

STABILNOŚĆ I CHARAKTERYSTYKA PŁYNNEGO PREPARATU AMYLOLITYCZNEGO Z *ASPERGILLUS ORYZAE*

J. A. Bernat, W. Rzędowski

Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Warszawa
Zakład Mikrobiologii Technicznej i Biochemii

Dyrektor — Tadeusz Gołębiwski

WSTĘP

Pleśniowe preparaty amylolityczne, stosowane w przemyśle spożywczym, produkowane są w różnej postaci i o różnym stopniu oczyszczenia. Oprócz preparatów oczyszczonych w postaci stałej (proszku) często spotyka się produkowane przez szereg firm preparaty w postaci płynnej [10, 11, 14, 15]. Stosowane są one między innymi przez przemysł ziemniaczany do produkcji wysokoscukrzonych syropów [15]. Zaletą płynnych preparatów enzymatycznych jest łatwość ich dozowania oraz niższy koszt własny produkcji. Mają one jednak krótszy okres trwałości i przeznaczone są zwykle do szybkiego użycia.

Biorąc pod uwagę łatwość i niski koszt wytwarzania dąży się do opracowania produkcji płynnych preparatów amylolitycznych, posiadających maksymalny okres trwałości enzymatycznej i mikrobiologicznej między innymi dzięki dodatkowi takich stabilizatorów, jak: $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 [3, 13, 14]. Często niektóre firmy produkujące płynne preparaty amylolityczne stosują dodatek CaCl_2 , NaCl , KCl , Na_2SO_4 .

Fischer i Stein [2] przeprowadzili badania porównawcze α -amylazy słodu, bakterii oraz *A. oryzae* i stwierdzili, że aktywność tego enzymu jest uwarunkowana określoną zawartością jonu wapniowego. Akabori i wsp. [1] wykazali, że α -amylaza z *A. oryzae* jest enzymem zawierającym wapń oraz że aktywność jej spada proporcjonalnie do ubytku jonów wapnia z roztworu. Oikawa i Maeda [7] określili nawet, że cząsteczka α -amylazy z *A. oryzae* wiąże stosunkowo trwale 10 jonów wapnia, przy czym rodzaj wiązań może być różny. Oikawa [8] wykazał również, że cząsteczka enzymu jest trwale związana z atomem wapnia, który nie ulega całkowitej dializie wobec EDTA nawet po 10 dniach, ale łatwo może ulec wymianie z wapniem znajdującym się w roztworze. Stwierdził on także, że atom wapnia może być wymieniony bez strat aktywności enzymatycznej przez Sr lub Mg. Podobne rezultaty otrzymał Šul'man i in. [13, 14] w badaniach nad stabilizacją α -amylazy z *A. oryzae* jonami Ca, Ba, Mg, Zn (w postaci chlorkowej).

Również Perevozčenko i Čyperovič [9], prowadząc badania porównawcze α -amylaz wytwarzanych przez pleśnie z rodzaju *Aspergillus*, stwierdzili, że z przebadanych 18 kationów różnych metali tylko wapń stabilizował prawie w 100% aktywność α -amylazy. Interesujący jest fakt, stwierdzony przez wymienionych badaczy, że α -amylaza z *A. flavus* była stabilizowana w 89% również przez ołów.

Trwałość preparatów enzymatycznych zależy również od składu chemicznego związków towarzyszących, co związane jest bezpośrednio z metodą otrzymywania i stosowanym szczepem.

W związku z uruchomieniem w Polsce produkcji płynnego preparatu amylolytycznego celem niniejszej pracy było przebadanie stabilności α -amylazy w tym preparacie, aktywności α -amylazy i enzymów towarzyszących oraz określenie warunków działania α -amylazy (optim. temp., pH i termostabilności).

