

Marta Wilk*, Elżbieta Gąsiorek, Dominik Marzec

Katedra Bioutylizacji Odpadów Rolno-Spożywczych,
Instytut Chemii i Technologii Żywności, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

TWORZENIE CELULAZ I KSYLANAZ W PROCESIE BIOSYNTETY KWASU SZCZAWIOWEGO METODĄ HODOWLI W PODŁOŻU STAŁYM Z MAKUCHU RZEPAKOWEGO

Streszczenie: W pracy oceniano zdolność szczepów pleśni *Aspergillus niger*: S, C-12 oraz W-78-B do tworzenia enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych w procesie biosyntezy kwasu szczawiowego, prowadzonym metodą hodowli w podłożu stałym. Jako substrat zastosowano makuch rzepakowy, do którego w celu intensyfikacji tworzenia bioproduktu dodano metanol. Najlepszymi producentami celulaz były szczepy S oraz W-78-B, dla których najwyższą aktywność, około 45 U g⁻¹ s. m., uzyskano w 16. dobie procesu. W podłożu z metanolem maksymalną aktywność, wyższą o 5-8%, uzyskano w 9. dobie. Najwyższą aktywność ksylanaz, 59 U g⁻¹ s. m., uzyskano w 16. dobie dla szczepu A.n. S. Obecność metanolu nie wpłynęła na zwiększenie aktywności ksylanolitycznej.

Słowa kluczowe: makuch rzepakowy, kwas szczawiowy, celulazy, ksylanazy, *A. niger*.

1. Wstęp

Procesy enzymatyczne i techniki fermentacji stałych substratów są znane od wieków. Już człowiek jaskiniowy wyrabiał napoje alkoholowe z nasion i owoców, a w piramidach egipskich sprzed 6000 lat znaleziono bochenki chleba [1, 2].

Wraz z odkryciem glukoamylazy i zastosowaniem jej w celu pełnej hydrolizy skrobi do glukozy nastąpiło szersze wykorzystanie enzymów w przemyśle, przy czym początkowo stosowano głównie enzymy pochodzenia zwierzęcego i roślinnego; natomiast obecnie enzymy otrzymuje się przede wszystkim na drodze mikrobiologicznej [2].

Duże perspektywy zastosowania w różnych gałęziach przemysłu mają enzymy celulolityczne. Spowodowane jest to głównie tym, że cukry wielkocząsteczkowe, stanowiące substrat dla tych enzymów, są najbardziej rozpowszechnioną w przyro-

* Adres do korespondencji: marta.wilk@ue.wroc.pl.

dzie grupą spośród wszystkich substancji organicznych [3]. Szczególnie dotyczy to takich cukrów, jak celuloza i hemicelulozy.

Celuloza stanowi liniowy łańcuch cząsteczek β -anhydroglukozy połączonych ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi [4], natomiast hemicelulozy to niejednorodna grupa polimerów cukrów prostych, w których jednym z najważniejszych składników jest ksylan [5]. Głównym składnikiem ksylanu są, tworzące łańcuch, reszty ksylopiranozowe połączone wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Zależnie od pochodzenia tych cukrów, ich łańcuch główny może być podstawiony różnymi grupami bocznymi [6]. Celuloza, hemicelulozy i lignina wchodzi w skład kompleksu stanowiącego główny składnik budulcowy materiałów lignocelulozowych, takich jak odpady drzewne, zboża, trawy czy odpady komunalne [6;7].

W procesach biotechnologicznych wymienione wysokocząsteczkowe polimery wymagają obróbki enzymatycznej, aby przekształcić się w cząsteczki rozpuszczalne: mono- i dwucukry. Celulazy są kompleksem enzymów hydrolitycznych degradujących celulozę do celobiozy i glukozy, natomiast ksylanazy są hemicelulazami hydrolizującymi hemicelulozę do mieszaniny różnych cukrów i kwasów uronowych [2].

Ze względu na stały stan skupienia materiałów lignocelulozowych, korzystną metodą ich biokonwersji do cukrów jest metoda hodowli w podłożu stałym (ang. *solid state fermentation*), natomiast z powodu ograniczonego dostępu do wody w hodowlach prowadzonych tą metodą szczególnie przydatnymi organizmami są grzyby strzępkowe, które mogą się rozwijać w warunkach niższych wilgotności podłoża niż bakterie czy drożdże [8].

Wśród drobnoustrojów zdolność do biosyntezy enzymów celulolitycznych występuje u niektórych bakterii [9; 10; 11]; drożdży [12; 13] oraz grzybów strzępkowych [14; 15]. Te ostatnie należą do mikroorganizmów najbardziej aktywnych celulolitycznie i są reprezentowane przez takie rodzaje, jak *Aspergillus*, *Penicilium*, *Mucor*, *Trichoderma* [2;16].

Enzymy celulolityczne mają szerokie zastosowanie do produkcji glukozy oraz białka, polepszania strawności i wartości odżywczej pasz lub żywności oraz do przerobu materiałów lignocelulozowych na paliwa ciekłe, głównie etanol [4]. W przemyśle spożywczym preparaty celulolityczne stosuje się do trawienia i rozluźniania tkanek roślinnych, co ułatwia wydobywanie soków z owoców, warzyw, brzojki piwnej, skrobi z komórek ziemniaka, olejków eterycznych z różnych części roślin i ekstraktu z nasion kawy [3].

