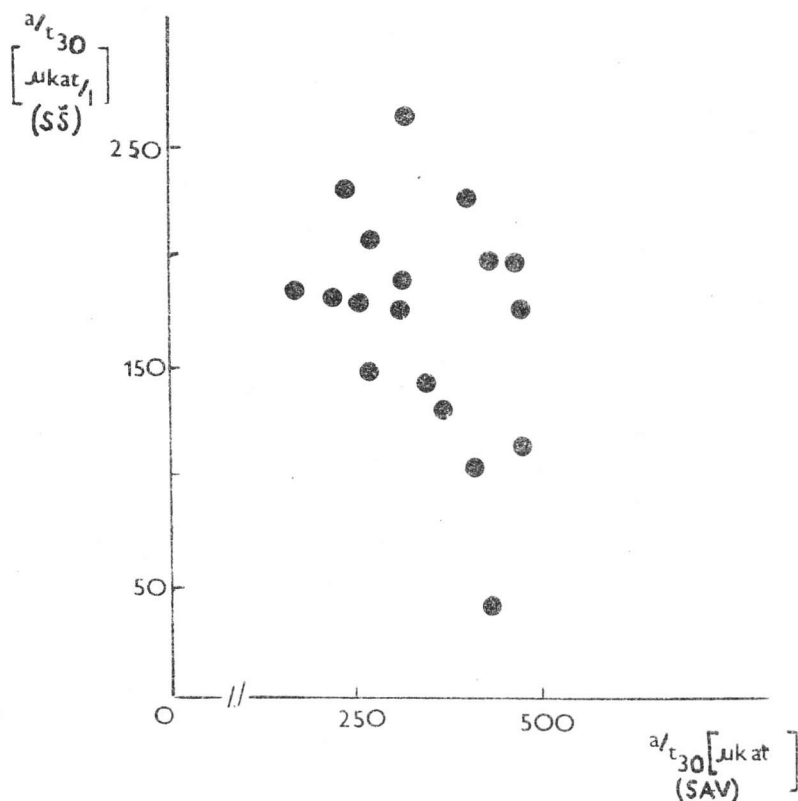
Pri syntetických pôdach sa prípravok kukuričného výluhu simuloval návažkami jednotlivých aminokyselín.

Očkovovalo sa 0,5 ml 24-hodinového inokula z laboratórnej propagácie. Kultivácia prebiehala na rotačnej trepačke (100 min<sup>-1</sup>) pri 37 °C. Priebeh rastu sa sledoval meraním absorbancie kultivačnej pôdy, ktorá je za aproximálnych podmienok priamo úmerná počtu buniek v objemovej jednotke. Na meranie sa používal spektrofotometer SPEKTROMOM 361 pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako porovnávacie roztoky sa použili príslušné pôdy.

### Výsledky a diskusia

Sledovala sa produkcia  $\alpha$ -amylázy na pôdach z 18 rôznych kukuričných výluhov ako zdrojov dusíka, ktoré sa použili v Slovenských škrobárňach. V laboratórnom usporiadaní fermentácie sa zistili vyššie aktivity  $\alpha$ -amylázy ako pri priemyselnom usporiadaní, a to vo všetkých použitých kukuričných výluhoch, čo svedčí o veľkých rezervách, ktoré sú pri výrobe  $\alpha$ -amylázy pomocou kmeňa *Bacillus subtilis* CCM 2722 (obr. 1).

Disproporcie medzi produkciou  $\alpha$ -amylázy v 30. hodine fermentácie ( $t_{30}$ ) v priemyselnom a laboratórnom usporiadaní demonštruje obrázok 1. Tieto rozdiely



Obr. 1. Korelácia medzi zistenou tvorbou  $\alpha$ -amylázy v priemyselných (SŠ) a laboratórnych podmienkach (SAV) na jednotlivých pôdach s kukuričným výluhom [ $\mu\text{kat/l}$ ].

Fig. 1. A correlation between  $\alpha$ -amylase production determined in industrial conditions (SŠ) and in laboratory conditions (SAV) in single media with maize extract (in  $\mu\text{kat/l}$ ).

možno vysvetliť technologickou disciplínou a rozdielmi v kvalite surovín, predovšetkým použitých kukuričných výluhov, a to tak vzhľadom na sušinu, ako aj obsah voľných kyselín a aminokyselinového zloženia, keď sa v niektorých prípadoch variačný koeficient ( $V_k$ ) blíži, až presahuje 30 % (tab. 1, 2). V prípade alanínu, koncentrácia ktorého vo fermentačných pôdach sa dáva do súvisu s inhibičným účinkom na produkciu  $\alpha$ -amylázy [10], z tabuľky 2 vidieť, že  $V_k$  v rámci  $n=18$ , je 18,07 %. Túto okolnosť treba pripísať nedostatočnej špecifikácii na použitú surovinu vstupujúcu do technologického procesu, a tým nedostatočnej vstupnej kontrole.