METODYKA PRACY

W pracy stosowano płynny preparat amylolytyczny otrzymany z *A. oryzae* w skali doświadczalno-produkcyjnej. Hodowlę szczepu przeprowadzono na podłożu stałym metodą powierzchniową, w temp. 28-30°C, w czasie 40-45 godz. Otrzymany w ten sposób „surowy preparat” amylolytyczny po rozdrobnieniu poddawano dalszej przeróbce (ekstrakcji, oczyszczeniu, zagęszczeniu), otrzymując gotowy produkt o konsystencji syropu i zawartości 50-55% s.m.

Do stabilizacji α -amylazy stosowano: NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ i CaCl₂ · 6H₂O. Przebadano wpływ stężenia powyższych soli w ilościach od 0,5 do 10,0%, wpływ temperatury 5-10 i około 20°C oraz czasu przechowywania od 70 do 360 dni.

Oznaczenie optymalnej temperatury działania przeprowadzono w zakresie od 30 do 65°C, stosując jako substrat 1-procentowy zbuforowany (pH 4,7) roztwór skrobi rozpuszczalnej. Optimum pH oznaczono w zakresie 3,0-7,0 (bufory octanowe) w temp. 30°C, stosując jako substrat 1-procentowy zbuforowany roztwór skrobi rozpuszczalnej.

Termostabilność α -amylazy oznaczono na podstawie spadku aktywności 1-procentowego roztworu preparatu, ogrzewanego w zakresie temp. 40-65°C w czasie od 5 do 120 minut. Aktywność α -amylazy oznaczono metodą SKB [12], amyloglukozydazy — metodą AGU [5], dekstrynazy — metodą DS [11]. Oznaczono również aktywność enzymów towarzyszących: enzymów proteolitycznych — metodą Ansona [4], karboksy-metylo-celulazy (CMC-celulazy) — metodą wiskozymetryczną [6] oraz enzymów pektolitycznych — metodą Kyzlinka [10].

OPIS PRZEBIEGU PRACY

STABILIZUJĄCY WPŁYW SOLI NIEORGANICZNYCH

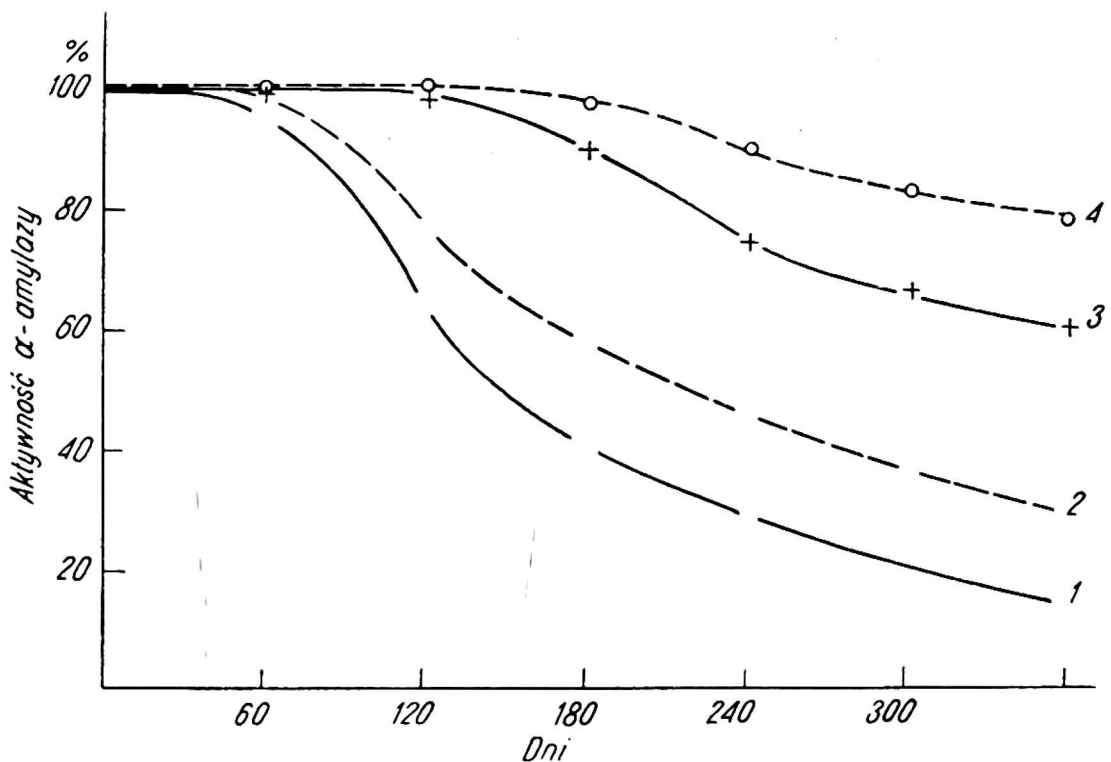
Wstępne próby nad możliwością stabilizowania pleśniowej α -amylazy za pomocą soli nieorganicznych przeprowadzono z rozcieńczonym preparatem płynnym o zawartości 5,5% s.m. Jako stabilizatorów użyto NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ i CaCl₂ · 6H₂O. Przebadano wpływ powyższych soli w stężeniu 0,5, 2,5 5 i 10%

