

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXI, 13

SECTIO C

1976

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zdzisław ILCZUK

**Oddziaływanie niektórych odpadów przemysłu rolno-spożywczego
na aktywność pektynaz wytwarzanych przez mutanty *Aspergillus niger* ***

Влияние некоторых отходов пищевой промышленности на активность пектиназ,
синтезированных мутантами *Aspergillus niger*

The Effect of Some Agricultural-Food Industry By-Products on the Activity of
Pectinases Produced by *Aspergillus niger* Mutants

Produkty odpadowe przemysłu rolno-spożywczego w wielu przypadkach z powodzeniem wykorzystywane są do celów intensyfikacji biosyntezy mikrobiologicznych. Dzięki zawartości substancji aktywnych biologicznie mogą one pobudzać mikroorganizmy zarówno do rozwoju, jak też do wzmożenia działalności wielu ich procesów życiowych.

Celem pracy było określenie, w jakim stopniu dodatek do podłoża hodowlanego niektórych odpadów przemysłowych (wytłoków jabłkowych, wysłoków buraczanych, otrąb pszennych i kielków słodowych) wpływa na aktywność pektynolityczną mutantów *Aspergillus niger*.

BADANIA WŁASNE

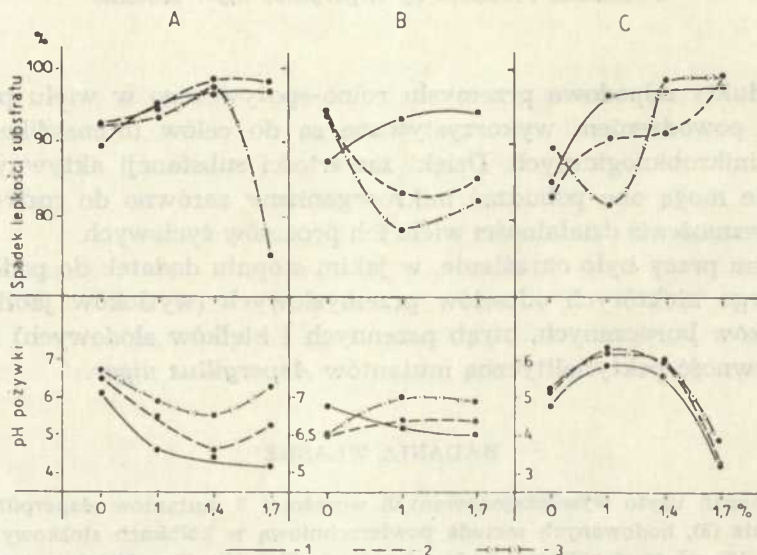
Do badań użyto wyselekcjonowanych wcześniej 3 mutantów *Aspergillus niger* III stopnia (3), hodowanych metodą powierzchniową w kolbkach stożkowych o pojemności 100 ml, zawierających po 25 ml pożywki Czapeka. Przedmiotem doświadczeń było oddziaływanie niektórych produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego dodanych do podłoża hodowlanego na aktywność pektolityczną mutantów i syntezę ich grzybni. Pektynazy oznaczano po upływie 3, 5 i 7 dni inkubacji w temp. 30°C. Do oznaczania aktywności PME zastosowano metodę pehametrycznego pomiaru przyrostu grup karboksylowych w roztworach mieszaniny reagującej, nato-

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.3.1, koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

miast aktywności poligalakturonaz oznaczano viskozymetrycznie (w odniesieniu do endo-PG) oraz fotokolorymetrycznie w oparciu o przyrosty grup redukujących w mieszaninie substratu pektynowego z przesączem hodowlanym (w odniesieniu do egzo-PG), stosownie do metod opisanych wcześniej (2). W oznaczeniach egzo-PG posługiwano się preparatem pektyny jabłkowej z wytwórni w Jaśle, odmytej w roztworze wodnym alkoholu (6 części wody do 4 części alkoholu) w celu usunięcia nadmiaru substancji balastowych. Przedstawione wyniki stanowią średnie z 3 równoległych powtórzeń prób hodowlanych.