Kým pri priemyselných fermentáciách  $V_k$  v aktivite získanej  $\alpha$ -amylázy sa rovnal približne 23 %, v laboratórnych fermentáciách bol 12,06 % (tab. 3).

V aktivitách proteolytických enzýmov v rámci  $n=18$  sa prejavila širšia variabilita ako v aktivitách amylolytických enzýmov. Maximálna rýchlosť tvorby  $\alpha$ -amylázy

Tabuľka 1. Analýza kukuričných výluhov na sušinu a obsah voľných kyselín ( $n=18$ )  
Table 1. An analysis of maize extracts for a dry matter and a content of free acids ( $n=18$ )

	$\bar{x}$	$S_x$	$V_k$
Sušina	68,85	2,22	2,76
Z	24,25	1,74	7,18

Z — spotreba roztoku 0,02 mol/l NaOH (ml) na titráciu voľných kyselín,  $\bar{x}$  — priemer výsledkov paralelných analýz,  $S_x$  — smerodajná odchýlka.

Tabuľka 2. Analýza obsahu aminokyselín v kukuričných výluhoch ( $n=18$ )  
Table 2. An analysis of the amino acid content in maize extracts ( $n=18$ )

Aminokyselina	$\bar{x}$ [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$S_x$ [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$V_k$ [%]
Lys	90,61	25,89	28,46
His	43,83	11,60	26,47
Arg	84,10	17,04	20,25
Asp	151,98	35,87	23,60
Thr	84,49	13,58	16,08
Ser	121,58	17,09	14,04
Glu	253,15	88,01	34,76
Pro	175,34	31,11	17,75
Gly	167,79	23,86	14,22
Ala	214,46	38,76	18,07
Val	63,95	23,25	36,36
i-Leu	54,75	11,36	20,77
Leu	153,09	40,12	25,87
Tyr	45,63	12,19	26,73
Phe	52,83	1,49	2,82

Tabuľka 3. Vplyv zloženia kukuričného výluhu na reprodukovateľnosť fermentačného procesu v laboratórnom a priemyselnom usporiadaní

Table 3. An influence of a composition of maize extract on reproducibility of the fermentation process in laboratory and industrial systems

Aktivita $\alpha$ -amylázy	$\bar{x}$	$S_x$	$V_k$
Priemyselné usporiadanie [ $\text{DA} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	109 720	32 450	22,86
Laboratórne usporiadanie [ $\mu\text{kat/l}$ ]	409,2	59,4	12,06

Približný prepočet:  $1 \mu\text{kat/l} = 60 \text{ U/l} = 6 \text{ DA} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

posunutá proti maximálnej rýchlosti rozmnožovania buniek o +2 h, kým v prípade proteolytickej aktivity tento rozdiel dosahuje až 20 h (tab. 4).

Z tabuľky 5 vyplýva, že za pokles  $\alpha$ -amylázovej aktivity v produkčnom médiu počas fermentačného procesu možno pokladať prítomnosť pomerne vysokej proteolytickej aktivity.

Tabuľka 4. Sledovanie tvorby amylázy a proteáz v závislosti od prírastku biomasy ( $n=18$ )  
Table 4. Amylase and protease production dependence on biomass increase ( $n=18$ )

	$\bar{x}$ [h]	$S_x$ [h]	$V_k$ [%]
$\left(\frac{dN}{dt}\right)_{\max} - \left(\frac{da}{dt}\right)_{\max}$	2,02	0,94	46,78
$\left(\frac{dN}{dt}\right)_{\max} - \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\max}$	19,20	5,24	27,29
$\left(\frac{da}{dt}\right)_{\max} - \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\max}$	17,18	5,31	26,35

$N$  — počet buniek v 1 litri;  $a$  — aktivita  $\alpha$ -amylázy [ $\mu$ kat/l],  $P$  — proteolytická aktivita [j/l].

