

## Nagy pektinbontó képességű penészgomba-törzsek kiválasztása\*

ZACKEL ERNA

Kertészeti Egyetem Élelmiszertechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

Érkezett: 1971. február 4.

Számos tudományos dolgozat mutatott rá, hogy a korszerű gyümölcsleípar ma már nem nélkülözheti a pektinbontó enzimeket. Gyümölcslevek készítésénél ugyanis nehézséget okoz a gyümölcsben levő pektin, mivel a szűrt lével szembeni követelmény, hogy tükrös legyen.

A pektinbontó enzimek készítményeket többnyire penészgombák (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*) felhasználásával állítják elő (5).

A mikroorganizmusokból nyert pektinbontó készítmények különféle enzimeket, így elsősorban poligalakturonázt (PG) és pektinmetilészterázt (PE), ezenkívül úgynevezett kísérő enzimeket: oxidázokat és észterázokat tartalmaznak, amelyek a lé ízére és színére is hatással vannak (3).

A pektinbontó enzimek készítmények a gyümölcslevek előállításánál összetett szerepet töltenek be: növelik a lé tisztíthatóságát, felszabadítják a pektinanyagok által közrezárt sejtnedvet és ezáltal növelik a léhozamot, valamint a lé színére és aromaanyagaira is kedvezően hatnak.

Hazánkban jelenleg felületi tenyésztési eljárással iparilag állítanak elő pektinbontó enzimpreparátumot, amely Polizim néven kerül forgalomba. Az enzimet a V 770/3 *Aspergillus foetidus* korpás tenyészetéből vizes extrakcióval nyerik.

A fermentációs technológia fejlődése lehetővé teszi a penészgombák szubmersz úton való tenyésztését is. Ez a technológia korszerűbb, hátránya viszont az, hogy kisebb aktivitású pektinbontó enzim nyerhető szubmersz úton, mint felületi tenyésztéssel. E fermentációs technológiával a paraméterek tökéletesen betakaríthatók, ezért célszerűbb a szubmersz tenyésztésre áttérni.

A felületi tenyésztésre alkalmas *Aspergillus foetidus* törzs szubmersz fermentálás során gyenge enzimermelőnek bizonyult (8).

Kísérletünk célja nagy aktivitású, szubmersz tenyésztésre alkalmas penészgomba-törzs szelektálása volt. Ennek érdekében 51 különböző eredetű penészgomba-törzset vizsgáltunk meg rázott tenyészetben, amelynél irodalmi adatok alapján várható volt pektinbontó enzimermelés.

### Anyag és módszerek

#### *A fermentált anyagon végzett vizsgálatok*

A penészgomba-törzseket rövid ferde malátás táptalajon tartottuk, steril paraffin olaj alatt. A fermentálási kísérlethez a tartósított tenyészetről ferde malátára leoltást végeztünk, majd ezt tovább oltva egy hetes tenyészetet használtunk fel. A konidium tömeget 2<sup>0</sup>/<sub>00</sub>-es steril Na-szulfolaurát oldatban felfuszpendáltuk és ezzel oltottuk be a fermentáláshoz előkészített tápoldatot úgy, hogy annak kezdeti csíraszám 10<sup>5-6</sup> konidium/ml lett.

\* A MTA Élelmiszertudományi Bizottsága, a Magyar Élelmiszeripari Tudományos Egyesület és a KÉKI közös rendezésében tartott tudományos kollokviumon elhangzott előadás (Szerk.).

A fermentáláshoz korpátápoldatot használtunk. A tápoldat 1 rész 80%-os kiörlésű búzakorpát és 9 rész csapvizet tartalmazott, a keveréket 15 percig forraltuk, majd forrón vattán leszűrjük. A szűrletet 2800 fordulattal 20 percig centrifugáltuk. A tápoldat pH-ját 10%-os HCl-val 4,0-ra állítottuk be. A tápoldat szárazanyagtartalmát csapvízzel 2,5-ref. %-ra hígítottuk. Nitrogén pótlás céljából 0,6%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adtunk hozzá. A tápoldatot 250 ml-ként literes Erlenmeyer-lombikba szétmértük. Habzsgátlás céljából 1 ml felolvaszított sertézsírt adagoltunk hozzá. A sterilizálás 1 atm-n 30 percig tartott.

A beoltás után a lombikokat állandó rázás mellett (104 löket/perc) 28 °C-on inkubáltuk.

A levegőellátottság *Fernstrom* és *Miller* módszerével meghatározva 24 óra alatt 0,36 g  $\text{O}_2$ /100 ml térfogat volt. A rázatott kultúrákat 48 óráig fermentáltuk, ez idő letelte után ellenőriztük a fermentálé szárazanyagtartalmát és a pH-értékét. Megmértük a fermentálé és a szűrt micélium mennyiségét is. Továbbá meghatároztuk a fermentálé és a száraz micélium pektinbontó enzim aktivitását.

