

***Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 – nový producent amyláz**

VALTER VOLLEK – BOHUMIL ŠKÁRKA – IVANA MAJERÍKOVÁ  
MARGITA ČANIGOVÁ

Súhrn. Autori izolovali nový kmeň *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 produkujúci amylázy, ktorý v laboratórnych podmienkach pri kultivácii na trepačke v médiu zloženom z anorganických solí a kukuričného šrotu, prípadne iných druhov škrobu, produkuje priemerne 1000 nkat  $\alpha$ -amylázy a 300–350 nkat glukoamylázy na 1 ml kultivačného média.

Kmeň neprodukuje toxické látky a produkované enzýmy sa dajú využiť v potravinárskom priemysle.

V ostatnom čase sa prudko rozvíjajú odvetvia biotechnológie pripravujúce a vyrábajúce najmä enzýmy. Na našom pracovisku sa za ostatné štyri roky intenzívne zaoberáme skúmaním rôznych výživových a kultivačných faktorov vplývajúcich na produkciu a aktivitu mikrobiálnych enzýmov. Popri optimalizácii kultivačných procesov už známych producentov sa zaoberáme aj hľadaním nových producentov a ich izoláciou z prirodzených substrátov. V tomto smere sa zaoberáme najmä screeningom vláknitých húb produkujúcich amylolytické enzýmy, najmä  $\alpha$ -amylázu a glukoamylázu, ktoré sa dajú využiť v potravinárskom priemysle.

Amylolytické enzýmy štiepia škrob na nižšie jednotky – dextríny, maltodextríny, maltotriózu až glukózu. Podľa miesta účinku na polysacharidovom reťazci sa amylázy delia na  $\alpha$ -amylázy, ktoré štiepia väzby  $\alpha$ -(1-4) -D-glukozidové väzby škrobu,  $\beta$ -amylázy, ktoré hydrolyzujú  $\alpha$ -(1-6) [4, 5, 7–9], glukoamylázy, ktoré štiepia  $\alpha$ -(1-3),  $\alpha$ -(1-4) a  $\alpha$ -(1-6) glykozidické väzby [5, 6] a izoamylázy, ktoré sú takmer zhodné s  $\alpha$ -amylázami a glukoamylázami, líšia sa iba substrátovou špecificitou [5, 10]. Štiepia  $\alpha$ -(1-6) -D-glukozidové väzby.

Amylázy produkujú baktérie, kvasinky a vláknité huby. Z baktérií sa na výrobu enzýmov najviac využívajú druhy rodu *Bacillus*, najmä *B. subtilis*, z

---

RNDr. Valter Vollek, doc. Ing. Bohumil Škárka, DrSc., Ing. Margita Čanigová, Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Ivana Majeríková, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

kvasiniek rody *Endomyces*, *Endomycopsis* a *Lipomyces*, z vláknitých húb najviac rod *Aspergillus*, a to druhy *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. batatae*, *A. flavus* a iné.

Amylázy, ktoré sa používajú v potravinárskom priemysle, musia mať vysokú aktivitu, nesmú obsahovať biomasu ani spóry producenta a nesmú ich produkovať toxínogénne kmene.

Doteraz sme izolovali viac ako 200 kmeňov, z nich dva vysokoprodukčné, *Aspergillus niger* IV-123, CCM F 801 a *A. oryzae* IV-477, CCM 8005. O prvom sme referovali v [1–3], o druhom referujeme v tomto príspevku.

## Materiál a metódy

**Pôvod izolovaných kultúr.** Všetky kultúry húb s amylolytickou aktivitou, ktoré sme ďalej vyšetrovali, sme izolovali z rôznych odpadov obsahujúcich kukuričný škrob zo Slovenských škrobární, n.p., závod Boleráz. Vzorky sme odoberali zo skladovacích síl, z prevádzky mokrého mletia, z výroby pudingo- vých práškov a z čističky odpadovej vody.