Preparaty ksylanolityczne, oprócz wyżej wymienionych zastosowań, wykorzystuje się do wytwarzania pulpy drzewnej, w obróbce mąki pszennej oraz do produkcji etanolu [6]. Możliwe jest również otrzymanie metodą biologiczną z ksylozy substytutu cukru, tj. ksylitolu, który ma zastosowanie w leczeniu diabetyków [17].

W prezentowanej pracy oceniano dynamikę tworzenia enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych, których sekrecja towarzyszyła procesowi biosyntezy kwasu szczawiowego prowadzonego metodą hodowli w podłożu stałym. Z wcześniej-

szych badań prowadzonych w Katedrze Bioutylizacji Odpadów Rolno-Spożywczych Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu wynika, że ten kwas organiczny jest syntezowany przez grzyby strzępkowe z gatunku *Aspergillus niger* z zastosowaniem makuchu rzepakowego jako substratu [18]. Jednym z kierunków badań prowadzonych w tym zakresie był dobór szczepów efektywnie tworzących kwas szczawiowy oraz próba intensyfikacji procesu biosyntezy poprzez dodanie metanolu do podłoża hodowlanego.

Celem badań prezentowanej pracy była ocena zdolności wybranych szczepów pleśni *A. niger* do syntezy celulaz i ksylanaz w danych warunkach hodowli, tj. w podłożu z makuchu rzepakowego z dodatkiem i bez dodatku metanolu.

2. Materiały i metody badań

2.1. Drobnoustroje

W badaniach stosowano pleśnie z gatunku *A. niger*, szczepy: S, C-12 i W-78-B pochodzące z kolekcji czystych kultur Instytutu Chemii i Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

Zarodniki pleśni przechowywano na słupkach ziemniaczanych w temperaturze około 4°C. Okres przechowywania w tych warunkach wynosił do dwunastu miesięcy.

2.2. Podłoże

Podstawowym składnikiem podłoża był makuch rzepakowy mielony (Petroestry Sp. z o.o., Jarząbkowo koło Malczewa). Skład makuchu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład makuchu rzepakowego

Składniki podstawowe [%]		Aminokwasy [g kg ⁻¹]		Makroelementy [g kg ⁻¹]		Mikroelementy [mg kg ⁻¹]	
Białko ogółem	34,0-36,0	Lizyna	19,4	Fosfor	12,4	Żelazo	200,0
Tłuszcz surowy	9,5-10,5	Cysteina	7,4	Wapń	6,0	Cynk	58,0
Włókno surowe	11,5-12,1	Metionina	5,3	Magnez	3,8	Miedź	4,8

Źródło: opracowanie własne na podstawie [19].

2.3. Sposób prowadzenia hodowli

Proces biosyntezy kwasu szczawiowego prowadzono metodą hodowli w podłożu stałym. W tym celu do 100 g makuchu rzepakowego dodawano wodę wodociągową w takiej ilości, aby wilgotność podłoża wyniosła 55%. Podłoże umieszczano w zlewkach o pojemności 1000 cm³ i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut.

Po wyjąłowieniu podłoże schładzano do temperatury około 30-32°C oraz szczepiono przez dodanie po 5 cm³ zawiesiny zarodników odpowiednich szczepów pleśni *A. niger*. Gęstość inokulum wynosiła od 2,84 do 5,2·10⁷ zarodników w 1 cm³.

Hodowlę prowadzono w cieplarni w temperaturze 30°C. Proces biosyntezy trwał 16 dni. Raz dziennie próby wyjmowano i intensywnie wstrząsano celem wymieszania podłoża. W celu zapewnienia wilgotności względnej powietrza na poziomie około 95% w cieplarni umieszczono krystalizator wypełniony wodą destylowaną, w której zanurzano złożoną bibułę filtracyjną.

Proces biosyntezy dla każdego z przyjętych wariantów prowadzono w dwóch powtórzeniach i jako wynik końcowy podawano średnią arytmetyczną obu oznaczeń.

3. Metody analityczne

Bezpośrednio w próbach pofermentacyjnych dokonywano pomiarów wilgotności (metodą grawimetryczną) oraz aktywności wody podłoża hodowlanego (za pomocą miernika aktywności wody Aqua Lab seria 3TE firmy Decagon), natomiast do oznaczenia pH, stężenia kwasów organicznych oraz aktywności enzymatycznej przygotowywano roztwór podstawowy. W tym celu 8 g przefermentowanego podłoża rozprowadzano w 100 cm³ wody destylowanej o temperaturze około 45°C. Po jednej dobie zawiesinę sączono i przesącz poddawano oznaczeniom analitycznym.

3.1. Oznaczanie stężenia kwasu szczawiowego

Stężenie kwasu szczawiowego oznaczano metodą HPLC przy użyciu kolumny Animex HPX-87H (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA) oraz detektora UV/VIS o długości fali 210 nm (Perkin Elmer). Fazą mobilną był 5 mM H₂SO₄. Szybkość przepływu wynosiła 0,6 cm³ min⁻¹, natomiast temperatura pomiaru była równa 20°C. Wyniki oznaczeń przeliczano na suchą masę podłoża.