Az aktivitást 0,6%-os Pomosin pektin ( $G^\circ = 250$ ) oldat 50 °C-on bekövetkező viszkozitáscsökkenésével mértük és a Szefikus Pektolitos Aktivitásban ( $\text{SPA}_{75}$ ) fejeztük ki. A viszkozitást módosított Ostwald-féle viszkoziméterrel mértük 25 °C-os ( $\pm 0,5$ ) vízfürdőben.

Az eredeti érték százalékában kifejezett viszkozitáscsökkenés az ún. bontási fok ( $B^\circ$ ) (7). Különböző enzimbemérésekhez tartozó bontási fok értékekből interpolálással meghatározható (4) az az enzimmennyiség, amely adott körülmények között (0,6%-os pektin oldat, 50 °C-on 1 óra) a szefikus viszkozitás 75%-os csökkenését ( $B^\circ = 75$ ) eredményezi ( $\text{SPA}_{75}$ ) (6). Ebből az értékből számítottuk a Szefikus Pektolitos Aktivitást ( $\text{SPA}_{75}$ ), amely megmutatja, hogy a szóbanforgó enzimmennyiség 1 kg/ja vagy 1 literje hány liter 0,6%-os pektinoldatot tud 1 óra alatt 50 °C-on 75%-ig lebontani (6).

A micélium aktivitását is  $\text{SPA}_{75}$ -ben adtuk meg, amely jelen esetben azt mutatja, hogy az 1 literben levő (változó mennyiségű) száraz micélium 1 óra alatt hány liter pektint tud 50 °C-on 75%-ig lebontani.

A fermentálé és a száraz micélium Szefikus Pektolitos Aktivitását összegezve kapjuk meg az összaktivitást.

Minden kísérlet során felállítottuk a teljes enzimmérleget. Az enzimmérleg kifejezi az 1 liter fermentálé és szárazmicélium aktivitásának %-os arányát.

A fermentálé aktivitás mérésénél öt koncentrációból (0,5, 1, 2, 4, 8 ml) álló sorozatot készítettünk.

A micélium aktivitását kétszeres mennyiségű homokkal való feltárás után mértük. Szintén egy koncentráció sort készítettünk (0,5, 1, 1,5, 3, 6, 8 g), amelyet 5 ml desztillált vízben elszuszpendáltunk.

Minden vizsgálatot 50 ml (0,6%) pektin oldattal végeztük.

### A kísérleti eredmények

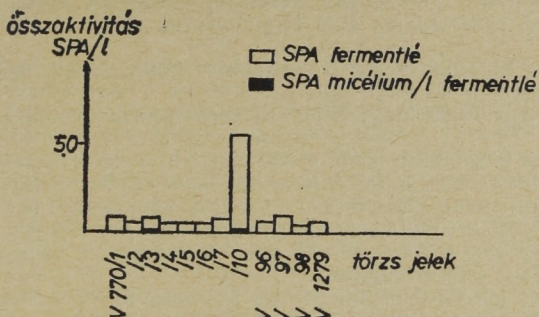
A vizsgált törzseket három csoportra osztottuk:

- Az Élelmiszertechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék V jelzésű törzsei.
- Az Élelmiszertechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék P – Z jelzésű törzsei.
- A Szőlészeti Kutató Intézet törzsei.

Vizsgálataink során ellenőriztük a fermentáléban bekövetkező változást. A tápoldat szárazanyagtartalma 2,5 ref.% volt, ez a fermentálás során majd minden esetben 1,8 – 1,0%-ra, a kezdeti 4-es pH érték a fermentálás után 2,0 – 1,0-ra csökkent.



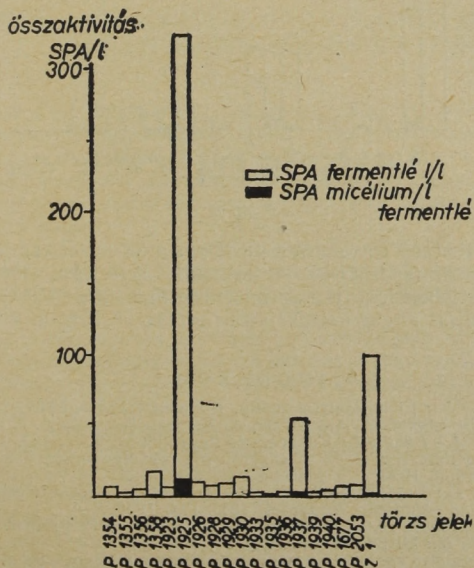
A V jelzésű törzsek enzimmérlegét az 1. ábra szemlélteti, azaz összaktivitás megoszlása a fermentlé és a micélium között.