**Základný screening.** Vzorky materiálov a substrátov sme suspendovali v sterilnom fyziologickom roztoku, trepali 1 hodinu na recipročnej trepačke a po zriedení sme ich očkovali na mäsopeptónový agar (MPA) s 20 g.l<sup>-1</sup> škrobu. Inkubovali sme ich 4–5 dní v termostate pri 28 °C. Po vyrastení kolónie sme na časť jej okraja aplikovali Lugolov roztok. Kolónie húb, pri ktorých sme zistili amylolytickú aktivitu, sme preočkovali na šikmý sladinkový agar. Aktivitu produkovaných amylolytických enzýmov, najmä  $\alpha$ -amylázy a glukooamylázy, sme stanovovali v médiu po submerznej kultivácii izolovaných húb.

Na submerznú kultiváciu izolovaných húb sme použili médium tohto zloženia: NaNO<sub>3</sub> – 3 g, MgSO<sub>4</sub> – 0,5 g, KCl – 0,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,2 g, FeSO<sub>4</sub> – 0,01 g, CaCl<sub>2</sub> – 0,5 g, melasa – 1,25 g, kukuričný šrot – 20,0 g, voda – 1,0 l.

Namiesto kukuričného šrotu alternatívne používame iné zdroje uhlíka. pH kultivačného média upravujeme roztokom KOH na  $6,8 \pm 0,2$ .

Izolovaný *A. oryzae* CCM 8005 sme kultivovali v 100 ml média v 500 ml bankách na rotačnej trepačke (120 ot./min) pri teplote 28–32 °C. Aktivitu  $\alpha$ -amylázy a glukooamylázy sme stanovovali po 72 a 96 hodinách kultivácie.

$\alpha$ -Amylázu sme v kultivačnom médiu stanovovali pomocou diagnostického Spofa (S) testu vo fosfátovom citrátovom tlmivom roztoku pH 5,25 pri teplote 44 °C. Intenzitu vzniknutého modrého zafarbenia, zodpovedajúceho množstvu rozloženého škrobu, sme merali spektrofotometricky pri 620 nm. Na základe nameranej hodnoty absorbancie sme odčítali aktivitu enzýmu z kalibračnej čiary.

Glukoamylázovú aktivitu sme tiež stanovovali Spofa (S) testom po predchádzajúcej inaktivácii prítomnej  $\alpha$ -amylázy dodávaným inhibítorom. Aktivitu sme stanovovali v destilovanej vode po 1 h inkubácii pri teplote 37 °C spektrofotometricky pri 620 nm. Z nameranej absorbancie sa aktivita glukoamylázy odčítava z kalibračnej čiary.