oraz wpływ czasu przechowywania na aktywność α -amylazy. Roztwory przechowywano w temperaturze pokojowej przez 70 dni. Stwierdzono, że stabilizujący wpływ na aktywność α -amylazy posiadał tylko $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ w stężeniu do 2,5%. Natomiast pozostałe sole wpływały przyspieszająco na inaktywację α -amylazy.

Następnie ustalono optymalną dawkę chlorku wapnia. W tym celu dodano $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,15, 0,3, 0,5 i 0,75% do rozcieńczonego płynnego preparatu o zawartości 5,5% s.m. W doświadczeniu tym stwierdzono, że po 160 dniach najwyższą aktywność wykazywała α -amylaza w próbie, do której dodano 0,5% $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pozostałe próby również wykazywały aktywność α -amylazy, ale w znacznie mniejszym stopniu. Wynika z tego, że 0,5% dodatek $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ jest optymalną dawką stabilizującą aktywność α -amylazy.

WPLYW WARUNKÓW PRZECHOWYWANIA NA STABILNOŚĆ α -AMYLAZY
W PŁYNNYM PREPARACIE AMYLOLITYCZNYM Z *A-ORYZAE*

Po ustaleniu optymalnej dawki chlorku wapnia przebadano jej stabilizujący wpływ na aktywność α -amylazy w płynnym preparacie o zawartości 55% s.m. w temp. 5-10 i około 20°C oraz wpływ czasu przechowywania. Aktywność α -amylazy oznaczano co 30 dni. Uzyskane wyniki przedstawia rysunek 1.