3.2. Oznaczanie aktywności celulolitycznej

W celu oznaczenia aktywności CM-celulazy (EC 3.2.1.4) stosowano metodę opartą na reakcji scukrzania soli sodowej karboksymetylocelulozy jako substratu [20]. Inkubację prowadzono przez 30 minut w łaźni wodnej w temp. 50°C, przy pH 4,8. Ilość cukrów redukujących uwalnianych z substratu oznaczano metodą z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym [21]. Pomiaru absorbancji dokonywano stosując długość fali $\lambda = 530$ nm.

Aktywność celulaz wyrażano w μ molach związków redukujących (przyjmując glukozę jako standard) uwalnianych z substratu w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 g suchej masy podłoża (U g⁻¹ s. m.).

3.3. Oznaczanie aktywności ksylanolitycznej

Aktywność ksylanazy (E.C. 3.2.1.8) określano poprzez oznaczenie stężenia cukrów redukujących uwalnianych w hydrolizatach poinkubacyjnych enzymu z substratem, tj. 1% roztworem ksylanu brzozonego (30 min, temperatura 50°C, pH 4,8) [21].

Aktywność ksylanaz wyrażano w μmol ach cukrów redukujących (w przeliczeniu na ksylozę) uwalnianych z substratu w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 g suchej masy podłoża ($\text{U g}^{-1} \text{s. m.}$).

4. Wyniki badań i dyskusja

Ze składu chemicznego makucho rzepakowego wynika, że oprócz tłuszczu źródłem węgla dla drobnoustrojów jest w nim celuloza oraz towarzyszące jej hemicelulozy. Stopień wykorzystania tych polisacharydów zależy od aktywności enzymów hydrolizujących wiązania β -1,4-glikozydowe i uwalniających związki przyswajalne przez drobnoustroje. Do degradacji celulozy potrzebny jest kompleks enzymów celulozolitycznych, wśród których najważniejsze są: CM-celulaza, FP-aza oraz β -glukozydaza. Enzymem towarzyszącym jest ksylanaza rozkładająca ksylan. Spośród wymienionych enzymów w prezentowanej pracy oznaczano aktywność CM-celulazy i ksylanazy.

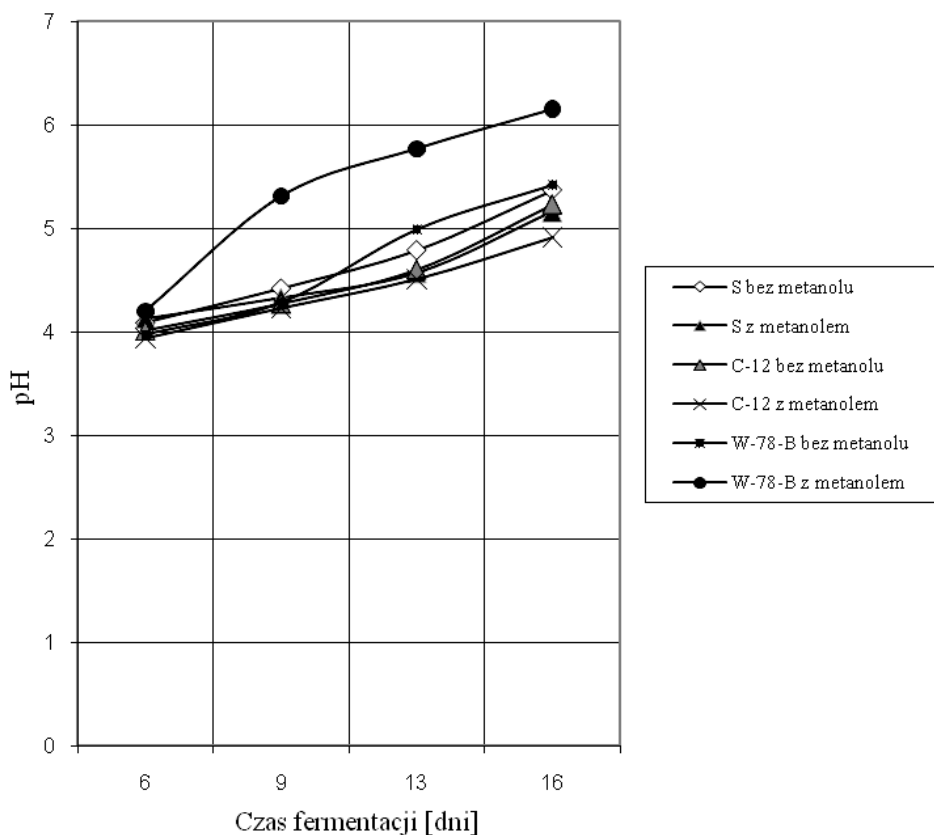
Dynamikę sekrecji enzymów oceniano w procesie, którego celem była intensyfikacja syntezy kwasu szczawiowego przez pleśnie *A. niger* poprzez dodanie metanolu do podłoża hodowlanego. Metanol dodawano w stężeniu 2% obj./wag. po sterylizacji i zaszczepieniu podłoża. Wpływ metanolu oceniano dla trzech wybranych szczepów pleśni *A. niger*, tj. S, C-12 oraz W-78-B. Przyjęte w badaniach warianty hodowli przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Warianty hodowli stosowane w badaniach