Tabuľka 5. Vplyv zloženia kukuričného výluhu na proteolytickú aktivitu vo fáze primárneho poklesu  $\alpha$ -amylázovej aktivity za produkčným maximom

Table 5. An influence of maize extract composition on proteolytic activity in a phase of the primary decrease of an  $\alpha$ -amylase activity after the production maximum

Aktivita proteáz	$\bar{x}$ [j/l]	$S_x$ [j/l]	$V_k$ [%]
$\left(\frac{da}{dt}\right) < 0$	3666,4	1076,19	29,35
$\left(\frac{da}{dt}\right)_{\max} \leq 0$	35,15	1100	31,31

Tabuľka 6. Zmena koncentrácie D-glukózy vo fermentačných pôdach s rôznym zložením kukuričných výluhov

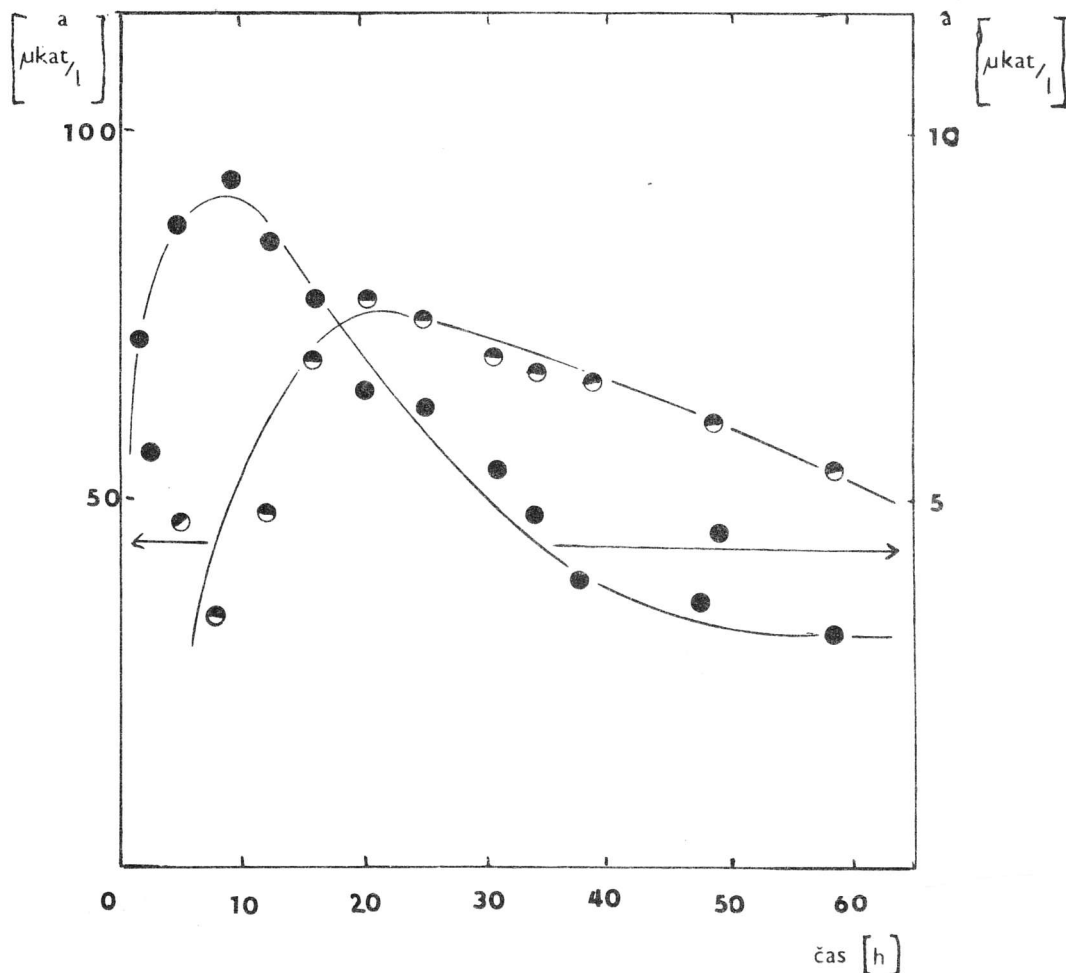
Table 6. A change of the D-glucose concentration in fermentation media with different compositions of maize extracts