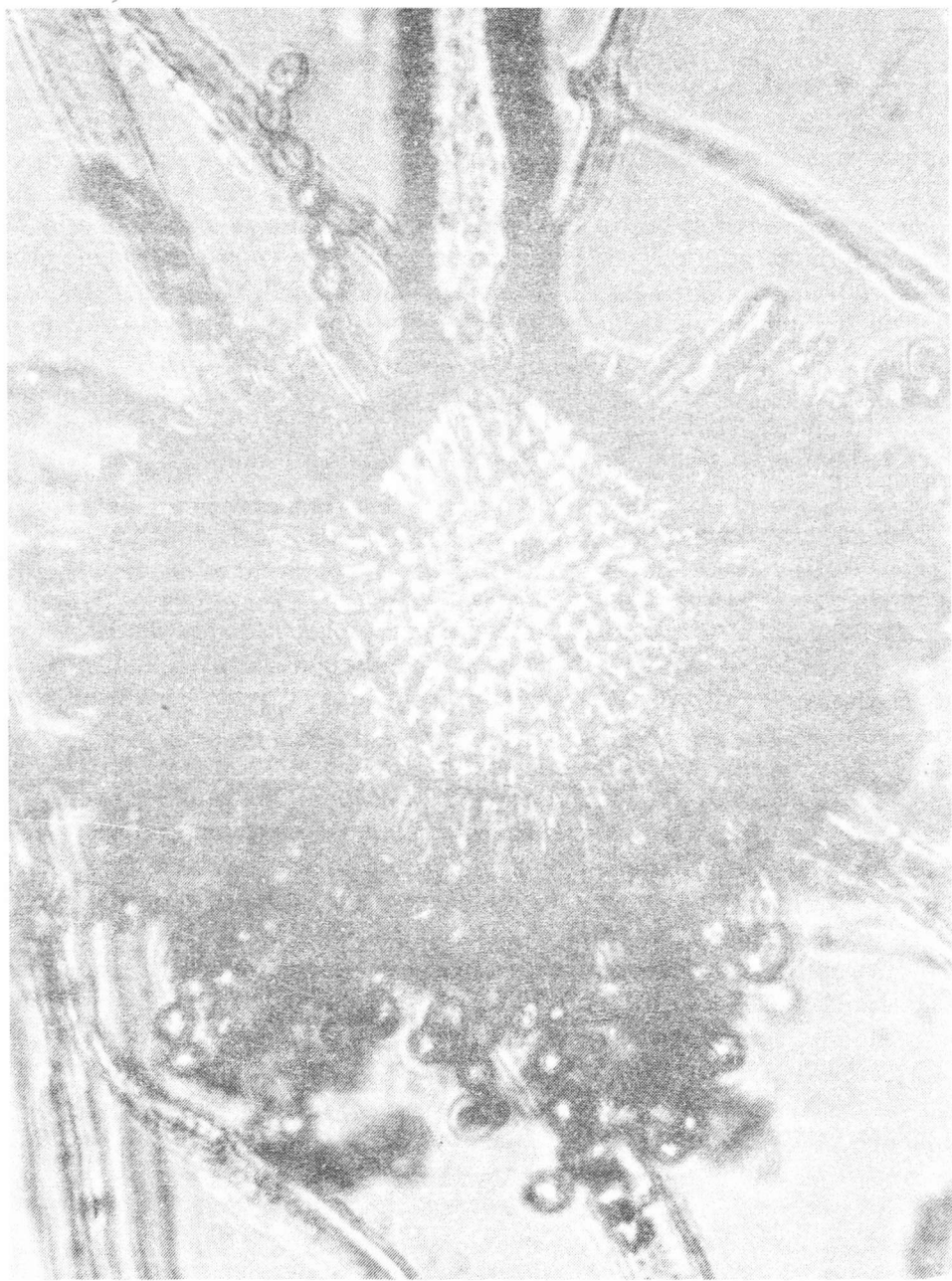
**Scukorňovanie škrobu.** Na scukorňovanie škrobu sme použili 5, 10 a 15 % škrobový maz, pripravený z kukuričného škrobu vo vodovodnej vode. Na scukorňovanie 1 250 ml škrobového mazu sme vo všetkých troch prípadoch použili 200 ml kultivačného média s aktivitou amylázy 0,2 mkat a aktivitou glukoamylázy 0,05 mkat. Množstvo vzniknutých redukujúcich sacharidov sme stanovili po 1, 20 a 40 hodinách redukciou kyseliny dinitrosalicylovej, zmeraním vzniknutého žltého zafarbenia pri 540 nm a odčítaním množstva vzniknutých redukujúcich sacharidov v prepočte na glukózu z kalibračnej čiary.

### Výsledky a diskusia

*Morfologická a fyziologická charakteristika produkčného kmeňa A. oryzae IV-477, CCM 8005.* Kmeň dobre rastie a sporuluje na bežných kultivačných médiách používaných na kultiváciu húb, napr. Czapekovom–Doxovom agare, sladinkovom agare, Sabouradovom agare a pod.

*Makroskopický vzhľad.* Kolónie na Czapekovom–Doxovom agare sú nízke, ploché, spočiatku ich tvorí dobre vyvinuté biele mycélium, pri sporulácii sa kolónia od stredu sfarbuje intenzívne žltozeleno až olivovo zeleno. Spodná strana kolónie je bez pigmentu. Kolónie dosahujú za 120 hodín rastu priemer 9,0 cm. Na sladinkovom agare je vzdušné mycélium veľmi dobre vyvinuté, hustejšie ako na Czapekovom–Doxovom agare. Kolónie sú takisto nízke, ploché, spočiatku biele, pri tvorbe spôr sa farbja intenzívne žltozeleno. Majú výrazne hrubo zrnitý povrch, spodná strana je bez pigmentu, výpotky sa na povrchu kolónie nevyskytujú. K sporulácii na povrchu kolónie dochádza pri teplote 28 °C až za 48 hodín, k hojnej sporulácii za 96 hodín kultivácie. Viability konídií je veľmi dobrá.