WYNIKI

Badania wykazały, że dodanie do podłoża hodowlanego wyłoków jabłkowych intensyfikowało syntezę endo-PG głównie u szczepów 349 i 36 (ryc. 1). Natomiast przyrosty aktywności pektynometyloesterazy wystąpiły pod wpływem dodania tego produktu odpadowego tylko u szczepu 349. U pozostałych 2 szczepów nie przekroczyły one wartości charakterystycznych dla prób kontrolnych (tab. 1). Podobnie oddziaływały dodane do podłoża hodowlanego wysłodki buraczane. Stymulacja aktywności PG wy-

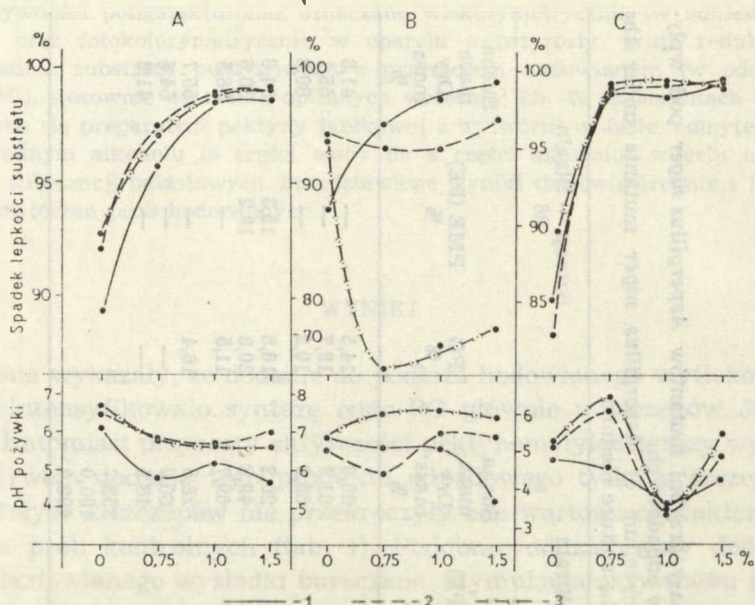


Ryc. 1. Wpływ wyłoków jabłkowych na aktywność PG mutantów *A. niger*, wyrażoną jako procent spadku lepkości substratu oraz na zmiany *pH* podłoża; A — szczep 349, B — szczep 254, C — szczep 36; 1 — po 3 dniach hodowli, 2 — po 5 dniach hodowli, 3 — po 7 dniach hodowli

Effect of apple marc on PG activity of *A. niger* mutants, expressed as percentage of substrate viscosity decrease, and on the *pH* changes of medium; A — strain 349, B — strain 254, C — strain 36; 1 — after 3 days of culture, 2 — after 5 days of culture, 3 — after 7 days of culture

Tab. 1. Maksymalne przyrosty aktywności endo-PG i PME oraz suchej masy grzybni mutantów *Aspergillus niger* pod wpływem dodatku do pożywki produktów odpadowych
 Maximum increase in activity of endo-PG, PME and of dry mass of mycelium of *Aspergillus niger* mutants under the influence of addition of by-products to the culture medium

| Produkt odpadowy | Dzień inkubacji | Szczep — Strain | | | Szczep — Strain | | | Szczep — Strain | | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------------|-----------------|---------------|-----------------------------------|
| | | 349 | 254 | 36 | 349 | 254 | 36 | 349 | 254 | 36 |
| | | PG % | PME (PE) % | Sucha masa Dry mass % | PG % | PME ((PE) % | Sucha masa Dry mass % | PG % | PME (PE) % | Sucha masa Dry mass % |
| Wytłoki jabłkowe | 3 | 8,8 | 16,1 | — | 7,1 | — | 20,0 | 14,5 | — | 41,8 |
| Apple marc | 5 | 6,8 | 18,0 | 36,0 | — | — | 61,5 | 19,7 | — | 55,1 |
| | 7 | 5,0 | 18,0 | 40,0 | — | — | 65,9 | 10,2 | — | 80,8 |
| Wysłodki buraczane | 3 | 10,7 | 56,7 | 42,8 | 11,3 | 45,9 | 20,2 | 16,8 | 15,3 | 54,6 |
| Beet pulp | 5 | 7,5 | 40,2 | 80,0 | 1,9 | — | 49,8 | 20,8 | 18,2 | 58,6 |
| | 7 | 7,2 | 50,6 | 81,2 | — | — | 69,7 | 11,5 | — | 26,5 |
| Otręby pszenne | 3 | — | — | 97,2 | 4,5 | — | 28,5 | 16,4 | — | 55,7 |
| Wheat bran | 5 | — | — | 82,3 | 1,9 | — | 60,0 | — | — | 54,6 |
| | 7 | — | — | 63,2 | — | — | 48,9 | — | — | 41,2 |
| Kiełki słodowe | 3 | 8,6 | — | 312,9 | 11,1 | — | 353,7 | — | — | — |
| | 5 | 6,1 | — | 426,0 | — | — | 400,0 | — | — | — |
| Malt sprouts | 7 | 6,4 | — | 523,5 | — | — | 400,0 | — | — | — |