Nr próby	Szczep <i>A. niger</i>	Stężenie metanolu (% obj./wag.)
1	S	-
2		2,0
3	C-12	-
4		2,0
5	W-78-B	-
6		2,0

Na podstawie oceny wzrokowej stwierdzono, że pomimo codziennego mieszania, przerośnięty grzybnią makucho rzepakowy miał tendencję do zbijania się w aglomeraty o zróżnicowanej wielkości. Obserwacje potwierdziły też wcześniejsze doniesienia literaturowe o hamowaniu zarodnikowania przez dodatek do podłoża metanolu [22; 23; 24]. Dla każdego badanego szczepu obserwowano mniejsze zarodnikowanie hodowli w próbach, w których ten alkohol był obecny.

W bioprocessach prowadzonych metodą hodowli w podłożu stałym ważnym parametrem jest aktywność wody podłoża hodowlanego, decydująca o dostępności wody dla drobnoustrojów. Ocena tego parametru wykazała, że w czasie trwania procesu we wszystkich próbach aktywność wody wahała się w granicach od 0,95 do 0,99, czyli zgodnie z danymi literaturowymi [25] w zakresie optymalnym dla wzrostu i metabolizmu pleśni, w tym pleśni *A. niger*.



Rys. 1. Przebieg zmian pH prób w czasie trwania procesu biosyntezy

Źródło: opracowanie własne.

Istotnym czynnikiem kontrolującym biosyntezę kwasów organicznych jest również pH podłoża hodowlanego. W omawianym procesie nie korygowano naturalnego pH makuchu rzepakowego, które przed sterylizacją wynosiło 6,5, a po sterylizacji zmniejszało się do 5,4. Przebieg zmian tego parametru w czasie trwania fermentacji (rys. 1) wskazuje, że pomimo wytwarzania przez pleśń kwasu organicznego pH prób wzrastało w badanym okresie, tj. od 6. do 16. doby. Stwierdzenie to odnosi się do wszystkich zastosowanych wariantów hodowli. Zanotowane wartości pH, wy-

noszące od 4,0 do 6,1, mieściły się w zakresie optymalnym dla tworzenia kwasu szczawiowego [25].

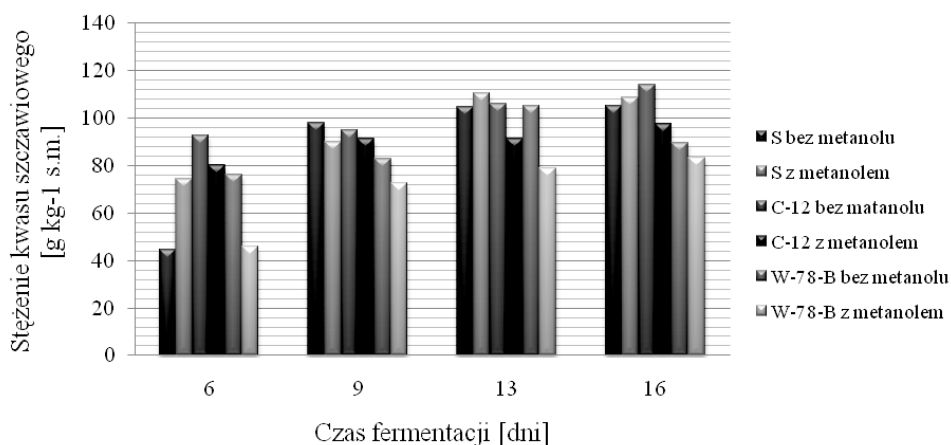
Analizie poddano również ilości kwasu szczawiowego wytworzonego przez wybrane szczepy pleśni *A. niger* w zależności od zastosowanego podłoża, tj. z obecnością i bez obecności metanolu.

Z danych zawartych w tabeli 3 i na rysunku 2 wynika, że najwyższe zdolności kwasotwórcze wykazał szczep *A. niger* C-12, który w szesnastej dobie hodowli syntezował około 115 g kwasu szczawiowego w przeliczeniu na jeden kg suchej masy podłoża. Nieco niższe stężenie produktu, równe około 105 g kg⁻¹ s. m. stwierdzano w hodowlach z użyciem szczepów S i W-78-B, przy czym maksymalne stężenie kwasu uzyskano w trzynastej dobie hodowli.

Tabela 3. Wpływ dodatku metanolu na stężenie kwasu szczawiowego

Nr próby	Szczep <i>A. niger</i>	Dodatek metanolu [% obj./wag.]	Czas fermentacji [dni]			
			Stężenie kwasu szczawiowego [g kg ⁻¹ s. m.]			
			6	9	13	16
1	S	-	44,7	97,9	104,7	105,1
2		0,2	74,3	90,0	110,4	108,8
3	C-12	-	92,9	95,1	106,0	114,3
4		0,2	80,3	91,3	91,3	97,7
5	W-78-B	-	76,2	82,8	105,0	89,8
6		0,2	46,1	72,7	79,0	83,3

Źródło: opracowanie własne.