Vzorka	Čas [h]		Koncentrácia glukózy [mg/ml]		
	$C_{Glc} = \max, C_{Glc} = 0$		$t_{\max a}$	$\left(\frac{da}{dt_{\max}}\right) \leq 0$	$\left(\frac{da}{dt}\right) < 0$
1	16	48	0	0	0
2	16	42	11,26	0	0
3	16	44	13,88	10,8	5,0
4	16	48	2,64	0,4	0
5	16	50	9,92	0	0
6	16	46	0	0	0
7	16	46	0	0	0
8	16	50	52,94	0	0
9	16	47	0	0	0
10	16	58	3,7	10,4	5,6
11	16	46	0	0	0
12	16	44	0	0	0

$C_{Glc}$  — koncentrácia glukózy mg/ml,  $t_{\max a}$  — čas, za ktorý dosiahne aktivita  $\alpha$ -amylázy maximum [h].

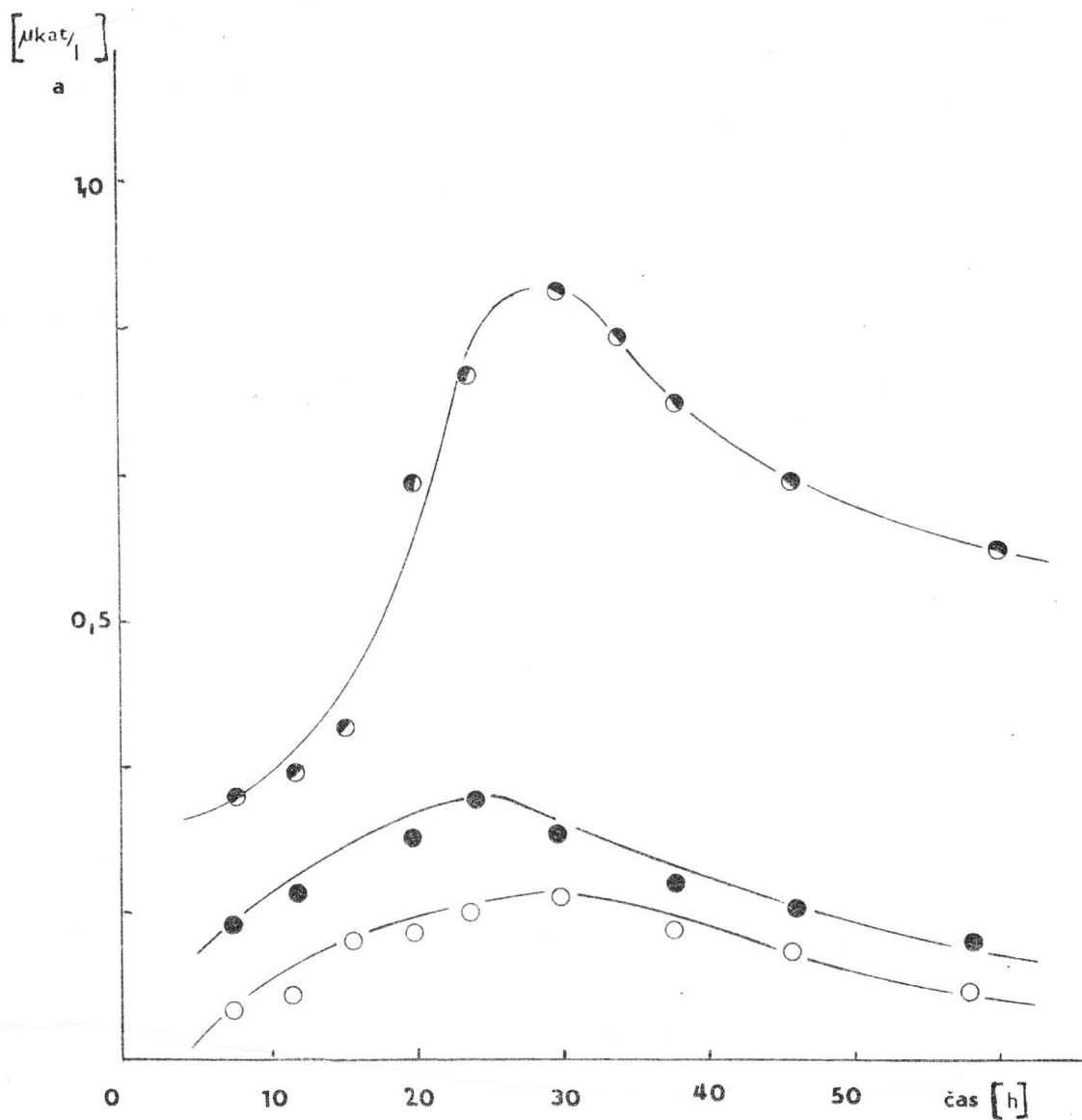
Pri analýze 18 rôznych kukuričných výluhov sa nedokázala glukóza ani iné cukry. Glukóza teda pochádzala iba zo škrobu ako zložky fermentačnej pôdy a úplne sa spotrebovala v priebehu 42—58 h pre pôdy s rôznym zložením kukuričného výluhu, ako vyplýva z tabuľky 6. v  $t_{\max}$  a koncentrácia glukózy bola už veľmi nízka až nulová.