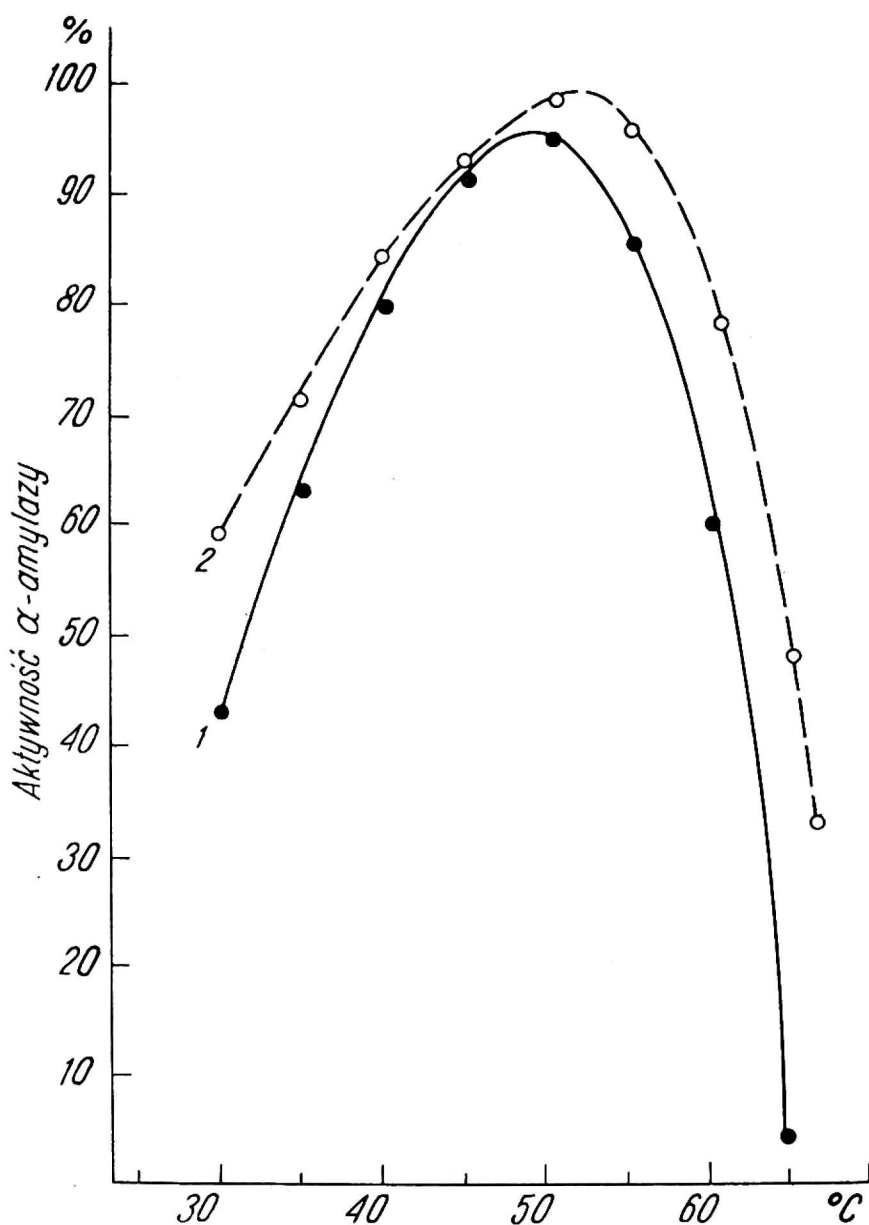
Rys. 1. Wpływ jonów wapnia oraz temperatury i czasu na stabilność α -amylazy w płynnym preparacie amylolytycznym z *A. oryzae*; temp. około 20°C: 1 — próba kontrolna (bez jonów wapnia) 2 — próba z dodatkiem jonów wapnia; temp. 5—10°C: 3 — próba kontrolna (bez jonów wapnia), 4 — próba z dodatkiem jonów wapnia

Abb. 1. Einfluss der Kalziumionen, der Temperatur und der Zeit auf die Stabilität der α -Amylase im flüssigen amylolytischen Präparat aus *A. oryzae*; Temp. ca 20°C: 1 — Kontrollprobe (ohne Kalziumionen); 2 — Probe mit der Zugabe von Kalziumionen; Temp. 5—10°C: 3 — Kontrollprobe (ohne Kalziumionen), 4 — Probe mit einer Zugabe von Kalziumionen