Rys. 2. Przebieg zmian stężenia kwasu szczawiowego w podłożu z makucho rzepakowego z dodatkiem i bez dodatku metanolu

Źródło: opracowanie własne.

Dodanie metanolu do podłoża hodowlanego nie zwiększało ilości tworzonego kwasu szczawiowego, wręcz przeciwnie – w przypadku szczepów C-12 oraz W-78-B powodowało zmniejszenie stężenia produktu o odpowiednio 15 i 20%. Jedynie w przypadku szczepu S obecność metanolu zwiększała się nieznacznie, bo o około 5% ilość syntezowanego kwasu szczawiowego ($110 \text{ g kg}^{-1} \text{ s. m.}$), czyli do wartości nie wyższej niż dla szczepu C-12 w hodowli bez metanolu.

Z literatury tematu wynika, że zdania badaczy na temat wpływu alkoholu na przebieg i wydajność procesów biosyntezy kwasów organicznych są podzielone. Istnieją doniesienia o korzystnym wpływie dodatku alkoholi, takich jak metanol, etanol, izoproporanol, na wzrost biomasy grzybni *A. niger* i syntezę kwasu cytrynowego [22; 23; 26; 27] lub kwasu szczawiowego [28]. Są też jednak doniesienia o braku czy też o niekorzystnym wpływie metanolu na końcowe stężenia produktu [23; 24].

W badanym procesie oznaczano także aktywność CM-celulazy oraz ksylanazy, gdyż od aktywności tych enzymów zależy to, ile związków przyswajalnych przez drobnoustroje zostanie uwolnionych z wielkocząsteczkowych polisacharydów obecnych w makucho rzepakowym.

W tabeli 4 przedstawiono aktywności celulaz i ksylanaz wydzielonych do podłoża przez użyte w hodowli szczepy pleśni *A. niger*, natomiast na rysunkach 3 i 4 przedstawiono przebieg zmian aktywności tych enzymów w poszczególnych próbach hodowlanych.

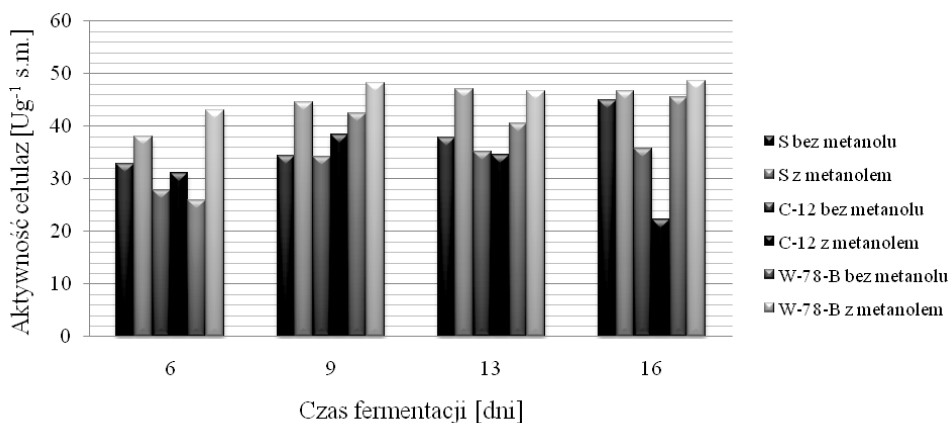
Analizując wyniki badań, można stwierdzić, że aktywność enzymów celulo-lytycznych zwiększała się w badanym okresie w miarę upływu czasu prowadzenia bioprocessu, uzyskując wartość maksymalną w 16. dobie hodowli. Szczepy S i W-78-B wykazały podobną aktywność celulo-lytyczną, na poziomie około $45 \text{ U g}^{-1} \text{ s. m.}$; natomiast dla szczepu C-12 aktywność ta była niższa i wyniosła około $36 \text{ U g}^{-1} \text{ s. m.}$ Dla wszystkich badanych szczepów w próbach z metanolem stwierdzano nieznaczne, bo o około 5-8%, zwiększenie aktywności celulaz, ale znacznie szybciej, tzn. w 9. zamiast w 16. dobie, następowało uzyskanie maksymalnych aktywności.

Tabela 4. Dynamika zmian aktywności enzymatycznej wybranych szczepów pleśni *A. niger* w podłożu z makucho rzepakowego z dodatkiem i bez dodatku metanolu

Nr próby	Szczep <i>A. niger</i>	Dodatek metanolu (% obj./wag.)	Aktywność celulaz [$\text{U g}^{-1} \text{ s. m.}$]				Aktywność ksylanaz [$\text{U g}^{-1} \text{ s. m.}$]			
			Czas fermentacji [dni]							
			6	9	13	16	6	9	13	16
1	S	-	32,93	34,43	37,95	44,99	53,5	51,48	52,04	58,9
2		2,0	38,04	44,55	47,02	46,75	55,3	42,83	38,22	31,59
3	C-12	-	27,82	34,25	35,13	35,75	43,16	33,16	31,02	34,06
4		2,0	31,08	38,39	34,6	22,36	48,22	37,09	35,29	31,92
5	W-78-B	-	25,89	42,53	40,5	45,61	28,55	24,95	25,85	26,08
6		2,0	43,05	48,24	46,75	48,69	35,29	38,01	40,91	53,08