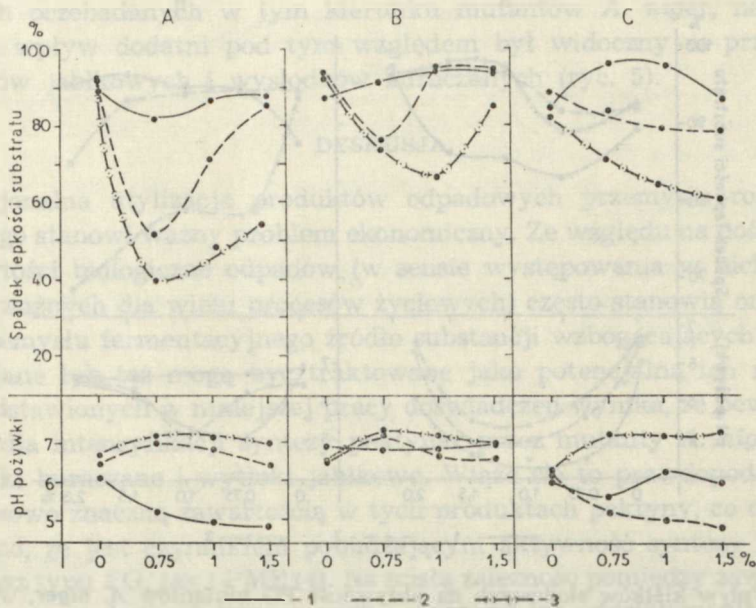
Ryc. 2 Wpływ wysłodków buraczanych na aktywność PG mutantów *A. niger*, wyrażoną jako procent spadku lepkości substratu oraz na zmiany pH podłoża; A — szczep 349, B — szczep 254, C — szczep 36; 1 — po 3 dniach hodowli, 2 — po 5 dniach hodowli, 3 — po 7 dniach hodowli

Effect of beet pulp on PG activity of *A. niger* mutants, expressed as percentage of substrate viscosity decrease, and on the pH changes of medium; A — strain 349, B — strain 254, C — strain 36; 1 — after 3 days of culture, 2 — after 5 days of culture, 3 — after 7 days of culture

stąpiła w tym przypadku w odniesieniu do szczepów 36 i 349. U szczepu 254 wpływ ten zaznaczył się przede wszystkim po okresie pierwszych 3 dni hodowli. Również synteza PME w wyraźny sposób stymulowana była przez wzrastające stężenia wysłodków, chociaż u szczepu 36 maksymalna aktywność tego enzymu nie przekroczyła poziomu uzyskanego w kontroli po 7 dniach hodowli (ryc. 2, tab. 1).

Wydaje się, że zmiany aktywności endo-PG pozostają w odwrotnej zależności do zmian odczynu podłoża hodowlanego, którego bardziej kwaśny charakter był czynnikiem sprzyjającym wzmożonej syntezie pektynaz i stymulował ich aktywność w większym stopniu niż odczyn obojętny lub alkaliczny (ryc. 1, 2).

Otręby pszenne praktycznie nie zwiększały aktywności syntezy zarówno PME, jak i endo-PG (z wyjątkiem szczepu 36 po pierwszych 3 dniach hodowli oraz drobnych przyrostów aktywności u szczepu 254), powodując zmianę odczynu środowiska w kierunku wzrastających wartości pH (ryc. 3).

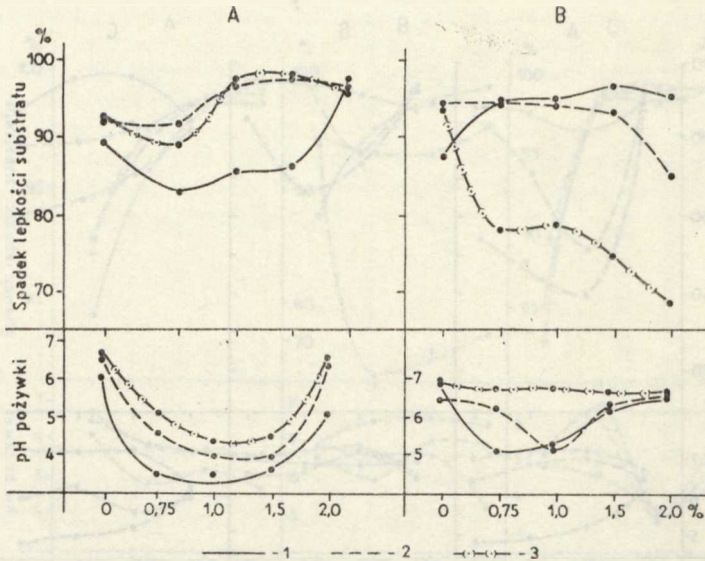


Ryc. 3. Wpływ otrąb pszennych na aktywność PG mutantów *A. niger*, wyrażoną jako procent spadku lepkości substratu oraz na zmiany pH podłoża; A — szczep 349, B — szczep 254, C — szczep 36; 1 — po 3 dniach hodowli, 2 — po 5 dniach hodowli, 3 — po 7 dniach hodowli