Tabela 1

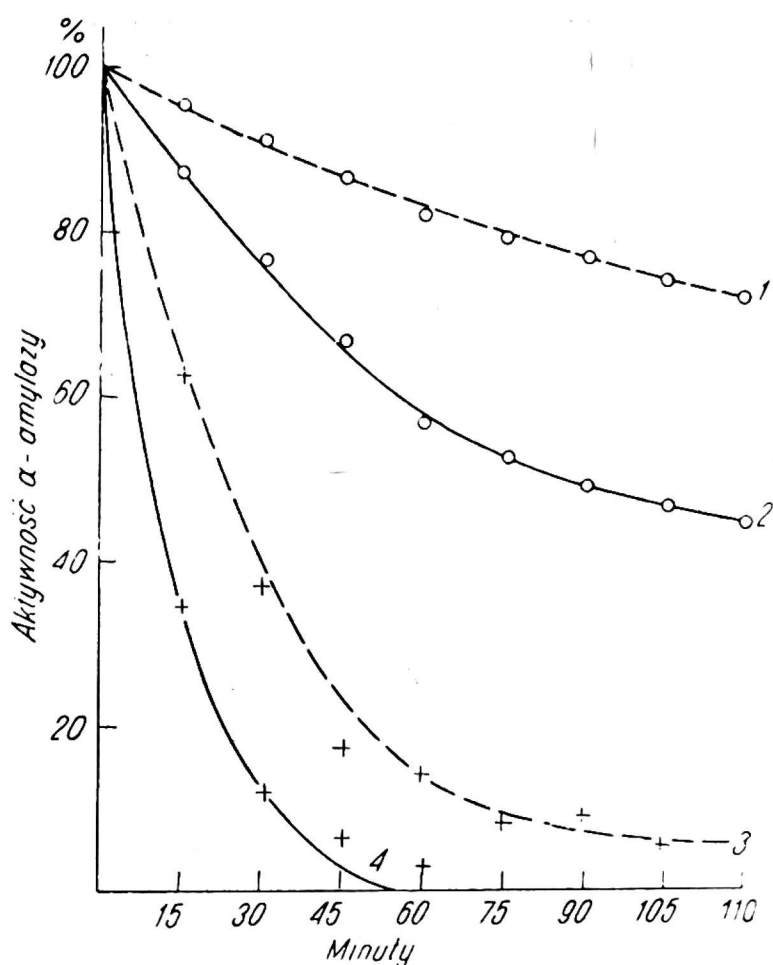
Charakterystyka płynnego preparatu amylogolitycznego z *A. oryzae*

Zawartość w %	
popiołu	6,9
wody	45,6
białka	9,9
Aktywność enzymów w 1 g	
α -amylazy w jed. SKB	1200
amyloglukozydazy w jed. AGU	11,0
dekstrynazy w jed. DS	470,0
proteolitycznych w jed. Hb (wg Ansona)	7000,0
CMC-celulazy w jed. KMC	136,0
pektolitycznych w °PM	brak



Rys. 2. Optimum temperatury α -amylazy w płynnym preparacie amylogolitycznym z *A. oryzae* (pH 4,7): 1 — bez jonów wapnia, 2 — z jonami wapnia

Abb. 2. Optimale Temperatur der α -Amylase im flüssigen amylogolityschem Präparat aus *A. oryzae* (pH 4,7): 1 — ohne Kalziumionen, 2 — mit Kalziumionen



Rys. 3. Wpływ jonów wapnia na termostabilność α -amylazy z *A. oryzae* (pH 4,7); temp. 50°C: 1 — z dodatkiem jonów wapnia, 2 — bez jonów wapnia; temp. 60°C: 3 — z dodatkiem jonów wapnia, 4 — bez jonów wapnia

Abb. 3. Einfluss der Kalziumionen auf die Thermostabilität von α -Amylase mit *A.oryzae* (pH 4,7). Temp. 50°C: 1 — mit einer Zugabe von Kalziumionen, 2 — ohne Kalziumionen; Temp. 60°C: 3 — mit einer Zugabe von Kalziumionen, 4 — ohne Kalziumionen