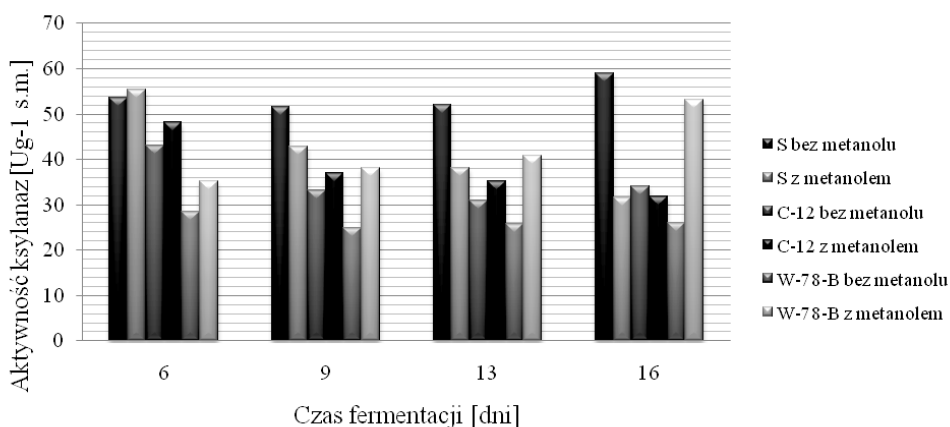
Źródło: opracowanie własne.

Wyniki badań dotyczące drugiego z syntezowanych enzymów wskazują, że najlepszym producentem ksylanaz, okazał się szczep *A. niger* S (rys. 4). Największą aktywność (około $59 \text{ U g}^{-1} \text{ s. m.}$) odnotowano w 16. dobie fermentacji, choć w 6. dobie była ona nieznacznie niższa i wyniosła około $54 \text{ U g}^{-1} \text{ s. m.}$ Szczepy C-12 i W-78-B charakteryzowała niższa zdolność sekrecji enzymów, a odnotowane aktywności to odpowiednio około 44 i $28 \text{ U g}^{-1} \text{ s. m.}$ Znamienne było jednak to, że znacznie wcześniej, bo już w 6. dobie pojawiały się maksymalne dla badanego okresu czasu aktywności.



Rys. 3. Przebieg zmian aktywności celulaz wybranych szczepów pleśni *A. niger* podczas hodowli w podłożu z makucho rzepakowego z dodatkiem i bez dodatku metanolu

Źródło: opracowanie własne.



Rys. 4. Przebieg zmian aktywności ksylanaz wybranych szczepów pleśni *A. niger* podczas hodowli w podłożu z makucho rzepakowego z dodatkiem i bez dodatku metanolu

Źródło: opracowanie własne.

W próbach z dodatkiem metanolu zaobserwowano, że nie poprawiał on zdolności szczepu najlepszego w zakresie wytwarzania ksylanaz, tzn. szczepu *A. niger* S, natomiast jego obecność poprawiała zdolność szczepów mniej efektywnych w tym zakresie, tj. szczepów C-12 oraz W-78-B. Należy przy tym zauważyć, że uzyskane w próbach z alkoholem zwiększenie aktywności, odpowiednio do 48 oraz 53 U g⁻¹ s. m. nastąpiło do poziomu nie wyższego niż dla szczepu S w hodowli bez metanolu (59 U g⁻¹ s. m.).

Z przeglądu danych literaturowych wynika, że w procesach biotechnologicznych z użyciem pleśni *A. niger* aktywności celulaz i ksylanaz były bardzo zróżnicowane, co było spowodowane różnorodnością stosowanych szczepów i źródeł węgla. Aktywności ksylanolityczne dla pleśni *A. niger* hodowanych na słomie ryżowej sięgają nawet 5070 czy 9100 U g⁻¹ [14, 29]. Niższe wartości, tj. 50,4 i 100 U g⁻¹ odnotowano w hodowli *A. niger* 3T5B8 na skórkach mango i otrębach pszennych [30].

W przypadku aktywności celulaz, badacze również podają zróżnicowane wartości. W hodowli mutantu pleśni *A. niger* KK2 na słomie ryżowej, aktywność celulolityczna wyniosła 130 U g⁻¹ [29]. Jecu [31], używając jako źródła węgla mieszanki słomy i otręb pszennych, odnotowała aktywność celulolityczną na poziomie 14,8 U g⁻¹, natomiast Chandra i in. [32] w hodowli *A. niger* na pastewnych orzechach ziemnych oraz otrębach pszennych i ryżowych uzyskali aktywności celulaz równe 1,36, 3,24 i 1,09 U g⁻¹.

Witkowska i in. [33] w podłożu ze zmielonej fasoli, zmielonych ziaren rzepaku, skrobi kukurydzianej oraz mąki sojowej uzyskali aktywności enzymów celulolitycznych w przedziale od 0,3 do 10,8 U g⁻¹, natomiast aktywność ksylanaz wyniosła 55,57 U ml⁻¹.

Rywińska i in. [34] w procesie prowadzonym metodą solid state najwyższą aktywność celulaz, ok. 13 U g⁻¹, odnotowali w hodowli szczepu pleśni *A. niger* 551 na wysłódkach buraczanych, natomiast najwyższą aktywność ksylanaz, około 115 U g⁻¹, na otrębach pszennych.