Effect of wheat bran on PG activity of *A. niger* mutants, expressed as percentage of viscosity decrease, and on the pH changes of medium; A — strain 349, B — strain 254, C — strain 36; 1 — after 3 days of culture, 2 — after 5 days of culture, 3 — after 7 days of culture

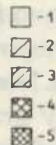
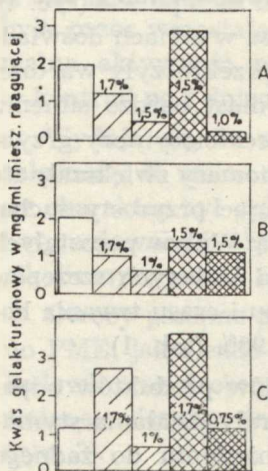
Oddziaływanie kiełków słodowych na aktywność syntezy pektynaz przez mutanty *A. niger* wyraziło się w pewnym jej wzroście w odniesieniu do endo-PG u szczepu 349 oraz po 3 dniach hodowli u szczepu 254 (ryc. 4). Aktywności PME były natomiast jednoznacznie niższe w seriach doświadczalnych obu szczepów i w żadnym przypadku nie przekroczyły wartości prób kontrolnych, tj. bez dodatków kiełków. Natomiast bardzo silnemu pobudzeniu pod wpływem tego produktu ulegał proces biosyntezy grzybni przebadanych mutantów *A. niger*, przy czym ich biomasy zwiększały się znacznie wraz ze wzrostem dawek kiełków, powodując przyrosty suchej masy w granicach 3—5 razy w porównaniu z kontrolą. Wpływ pozostałych produktów odpadowych na syntezę biomasy grzybni badanych szczepów *A. niger* był znacznie słabszy, w zależności od szczepu i czasu trwania hodowli, i wahał się w granicach od ok. 20 do ponad 90% (tab. 1).

Spośród przebadanych przez nas czterech rodzajów produktów odpadowych, otręby pszenne i kiełki słodowe nie wywierały działania stymulującego na aktywność biosyntezy egzo-PG w odniesieniu do żadnego



Ryc. 4. Wpływ kiełków słodowych na aktywność PG mutantów *A. niger*, wyrażoną jako procent spadku lepkości substratu oraz na zmiany pH podłoża; A — szczep 349, B — szczep 254, C — szczep 36; 1 — po 3 dniach hodowli, 2 — po 5 dniach hodowli, 3 — po 7 dniach hodowli

Effect of malt sprouts on PG activity of *A. niger* mutants, expressed as percentage of substrate viscosity decrease, and on the pH changes of medium; A — strain 349, B — strain 254, C — strain 36; 1 — after 3 days of culture, 2 — after 5 days of culture, 3 — after 7 days of culture



Ryc. 5. Wpływ wytlóków jabłkowych (2), kiełków słodowych (3), wysłódków buraczanych (4) i otrąb pszennych (5) na syntezę egzo-PG przez mutanty *Aspergillus niger*; A — szczep 349, B — szczep 254, C — szczep 36; 1 — kontrola

Effect of apple marc (2), malt sprouts (3), beet pulp (4) and wheat bran (5) on exo-PG synthesis by *Aspergillus niger* mutants, A — strain 349, B — strain 254, C — strain 36; 1 — control

z trzech przebadanych w tym kierunku mutantów *A. niger*, natomiast pewien wpływ dodatni pod tym względem był widoczny w przypadku wytlóków jabłkowych i wysłódków buraczanych (ryc. 5).