1. ábra

Az egyes törzsek fermentlé és micélium aktivitás értékeit az általunk kontrollnak választott *Aspergillus foetidus* V 770/3 törzs értékeihez hasonlítottuk. Vizsgálataink szerint a fermentlé 16,6 SPA<sub>75</sub>, az 1 liter fermentléből nyert száraz micélium is meglehetősen kis értéket mutatott SPA<sub>75</sub> = 0,75. A fermentlé aktivitása az összaktivitás %-ában 96,1% volt.

A V jelzésű törzsek közül a V 770/10-es *Aspergillus oryzae* emelkedik ki. A fermentlé SPA<sub>75</sub> értéke 61,5-nek felelt meg. Az 1 liter fermentlében levő száraz



2. ábra

micélium aktivitása is jó eredményt mutatott, mivel az SPA<sub>75</sub> = 5,0 volt. Balkay (1) közlése szerint ha a korpa tápoldat nem sűrítmény, akkor a micélium aktivitása általában 1–2 SPA<sub>75</sub> értékű. A fermentált anyag összaktivitása 66,5 SPA<sub>75</sub>. A penészgomba által termelt enzim 92,49%-ban a fermentlében található.

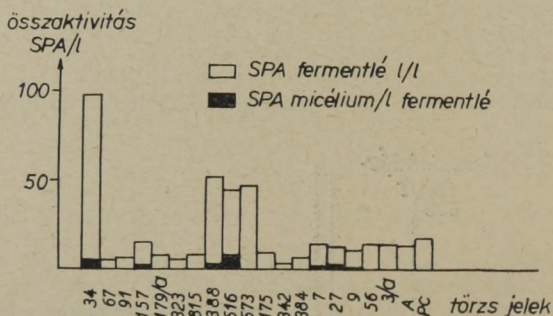
A törzsek második csoportjában többenél tapasztaltunk nagyobb mennyiségű pektináz enzimtermelést.

A 2. ábra a Tanszéki P, Z jelzésű penészgomba törzsek enzim mérlegét szemlélteti.

E törzsek közül kiemelkedő eredményt a P 1925-ös *Aspergillus awamori* Nakazawa penészgomba adta. A fermentlé 303-as SPA<sub>75</sub> értéket adott, amely a kontroll törzs tizennyolcszorosa. Az egy liter fermentléből nyert száraz micélium 23 SPA<sub>75</sub> értéket mutatott, ami a kontroll 31-szerese. A penészgomba által termelt enzim 93%-a fermentlében volt. A fermentált anyag összaktivitási értéke 326 SPA<sub>75</sub> értéket mutatott.

A Z-1-es jelzésű *Penicillium* törzs fermentlé SPA<sub>75</sub> = 98-as értéket mutatott. Az 1 liter fermentléből nyert száraz micélium 2,4 SPA<sub>75</sub> volt. A fermentált anyag összaktivitási értéke 100,4 SPA<sub>75</sub> volt. A penészgomba által termelt pektináz a fermentlében 97,6%-ban volt található.

A 3. ábra szemlélteti a Szőlészeti Kutató Intézet penészgomba törzseinek enzim mérlegét.



3. ábra

A Szőlészeti Kutató Intézet törzsei közül a 34-es jelzésű *Aspergillus niger* mutatkozott jó enzimtermelőnek. A fermentlé aktivitása elérte a 100 SPA<sub>75</sub> értéket. A fermentlében levő száraz micélium Specifikus Pektolitos Aktivitása 7,7 volt. A fermentált anyag összaktivitási értéke 95,16%-át a fermentlé adta.

#### IRODALOM

- (1) Balkay, A. – Vas, K.: Élelmiszertudomány, Budapest, 1–19, 1967.
- (2) Cooper, C. M. – Fernstrom, G. A. – Miller, S. A.: Ind. Eng. Chem. 6, 504, 1944.
- (3) Fábri, I. – Nagy, J. – Pándi, I.: Konzerv- és Paprikaipar. 3. sz. 107, 1967.
- (4) Kyzlink, V.: O účinnosti filtračních enzymů při pektolyse ovocných stav. Průmyslové Vydavatelství, Praha, 1950.
- (5) Vas, K. – Prosz, G.: Pektinkutatások újabb eredményei. Élelmiszeripari és Begyűjtési Könyv- és Lapkiadó Vállalat, Budapest, 131–174, 1953.
- (6) Vas, K.: Progress report IAEA Food Irradiation. Laboratory Programme 1965.
- (7) Weber, F. – Deuel, H.: Mitt Lebensm. Hyg. 36, 383, 1945.
- (8) Zackel, E.: Pektinbontó enzimkészítmények szubmersz fermentációs előállításához törzsselekcio végzése. Kertészeti Egyetem Élelmiszertechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék, Budapest, 1968.