W badaniach nad biosyntezą kwasu cytrynowego metodą hodowli w podłożu stałym z wysłódków buraczanych aktywności celulaz i ksylanaz wyniosły odpowiednio 22 i 30 U g⁻¹ w hodowli statycznej, tzn. w zlewkach, natomiast w obrotowym bioreaktorze bębnowym uzyskano aktywność celulaz na poziomie 35 U g⁻¹ [35].

5. Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że procesowi biosyntezy kwasu szczawowego, prowadzonego metodą hodowli w podłożu stałym z makuchu rzepakowego, towarzyszyła synteza enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych.

2. Najwyższą aktywność celulaz, równą około 45 U g⁻¹ s. m., wykazały szczepy pleśni *A. niger*: S i W-78-B, przy czym dla obu szczepów maksymalne stężenie

kwasu szczawiowego, około 105 g kg⁻¹ s. m., uzyskano w trzynastej dobie hodowli, natomiast maksymalną aktywność celulaz uzyskano w 16. dobie hodowli.

3. Dla wszystkich badanych szczepów skrócenie czasu uzyskania maksymalnych aktywności celulolitycznych z 16 do 9 dób uzyskano w podłożu, do którego po sterylizacji dodano metanol w stężeniu 2% obj./wag. W próbach z metanolem stwierdzano niewielkie, bo o około 5-8% – zależnie od użytego szczepu – zwiększenie aktywności celulaz.

4. Najlepszym producentem ksylanaz okazał się szczep *A. niger* S, wykazujący aktywność równą około 59 U g⁻¹ s. m. w 16. dobie hodowli, przy czym w 6. dobie aktywność ta była tylko nieznacznie niższa, bo wyniosła około 54 U g⁻¹ s. m. Dodanie metanolu do podłoża nie poprawiało aktywności badanego enzymu. Stwierdzono natomiast, że w hodowlach z użyciem szczepów C-12 i W-78-B, czyli mniej efektywnych w tym zakresie, następował wzrost aktywności, ale do poziomu nie wyższego niż dla szczepu S w hodowli bez metanolu.

5. W przypadku wszystkich badanych szczepów dodatek metanolu powodował znaczne zmniejszenie procesu zarodnikowania hodowli.

Literatura

- [1] Mitchell D., Berovic M., *Solid state fermentation*, Bioprocess Engineering Course, Croatia, 1998, 128-166.
- [2] Leśniak W., *Biotechnologia żywności. Procesy fermentacji i biosyntezy*, Wyd. Akademii Ekonomicznej, Wrocław 2002.
- [3] Dłużewska A., *Technologia żywności 2*, WSiP, Warszawa 2008, 231-232.
- [4] Bujak S., Targoński Z., *Mikrobiologiczna degradacja materiałów ligninocelulozowych*, Postępy Mikrobiologii 1988, **3**, 211-241.
- [5] Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L., *Fuel ethanol production from lignocelluloses: a challenge for metabolic engineering and process integration*, Appl. Microb. Biotechnol. 2001, **56**, 17-34.
- [6] Tokaczewska-Zadora J., Rogalski J., Szczodrak J., *Enzymy rozkładające ksylan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii*, Biotechnologia 2005, **2 (69)**, 163-182.
- [7] Klimkowski K., Kulikowska D., *Produkcja bioetanolu z odpadów lignocelulozowych – możliwości i ograniczenia*, cz. 1. *Charakterystyka odpadów lignocelulozowych, metody obróbki wstępnej*, Gaz, Woda i Technika Sanitarna 2008, **1**, 29-32.
- [8] Pandey A., *Recent process developments in solid-state fermentation*, Precess Biochem. 1992, **27**, 109-117.
- [9] Battan B., Sharma J., Kuhad R.C., *High-level xylanase production by alkaliphilic Bacillus pumilus ASH under solid-state fermentation*, World J Microbiol Biotechnol 2006, **22**, 1281-1287.
- [10] Tseng M., Yap M., Ratanakhanokchai K., Kyu K.L., Chen S., *Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic Bacillus firmus*, Enzyme and Microbial Technology 2002, **30**, 590-595.
- [11] Rani D. S., Nand K., *Production of thermostable cellulase-free xylanase by Clostridium absolum CFR-702*, Process Biochemistry 2000, **36**, 355-362.
- [12] Gomes J., Gomes I., Steiner W., *Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast Cryptococcus adeliae: production and properties*, Extremophiles 2000, **4**, 227-235.