DYSKUSJA

Racjonalna utylizacja produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego stanowi ważny problem ekonomiczny. Ze względu na dość znaczne wartości biologiczne odpadów (w sensie występowania w nich składników ważnych dla wielu procesów życiowych) często stanowią one cenne dla przemysłu fermentacyjnego źródło substancji wzbogacających podłoża hodowlane lub też mogą być traktowane jako potencjalna ich rezerwa. Z przedstawionych w niniejszej pracy doświadczeń wynika, że pewne znaczenie dla intensyfikacji syntezy pektynaz przez mutanty *A. niger* mają wysłódky buraczane i wytłoki jabłkowe. Wiąże się to prawdopodobnie ze stosunkowo znaczną zawartością w tych produktach pektyny, co do której wiadomo, że jest czynnikiem pobudzającym aktywność syntezy zarówno pektynaz typu PG, jak i PME (4). Na ścisłą zależność pomiędzy zawartością pektyny w wysłódkach buraczanych i stopniem ich oddziaływania na syntezę PG zwrócił uwagę również K r a k o w i a k (5). Korzystny charakter oddziaływania wysłódków buraczanych i wytłóków jabłkowych na syntezę pektynaz przez mutanty *A. niger* wyraża się także w ograniczonym raczej przyroście biomasy grzybni tych szczepów. Natomiast w niewielkim stopniu stymulują syntezę pektynaz otręby pszenne. Na małą ich przydatność w procesie intensyfikacji syntezy tej grupy enzymów u *Aspergillus awamori* (w przeciwieństwie do syntezy amylaz) wskazywały niedawno w swoich badaniach Ł o s i a k o w a i M u s z n i k o w a (6). Wpływ kielków słodowych na aktywność enzymów pektynolitycznych okazał się również niezadowolający. Mimo pewnej stymulacji PG ich oddziaływanie znalazło wyraz przede wszystkim w niezwykle silnym pobudzeniu rozwoju grzybni, co z technicznego punktu widzenia należy ocenić jako efekt niepożądany. Można w tym względzie odnotować pewną analogię do oddziaływania kielków słodowych na proces syntezy kwasu cytrynowego przez pleśnie *A. niger* (1), w którym przyrostom tego metabolitu również towarzyszył silny wzrost biomasy grzybni. Wiąże się to bez wątpienia z dużym bogactwem związków biologicznie czynnych, zawartych w kielkach słodowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Ilczuk Z.: Einfluss von Malzkeimen und Äpfelrestern auf die Citronensäuregärung. Zbl. Bakt. II Abt. 127, 539—600 (1972).

2. Ilczuk Z.: The Effect of Medium Reaction and Sodium and Potassium Salts on the Synthesis of Pectinases by the Mutants of *Aspergillus niger*. Acta Microbiol. Polon. seria B 6 (23), 109—118 (1974).
3. Ilczuk Z.: Synteza enzymów pektolitycznych przez mutanty *Aspergillus niger* uzyskane w drodze indukcji wielostopniowej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C 29, 77—86 (1974).
4. Konowałow S. A.: Biosintez fiermientow mikroorganizmanii. Izd. Piszcz. Prom-st, Moskwa 1972.
5. Krakowiak A.: Studia nad biosyntezą enzymów pektynolitycznych i otrzymywaniem preparatu. Lublin 1974 (praca doktorska, maszynopis).
6. Łosiakowa L. S., Musznikowa L. N.: Fiermienty mikroorganizmow, Izd. „Nauka”, Moskwa 1973.

РЕЗЮМЕ

Предметом экспериментов было исследование воздействия яблочных выжимков, свекловичного жома, пшеничных отрубей и солодовых ростков, в разных количествах добавляемых в синтетическую питательную среду, на активность пектинметилэстеразы (PME) и полигалактуроназ (эндо- и экзо-PG) трех мутантов *Aspergillus niger*. Установлено, что из всех вышеназванных отходов активность PME и полигалактуроназ наиболее эффективно стимулировали добавки яблочных выжимков и свекловичного жома. Было замечено, что рост активности пектиназ почти всегда сопровождался изменением реакции питательной среды в сторону увеличения кислотности. Кроме того, добавление к питательной среде каждого из исследованных продуктов вызывало рост биомассы мутантов, причем в случае яблочных выжимков, свекловичного жома и пшеничных отрубей этот рост колебался в границах 20—90%, в то время когда солодовые ростки увеличивали сухую массу мицелия в 3—5 раз.

SUMMARY

The subject of experiments was the influence of apple marc, beet pulp, wheat bran and malt sprouts, added in various quantities to synthetic medium, on the activity of pectinmethylesterase (PME) and endo- and exo-(PG) polygalacturonase of three *Aspergillus niger* mutants. It was found that the addition of apple marc and beet pulp stimulated the activity of PME and polygalacturonases most effectively among the examined by-products. It was observed that the increase in pectinase activity was usually accompanied by a change in the reaction of the medium in the acid direction. The addition of each of the four examined products to the culture medium caused an increase in mutant biomass; at the same time in the case of apple marc, beet pulp and wheat bran this increase fluctuated from 20% to over 90%, whereas malt sprouts increased the dry mass of mycelium from 3 to more than 5 times.