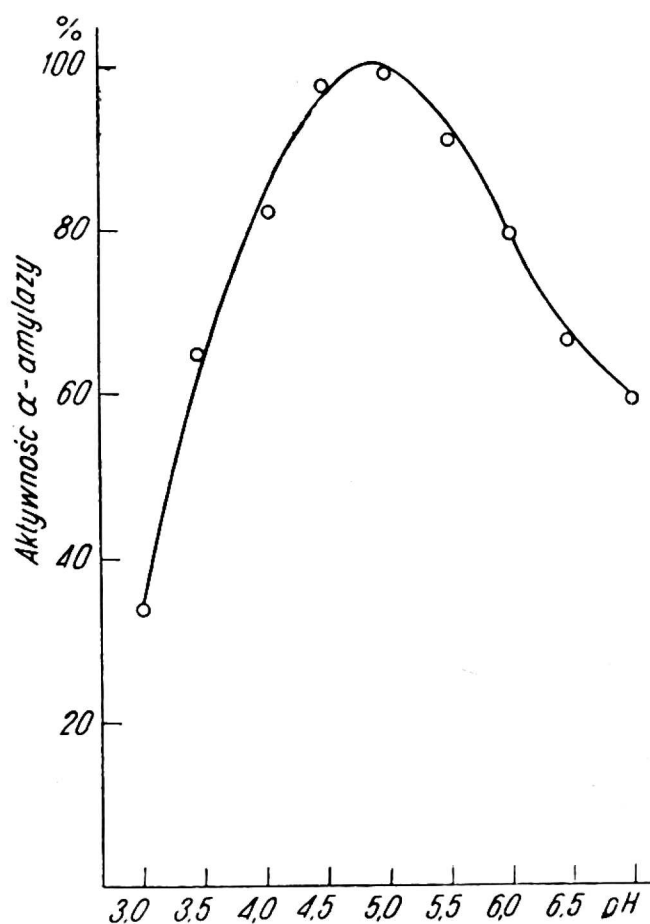
Jak wynika z rysunku 1, temperatura przechowywania płynnego preparatu ma zasadniczy wpływ na stabilność aktywności α -amylazy. W preparacie przechowywanym w temp. około 20°C po 180 dniach aktywność α -amylazy wynosiła około 40% aktywności wyjściowej, a w temp. 5-10°C po tym samym czasie — 90%. W obu przypadkach zaznaczył się stabilizujący wpływ jonów wapnia. Preparat z optymalną dawką chlorku wapnia, przechowywany w temp. około 20°C, po 6 miesiącach przechowywania wykazywał około 60% aktywności wyjściowej α -amylazy, a w temp. 5-10°C około 100%.

Przeprowadzone doświadczenia i przedstawione rezultaty wskazują na to, że jony wapnia wpływają stabilizująco na α -amylazę w płynnym preparacie przechowywanym w temp. 5-10°C. Trwałość preparatu (przy spadku około 10-15% aktywności wyjściowej α -amylazy) nie stabilizowanego jonami wapnia w temp. 5-10°C wynosiła około 8 miesięcy, a stabilizowanego około 1 roku; w temp. około 20°C odpowiednio 1 i 3 miesiące.

CHARAKTERYSTYKA PŁYNNEGO PREPARATU POD WZGLĘDEM AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ I WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNYCH

Płynny preparat amylolityczny z *A. oryzae* scharakteryzowano pod względem aktywności enzymów amylolitycznych: α -amylazy, amyloglukozydazy, dekstrynazy granicznej oraz enzymów towarzyszących — proteolitycznych, celulolitycznych i pektolitycznych. W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę płynnego preparatu z *A. oryzae* produkcji krajowej.

Jak przedstawiono w tabeli 1, płynny preparat amylolityczny z *A. oryzae* produkcji krajowej wykazuje aktywność: α -amylazy — 1200 jed. SKB/g; amyloglukozydazy — 11 jed. AGU/g; dekstrynazy — 470 jed. DS/g; oraz enzymów proteo-



Rys. 4. Optimum pH α -amylazy z *A.oryzae* (temp. 30°C)

Abb. 4. Optimales pH von α -Amylase aus *A.oryzae* (Temp. 30°C)

litycznych — 7000 jed. Hb/g i celulolitycznych — 136 jed. CMC/g. W preparacie nie stwierdzono aktywności enzymów pektolitycznych.