- [13] Liu W., Lu Y., Ma G., *Induction and glucose repression of endo-b-xylanase in the yeast Trichosporon cutaneum SL409*, Proc. Biochem. 1999, **34**, 67-72.
- [14] Kim S.W., Kang S.W., Lee J.S., *Cellulase and xylanase production by Aspergillus niger KKS in various bioreactors*, Biores. Technol. 1997, **59**, 63-67.
- [15] Christakopoulos P., Nerinckx W., Kekosb D., Macrisb B., Claeysens M., *Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from Fusarium oxysporum F3*, Journal of Biotechnology 1996, **51**, 181-189.
- [16] Bednarski W., Fiedurek J. (red.), *Podstawy biotechnologii przemysłowej*, Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007.
- [17] Wojtatowicz, M., *Zagospodarowanie wywaru gorzelniczego i innych odpadów rolnictwa. W ekspertyzie „Użycie odpadów rolniczych do produkcji użytecznych substancji chemicznych w procesach zielonej chemii i białej technologii – ocena możliwości naukowo-badawczych i wdrożeń”*, 2006, 18-26.
- [18] Gąsiorek E., Fronia J., Firuta P., Podgórski W., *Makuch rzepakowy jako substrat do biosyntezy kwasu szczawiowego metoda solid state*, Acta Sci. Pol., Biotechnologia 2007, **6 (3)**, 27-32.
- [19] <http://www.petroestry.pl/index.php?p=30>.
- [20] Mandels M., Andreotti R., *Measurement of saccharifying cellulose*, Biotechnol. Bioeng. Symp. 1976, **6**, 21-33.
- [21] Miller G.L., *Use of dinitrosalicylic as reagent for the determination of reducing sugars*, Anal. Chem. 1959, **31**, 426-428.
- [22] Podgórski W., *Kształtowanie aktywności oddechowej i kwasotwórczej Aspergillus niger podczas produkcji kwasu cytrynowego w podłożach z melasą trzcinową*, Wyd. Akademii Ekonomicznej, Wrocław 2002.
- [23] Szczodrak J., Ilczuk Z., *Wpływ alkoholu na syntezę kwasu cytrynowego przez pleśnie Aspergillus niger*, Przemysł Fermentacyjny i Rolny 1975, **6**, 20-21.
- [24] Gąsiorek E., Leśniak W., *Wpływ metanolu na biosyntezę kwasu cytrynowego metodą hodowli w podłożu stałym*, Technologia 9, Wyd. Akademii Ekonomicznej, Wrocław 2002.
- [25] Rymowicz W., Lenart D., *Oxalic acid production from lipids by a mutant of A. niger at different pH*, Biotechnol. Lett. 2003, **25**, 988-958.
- [26] Chmiel A., *Biosynteza kwasu cytrynowego metodą wglębną, cz. II. Podłoże produkcyjne*, Przemysł Fermentacyjny i Rolny 1974, **4**, 11-15.
- [27] Grewal H.S., Kalra K.L., *Fungal production of citric acid*, Pergamon 1995, **13(2)**, 209-216.
- [28] Rymowicz W., Lenart D., *Enhanced production of oxalic acid in Aspergillus niger by the addition of methanol*, EJPAU 2004, **7 (2)**.
- [29] Kang S.W., Park Y.S., Lee J.S., Hong S.I., Kim S.W., *Produktion of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass*, Biores. Technol. 2004, **91**, 153-156.
- [30] Couri S., da Costa T., Saavedra Pinto G., Pereira Freitas S., da Costa A.C., *Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by Aspergillus niger 3T5B8*, Process Biochem. 2000, **36**, 255-261.
- [31] Jecu L., *Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production*, Ind. Crop. Prod. 2000, **11**, 1-5.
- [32] Chandra S., M., Viswanath B., Reddy B.R., *Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by Aspergillus niger*, Ind. J. Microbiol. 2007, **47**, 323-328.
- [33] Witkowska D., Rywińska A., Piegza M., *Wytwarzanie fitaz, celulaz i ksylanaz przez wybrane szczepy grzybów strzępkowych*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 2007, **1 (50)**, 150-160.
- [34] Rywińska A., Witkowska D., Piegza M., Jarosz M., Salamon J., *Biosynteza fitaz, fosfataz oraz celulaz i ksylanaz w hodowlach grzybów strzępkowych w podłożu stałym*, Acta Sci. Pol., Biotechnologia 2007, **6 (2)**, 13-23.

- [35] Gąsiorek E., Leśniak W., *Production of cellulases during citric acid biosynthesis by solid-state fermentation*, Pol. J. Food Nutr. Sci. 2002, **11**, 31-37.

PRODUCTION OF CELLULASES AND XYLANASES DURING OXALIC ACID BIOSYNTHESIS BY SOLID STATE FERMENTATION FROM RAPESEED MEAL

Summary: In the paper three strains of *Aspergillus niger*: S, C-12 and W-78-B are examined for their ability to cellulases and xylanases biosynthesis during oxalic acid production by solid state fermentation system. Rapeseed meal was used as substrate and effect of methanol on oxalic acid concentration and hydrolytic enzymes activity was tested. The most effective producers of cellulase (EC 3.2.1.4) were *A. niger* S and W-78-B. The highest activity, achieved on the 16th day was about 45 U g⁻¹ s.s. In medium with methanol the maximum activity occurred on the 9th day and it was 5-8% higher. The best producer of xylanase (E.C. 3.2.1.8) was *A. niger* S and the highest activity, about 59 U g⁻¹ s.s., was achieved on the 16th day. Methanol addition did not enhance enzyme activity of *Aspergillus niger*. The advantages of the bioprocess are: its usage as rapeseed meal, a by-product from biodiesel production as a substrate and a simultaneous synthesis of oxalic acid and formation of valuable enzymes, e.g. cellulases and xylanases.

Key words: rapeseed meal, oxalic acid, cellulases, xylanases, *A. niger*.