Vplyv alanínu na produkciu  $\alpha$ -amylázy sa simuloval na syntetickej pôde aminokyselínového zloženia zodpovedajúceho priemernej vzorky kukuričného výluhu



Obr. 2. Vplyv alanínu na produkciu  $\alpha$ -amylázy na syntetických pôdach zodpovedajúcich aminokyselínovému zloženiu priemernej vzorky kukuričného výluhu (tab. 2) s výnimkou alanínu. a) ● — aktivita  $\alpha$ -amylázy na pôde zodpovedajúcej kukuričnému výluhu s 253  $\mu\text{mol/g}$  alanínu; b) ○ — aktivita  $\alpha$ -amylázy na pôde zodpovedajúcej kukuričnému výluhu s 173  $\mu\text{mol/g}$  alanínu. Popri aminokyselinách obsahovali pôdy fosforečnan dvojамонný a škrob, ako je uvedené v experimentálnej časti.

Fig. 2. An influence of alanine on the  $\alpha$ -amylase production in synthetic media corresponding to the amino acid composition of an average sample of maize extract (Table 2) with exception of alanine. a) ● —  $\alpha$ -amylase activity in a medium corresponding to maize extract with 253  $\mu\text{mol/g}$  of alanine; b) ○ —  $\alpha$ -amylase activity in a medium corresponding to maize extract with 173  $\mu\text{mol/g}$  alanine. Besides amino acids, the media contained biammonium phosphate and starch (see the experimental part).



Obr. 3. Produkcia  $\beta$ -1,4-xylanázy (○),  $\beta$ -glukanázy (●) a celulázy (●) pomocou *Bacillus subtilis* na pôde B (pozri obr. 2).

Fig. 3. Production of  $\beta$ -1,4-xylanase (○),  $\beta$ -glucanase (●) and cellulase (●) by means of *Bacillus subtilis* in the medium b (see Fig. 2).



(tab. 2). S výnimkou alanínu, ktorého koncentrácia bola v prvom prípade o 18 % vyššia a v druhom prípade o 18 % nižšia ako pri priemernej vzorke, čo zodpovedalo nami zistenému rozptylu obsahu alanínu. Toto zistenie potvrdzuje skutočnosť, že aminokyselinové zloženie, v uvedenom prípade obsah alanínu vo fermentačnej pôde, rozhodujúcou mierou ovplyvňuje schopnosť *B. subtilis* produkovať  $\alpha$ -amylázu (obr. 2).

Popri  $\alpha$ -amylolytickej a proteolytickej aktivite sa *Bacillus subtilis* CCM 2722 vyznačuje nezanedbateľnou produkciou  $\beta$ -1,4-xylanázovej a  $\beta$ -glukanázovej (liche-názovej) a celulózovej aktivity (obr. 3).

Jednotlivé fermentačné pôdy sa odlišovali zdrojom dusíka, ktorým boli kukuričné výluhy rôzneho zloženia aminokyselín, voľných kyselín a sušiny. Tieto kukuričné výluhy sa použili ako zdroje dusíka aj v priemyselných podmienkach, kde sa v porovnaní s laboratórnymi podmienkami dosiahli až dvakrát nižšie aktivity  $\alpha$ -amylázy. Aktivita  $\alpha$ -amylázy dosiahla maximum v odlišných fermentačných pôdach v rôznom čase fermentačného procesu, keď sa bunky *Bacillus subtilis* nachádzali v stacionárnej fáze rastu a proteolytická aktivita v tomto čase ešte nedosahovala maximum. Po dosiahnutí maximálnej proteolytickej aktivity  $\alpha$ -amylázová aktivita vo fermentačnom médiu klesala, z čoho sa dá usúdiť, že aj vysoká proteolytická aktivita negatívne vplývala na produkciu  $\alpha$ -amylázy.