Preparat scharakteryzowano również pod względem optymalnej temperatury i pH działania α -amylazy oraz określono jej termostabilność. Przebadano również wpływ jonów wapnia na optimum temperatury i termostabilność. Wyniki przedstawiono na rysunkach 2, 3, 4. Stwierdzono, że jony wapnia wpływały korzystnie na optymalną temperaturę działania α -amylazy, podwyższając ją o 5°C (z 47-50°C do 52-55°C — rys. 2).

Również dodatek jonów wapnia wpływał bardzo korzystnie na stabilność aktywności α -amylazy podczas ogrzewania (rys. 3). Jak pokazano na rysunku,

preparat kontrolny (bez dodatku jonów wapnia) ogrzewany w temp. 50°C po 120 min zachował około 45% aktywności wyjściowej, natomiast preparat z dodatkiem optymalnej dawki wapnia wykazywał około 70% aktywności. Temperatura 65°C inaktywowała α -amylazę w płynnym preparacie już po około 5 minutach. Optimum pH α -amylazy w płynnym preparacie oznaczone w temp. 30°C wynosiło 4,7-5,4 (rys. 4).

WNIOSKI

1. Stwierdzono, że spośród przebadanych soli nieorganicznych tylko $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dodany w ilości 0,5%, wpływał stabilizująco na α -amylazę w płynnym preparacie z *A. oryzae*.
2. Płynny preparat amylolytyczny z *A. oryzae* z dodatkiem optymalnej dawki jonów wapnia i przechowywany w temp. 5-10°C, posiadał trwałość około 1 roku.
3. Oprócz aktywności α -amylazy preparat posiadał aktywność amyloglukozydazy, dekstrynazy oraz proteazy i CMC-celulazy. Nie stwierdzono natomiast aktywności enzymów pektolitycznych.
4. Optimum działania α -amylazy w badanym preparacie leży w zakresie temp. 47-50°C i pH 4,7-5,4.
5. Jony wapnia w ilości 0,5% wpływają na podwyższenie optymalnej temperatury działania α -amylazy o 5°C oraz zwiększają jej termostabilność.

LITERATURA

- [1] Akabori Sh., Ikenaka T., Hagihara B.: The role of Calcium in the Catalytic Activity of α -Amylases, *J. Biochem.* 1954, **41**, 5, 577-581.
- [2] Boyer P. D., Lardy H., Myrback K.: The Enzymes, Academic Press, New York—London, Second Edition 1960, **4**, 313-344 (α -Amylases by Fischer E. H., E. A. Stein).
- [3] Feniksova R. V., Molodova G. A. (Фениксова Р. В., Молодова Т. А.): Получение кристаллической α -амилазы *Aspergillus oryzae*, *Микробиология*, 1964, **30**, 4, 601-610.
- [4] Metoda oznaczania aktywności enzymów proteolitycznych, otrzymana z Centralnego Instytutu Badawczego Przemysłu Spożywczego w Pradze, ČSRS.
- [5] Metoda oznaczania aktywności amyloglukozydazy, Biuletyn techniczny firmy Naarden, Holandia, 1966.
- [6] Nagy G., Bálint E. K., Györfi J.: Mikrobaeredetü cellulóz cellulolitikus aktivitásának vizsgálata, *A Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet Közleményei*, 1966, **1**, 26-29.
- [7] Oikawa A., Maeda A.: The role of calcium in Taka-Amylase A, *J. Biochem.*, 1957, **44**, 9, 745-752.
- [8] Oikawa A.: The role of calcium in Taka-Amylase A, II. The exchange reaction of calcium, *J. Biochem.*, 1959, **46**, 4, 463-473.
- [9] Perevozčenko I. I., Cyperovič A. S. (Перевозченко И. И., Цыперович А. С.): Сравнительное исследование свойств α -амилаз плесневых грибов рода *Aspergillus*, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1972, **8**, 1, 12—18.
- [10] Preparaty pektolityczne ZN-67-MPSS/C-190, *Biulet. Infor. Przem. Ow.-Warz.* 1968, **8/92**, 2-8.
- [11] Pronin S. J. (Пронин С. И.): Амилолитические ферменты и их роль в пищевой промышленности, Гизлегпищепром, Москва 1953, 167-168.
- [12] Ruchljadieva A. P., Gorjačeva M. G. (Рухлядева А. П., Горячева М. Г.): Метод