*Mikroskopický vzhľad.* Konidiofory sú 1–2 mm vysoké, ich priemerná hrúbka je 8  $\mu$ m, vezikuly sú guľovité, nesú dva rady sterigiem, spóry sú v dlhých retiach. Priemerná veľkosť vezikúl je 40  $\mu$ m, limitné veľkosti 25 a 60  $\mu$ m. Konidiálne hlavice sú radiálne, priemerná veľkosť hlavíc je 125  $\mu$ m. Guľovité až elipsovité konídie sú hyalinné, v mase žltozelené, na povrchu hladké. Priemerná veľkosť konídií je 4,35  $\mu$ m (obr. 1).



Obr. 1. Mikrofotografia fruktifikačnej štruktúry *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005, zväčš  
1140-krát.

Fig. 1. Microphotography of the fructification structure of *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005  
Magn. 1140x.

Aktivity  $\alpha$ -amylázy a glukoamylázy, ktoré sme dosiahli pri kultivácii v základnom médiu, uvádza tabuľka 1.

V rovnakom médiu, ale s inými zdrojmi uhlíka (kukuričný škrob, zemiakový škrob, pšeničný škrob a mletá lúpaná ryža) sme dosiahli výsledky, ktoré uvádzajú tabuľky 2 a 3. Ako kontrolu (K) sme použili základné médium. Uvedené výsledky sú priemerom najmenej 10 paralelných pokusov, v prípade pšeničného a kukuričného škrobu priemerom 15 pokusov.

Na scukorňovania škrobu sme použili 1250 ml 5, 10 a 15 % kukuričného mazu a 0,2 mkat enzýmového komplexu CCM 8005, pH 5,25,  $t = 44^\circ\text{C}$  (tab. 4).

T a b u ľ k a 1. Aktivita produkovaných amylolytických enzýmov v základnom médiu

T a b l e 1. Activity of produced amylolytic enzymes in basic medium

	$\alpha$ -Amyláza <sup>1</sup> [mkat.ml <sup>-1</sup> ]		Glucoamyláza <sup>2</sup> [mkat.ml <sup>-1</sup> ]	
	72 h	96 h	72 h	96 h
<i>A. oryzae</i> CCM 8005 + základné médium <sup>3</sup>	948,31	1 055,06	214,68	240,08

<sup>1</sup> $\alpha$ -Amylase; <sup>2</sup>Glucoamylase; <sup>3</sup>Basic medium.

T a b u ľ k a 2. Aktivita produkovaných amylolytických enzýmov pri použití rôznych zdrojov uhlíka

Table 2. Activity of produced amylolytic enzymes using different carbon sources

Použitý škrob <sup>3</sup>	$\alpha$ -Amyláza <sup>1</sup> [mkat.ml <sup>-1</sup> ]		Glucoamyláza <sup>2</sup> [mkat.ml <sup>-1</sup> ]	
	72 h	96 h	72 h	96 h
K <sup>4</sup>	948,31	1 055,06	214,68	240,08
kukuričný škrob <sup>5</sup>	643,1	869,37	103,39	162,93
pšeničný škrob <sup>6</sup>	684,57	776,86	154,67	176,58
zemiakový škrob <sup>7</sup>	721,19	814,16	169,33	180,20
lúpaná mletá ryža <sup>8</sup>	671,90	839,34	107,62	107,43

<sup>1</sup> $\alpha$ -Amylase; <sup>2</sup>Glucoamylase; <sup>3</sup>Kind of the used starch; <sup>4</sup>Control; <sup>5</sup>Maize starch; <sup>6</sup>Wheat starch; <sup>7</sup>Potato starch; <sup>8</sup>White milled rice.

T a b u ľ k a 3. Percentuálne vyjadrenie aktivity produkovaných amylolytických enzýmov

Table 3. Percentage expression of activity of produced amylolytic enzymes

Použitý škrob <sup>3</sup>	$\alpha$ -Amyláza <sup>1</sup>		Glucoamyláza <sup>2</sup>	
	72 h	96 h	72 h	96 h
K <sup>4</sup>	100 %	100 %	100 %	100 %
kukuričný škrob <sup>5</sup>	67,81	82,40	48,16	67,51
pšeničný škrob <sup>6</sup>	72,18	73,63	72,04	73,55
zemiakový škrob <sup>7</sup>	76,05	77,16	78,87	75,05
lúpaná mletá ryža <sup>8</sup>	70,85	79,55	50,13	44,74

For 1-8 see Table 2.