Pri sledovaní zmeny pH v priebehu fermentačného procesu pre  $n = 18$  sme zistili, že vo všetkých prípadoch pH z východiskovej hodnoty 6,6 kleslo; od dosiahnutia maximálnej aktivity  $\alpha$ -amylázy až do 84 h fermentačného procesu sa pH pôdy takmer nezmenilo.

V laboratórnom usporiadaní na základe 18 rôznych kukuričných výluhov, ktoré sa predtým použili v priemyselných podmienkach, sme zistili vyššie aktivity  $\alpha$ -amylázy. To svedčí o veľkých rezervách, ktoré treba hľadať v racionalizácii jednotlivých krokov fermentačného procesu a v priebežnom sledovaní amylolytickej a proteolytickej aktivity.

Ako nasvedčujú naše výsledky, proteolytická aktivita sa zrejme zúčastňuje na poklese  $\alpha$ -amylázovej aktivity, a to tak pri predlžovaní fermentácie, ako aj pri ďalšom spracovaní fermentačnej pôdy. Ako vyplýva z našich výsledkov, kým má kukuričný výluh zostať základom fermentačnej pôdy je nevyhnutné, presnejšie charakterizovať jeho zloženie a uviesť, či je vhodný pre daný typ fermentačnej výroby. Skutočnosť, že popri  $\alpha$ -amyláze fermentačná pôda obsahuje aj niektoré ďalšie hydrolázy biopolymérov, poskytuje alternatívne riešenie izolácie uvedených enzýmov v čistom stave pomocou afinitnej metódy.

## Literatúra

1. BENDOVIÁ, O.: Záverečná správa VÚPS, Bratislava 1962.
2. BORRISS, R. — ZEMEK, J. — AUGUSTÍN, J. — KUNIAK, L.: Zbl. Bakt. II. Abt., 135, 1980, s. 435.
3. ZEMEK, J. — AUGUSTÍN, J. — BORRISS, R. — KUNIAK, L. — ŠVÁBOVÁ, M. — PÁČOVÁ, Z.: Folia Microbiol. 26, 1981, s. 403—407.
4. PAZLAROVÁ, J. — FENCL, Z.: Zjazd Čs. Spol. mikrobiol., Praha 1978. Abstrakt, s. 149.
5. ZEMEK, J. — AUGUSTÍN, J.: Ann. AdW DDR, 1980, č. 3, s. 47.
6. GERGEL, J. — JANIŠ, J. — KUNIAK, L. — ZEMEK, J.: Biochem. clin. bohemoslov., 3, 1980, s. 195.
7. ZEMEK, J. — KUNIAK, L.: A. O. 194592, 1979.
8. KUNIAK, L. — ZEMEK, J.: A. O. 192202, 1979.
9. BERGMAYER, H. U. — BERNT, E.: Methoden der enzymatischen Analyse 1970, s. 1173—1179.
10. FUKUMOTO, J. — TSURU, D. — YAMAMOTO, T.: Koso Kagaku Shinposjiumu, 15, 1961, s. 163—170.

### **Влияние состава ферментативной среды на продукцию альфа-амилазы *Bacillus subtilis***

#### Резюме

В предлагаемой работе рассматривается влияние состава ферментативной среды, прежде всего отдельных составляющих кукурузной вытяжки на продукцию альфа-амилазы при помощи производственного штамма *Bacillus subtilis*. Сравнивается состав 18-ти кукурузных вытяжек, использовавшихся в производстве на заводе «Долна-Крупа», Словацкой крахмальной промышленности н. п. Трнава в период 1979—1980 гг. Наряду с образованием альфа-амилазы, изучались и другие гидролазные ферменты, как, например, образование бета-глюканазы и протеолитическая активность. Упомянутые ферментные активности устанавливались при помощи хромолитических субстратов на базе сшитых биополимеров.

### **The influence of fermenting medium composition on $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis***

#### Summary

Authors of this article study the influence of fermenting medium composition analyzing especially the influence of single components of maize extract on  $\alpha$ -amylase production by the strain *Bacillus subtilis*. They compare here the composition of 18 maize extracts that were made use of at the Slovak Starch Factory (Slovenské škrobárne), national enterprise, Trnava, plant Dolná Krupá, during the years 1979—1980. Also other hydrolase enzymes, such as  $\beta$ -glucanase and also proteolytic activity are subject of investigation here. Activities of these enzymes are determined on the basis of crosslinked biopolymers as chromolytic substrates.