- определения активности амилолитических ферментов, Фермент. и спирт. пр-сть, 1966, 32, 1, 9-12
- [13] Šul'man M. S. (Шульман М. С.): Об инактивации ферментов, Фермент. и спирт. пр-сть, 1966, 31, 6, 6-7.
- [14] Šul'man M. S. (Шульман М. С.): Сорбция амилолитических ферментов, Пищевая промышленность, Москва 1966
- [15] Wieg A. J.: Enzymes used in the production of glucose and other starch derivatives, Materiały VI Konferencji Węgierskiego Przemysłu Spożywczego (VI. Élelmiszeripari Tudományos Ülešszak), Budapest — maj 1966.

Ю. Бэрнат, В. Жендовски

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИДКОГО АМИЛОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ИЗ *ASPERGILLUS ORYZAE*

Резюме

В зависимости от употребляемого штамма, условий производства и структуры (жидкость или твёрдое вещество) амилолитические препараты имеют разную прочность, а также разные свойства.

В связи с пуском в стране производства плесневых амилолитических препаратов поверхностным методом в жидком состоянии, обследовано стабильность этого препарата, а также определено его химический состав и энзиматическую активность.

Утверждено, что жидкий препарат стабилизированный ионами Са храненный в температуре 5 до 10°C спустя 6 месяцев сохранил около 95% исходной активности α -амилазы.

Активность α -амилазы в препарате составляли 1200 единиц SKB/г, оптимальной температуры действия 47-50° оптимум pH 4,7-5,4. Препарат содержит также в довольно значительных количествах другие амилолитические энзимы (амилоглюкозидазу, конечную декстриназу). Подтверждено также активность других сопровождающих ферментов, прежде всего протеолитических, с оптимальным действием pH около 4,5 а также целлулолитических.

J. A. Bernat, W. Rzędowski

STABILITÄT UND CHARAKTERISTIK EINES FLÜSSIGEN AUS *ASPERGILLUS ORYZAE* ERHALTENEN AMYLOLYTISCHEN PRÄPARATES

Zusammenfassung

Abhängig von dem angewandten Schimmelpilzstamm, den Produktionsbedingungen und der Konsistenz (flüssige oder feste Konsistenz) lassen sich amylolytische Präparate durch verschiedene Eigenschaften charakterisieren.

Im Zusammenhang mit der Inbetriebsetzung der Oberflächenproduktion flüssiger amylolytischer Enzyme in Polen, wurde die Haltbarkeit, die chemische Zusammensetzung und Aktivität eines solchen Präparates untersucht.

Es wurde festgestellt, dass das flüssige, mit Ca^{++} -Ionen stabilisierte und bei +5 bis +10°C gelagerte Präparat, nach 6 Monaten noch 95% der anfänglichen α -Amylase-Aktivität aufwies.

Die α -Amylase-Aktivität des Präparates betrug 1200 Einheiten SKB/g, die optimale Wirkungstemperatur 47—50°C, der optimale pH-Bereich 4,7—5,4. Das Präparat enthält auch wesentliche Mengen anderer amylolytischer Enzyme (Amyloglukosidase, Grenzextrinase). Es wurde ebenfalls die Aktivität anderer begleitender Enzyme, vor allem der proteolytischen mit einem optimalen pH-Wert von 4,5 und der cellulolytischen bestimmt.