T a b u l k a 4. Scukorňovanie škrobového mazu vyfermentovaným kultivačným médiom (0,2 mkat  $\alpha$ -amylázy CCM 8005)

Table 4. Saccharization of starch suspension fermented by the cultivation medium (0.2 mkat of  $\alpha$ -amylase CCM 8005)

Škrobový maz <sup>1</sup>	% redukujúcich sacharidov počas inkubácie <sup>2</sup>		
	1 h	20 h	40 h
5 %	20	34	40
10 %	20	30	40
15 %	20	30	40

<sup>1</sup>Starch suspension; <sup>2</sup>percentage of reducing sugars during incubation.

Ako vidieť z uvedených výsledkov, získali sme kmeň s mimoriadne vysokou aktivitou produkovaných amylolytických enzýmov. Zo skúšaných zdrojov uhlíka, ktoré sme v našich pokusoch doteraz použili, je najlepší kukuričný šrot. Ani s jedným z purifikovaných škrobov sme nedosiahli podobné aktivity. Výsledky dosiahnuté čistými škrobmi sú pri  $\alpha$ -amyláze od 67 % do 82 % kontroly, pri glucoamyláze od 44 % do 78 % kontroly.

Fakt, že najlepšie výsledky sme dosiahli na kukuričnom šrote, dá sa vysvetliť tak, že kukuričný šrot oproti purifikovaným škrobom obsahuje aj viaceré aminokyseliny, vitamíny, stopové prvky a iné látky, ktoré majú stimulačné účinky na produkciu amylolytických enzýmov a na ich aktivitu.

*Toxicita izolovaného kmeňa.* Izolovaný kmeň *A. oryzae* CCM 8005 sme dali vyšetriť vo Výskumnom ústave preventívneho lekárstva v Bratislave (autORIZOVANÉ pracovisko) na produkciu mykotoxínov. Podľa výsledkov vyšetrenia kmeň neprodukuje nijaký mykotoxín, dá sa teda použiť v potravinárskom priemysle.

## Literatúra

- [1] VOLLEK, V. – MAJERÍKOVÁ, I. – ŠKÁRKA, B.: A new amylase-producing strain *Aspergillus niger*. In: 4 th Symposium of Socialist Countries on Biotechnology, Varna, 1986. Abstracts.
- [2] VOLLEK, V. – MAJERÍKOVÁ, I. – ŠKÁRKA, B.: Spôsob výroby amylolytických enzýmov. PV 5725-86, 1986.
- [3] VOLLEK, V. – MAJERÍKOVÁ, I. – ŠKÁRKA, B., Prům. Potravin., 38, 1987, č. 5, s. 244.
- [4] KOSIARIK, N. a kol.: Ethanolfermentation. In: Biotechnology. Weinheim, 1983, s. 25.
- [5] FRENCH, D.: Enzymatic mechanisms. In: Trends in the Biology of Fermentations. New York, 1981, s. 151.
- [6] NEDA, S., Trends Biochem. Sci., 6, 1981, s. 89.
- [7] STRYER, L.: Biochemistry. San Francisco, 1975.
- [8] RAWN, J. D.: Biochemistry. New York, 1983.
- [9] GREENWOOD, C. T. – MILNE, E. A., Starch/Stärke, 20, 1968, s. 139.
- [10] KULP, K.: Carbohydrates. In: Enzymes in Food Processing. New York, s. 62.

### ***Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005-новый производитель амилаз**

#### **Резюме**

Мы изолировали новый, амилазы производящий штамм *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005, который в лабораторных условиях при культивации на встряхиватели в среде созданной из неорганических солей и кукурузного помола, или других видов крахмала, производит в среднем 1000 мкат  $\alpha$ -амилазы и 300–350 мкат глюкоамилазы на 1 мл культивационной среды.

Штамм не производит токсических веществ и произведенные ферменты можно использовать в пищевой промышленности.

### ***Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 – the new producer of amylases**

#### **Summary**

A new amylases producing strain *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 was isolated. It produces in average 1000 mkat of  $\alpha$ -amylase and 300–350 mkat glucoamylase in 1 ml of culture medium under laboratory conditions at the cultivation in shaking machine. The medium was composed of inorganic salts and maize starch or other starch kinds.

The strain produces no toxic substances and the produced enzymes are utilizable in food industry.