## ВЫБОР ПЛЕСНЕВЫХ ШТАММОВ С ВЫСОКОЙ ПЕКТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Э. Заскел

Автор ставил целью проведение селекции штамма продуцента высокоактивного пектолитического фермента в условиях глубинного метода культивирования. Эту работу обосновывает тот факт, что требования отечественной промышленности по ферментам для переработки фруктов с года в год показывает повышающую тенденцию покрытие которой намечают решить внедрением современной технологией глубинного метода культивирования.

В опытных работах во всех случаях изготовляли ферментативный баланс и наблюдали, что 90–100% пектиназы продуцированной плесневыми грибами находим в ферментной жидкости, значит в мицелии остаётся только незначительное количество пектиназы. Из исследованных 51 различных зарубежных и отечественных и зарубежных плесневых штаммов удалось селективировать штаммы активность которых высшая *Аспергиллус фозтидус* V–770/3 подходящего для глубинного культивирования. Эти следующие:

Первый, *Аспергиллус авамори* Наказава знака P 1925 активность которого 18-ти кратная; второй *Аспергиллус нигер* 34 активность которого 6-ти кратная, потом следовал штамм *Пенициллус оризае* с 5,9 кратной активностью и четвёртый *Аспергиллус оризае* V–770 активность которого 3,5-ти кратная контрольного штамма *Аспергиллус фозтидус* V–770/3. Эта серия испытаний содержит результаты первой работы селекции и является основой дальнейших опытных работ по повышению активности, по составлению соответствующей питательной среды и разработке оптимальных условий ферментации.

## SELEKTIERUNG VON SCHIMMELPILZ-STÄMMEN MIT GROSSER PEKTINABBAUFÄHIGKEIT

E. Zackel

Die Zielsetzung der Versuche der Verfasserin war die Selektierung eines ein Enzym mit grosser Pektinabbaufähigkeit produzierenden Stammes unter submersen Züchtungsbedingungen. Die Arbeit wurde für notwendig erachtet, da der Enzymanpruch der einheimischen obstverarbeitenden Industrie von Jahr zu Jahr ansteigt und dieses Problem durch die zeitgemässe submerse Technologie gelöst werden kann.

Im Laufe der Versuche wurde in allen Fällen eine Enzymwaage bereitet und festgestellt, dass die vom Schimmelpilz produzierte Pektinase zu 90–100% im Fermentsaft enthalten ist, im Mycelium bleibt nur eine ganz geringe Menge der Pektinase zurück.

Von den 51 einheimischen und ausländischen Schimmelpilzstämmen verschiedener Abstammung gelang es für die submerse Züchtung geeignete Stämme zu selektieren, die über eine grössere Aktivität verfügten, als *Aspergillus foetidus* V 770/3. Diese waren die folgenden:

Der erste war *Aspergillus awamori* Nakazawa P 1925, mit einer 18-fachen, der zweite *Aspergillus niger* 34 mit einer 6-fachen, hierauf folgte *Penicillium Z-1* mit einer 5,9-fachen, der vierte war *Aspergillus oryzae* V 770 mit einer 3,5-fachen Aktivität im Vergleich zur Fermentsaftaktivität des Schimmelpilz-Kontrollstammes *Aspergillus foetidus* V 770/3.

Diese Versuchsreihe enthält die Ergebnisse der ersten selektierenden Arbeit und bildete die Grundlage von weiteren Versuchen zwecks weiterer Erhöhung der Aktivität, Ausarbeitung einer entsprechenden Nährlösung und optimaler Bedingungen der Fermentation.

## SELECTION OF MOULD STRAINS OF IMPROVED CAPABILITY OF PECTOLYSIS

*E. Zackel*

Experiments were undertaken in order to select a mould strain producing under submersed conditions of culturing, a pectolyzing enzyme of high activity. This became necessary since the enzyme requirement of the Hungarian fruit processing industry shows from year to year an increasing trend, and the demands can be met only by an up-to-date submersed technology of enzyme production.

In the course of the experimental work, an enzyme balance has been prepared in each case. It was experienced that 90 to 100% of pectinase produced by the mould can be found in the fermentation liquor while the mycelia contain only a negligible residue of pectinase. In the course of the screening of 51 Hungarian and foreign strains of mould of various origin the author succeeded in selecting some strains with an activity exceeding that of *Aspergillus foetidus* V 770/3 and suitable for submersed culturing. These strains are as follows.

*Aspergillus awamori* Nakazawa P 1925, with a 18-fold activity, followed by *Aspergillus niger* 34 with a 6-fold activity, *Penicillium Z-1* with a 5.9-fold activity and *Aspergillus oryzae* V 770/ with a 3.5-fold activity of the activity of the fermentation liquor of the mould strain *Aspergillus foetidus* V 770/3.

The presented experimental data were obtained as a result of the first step of the selection work forming the basis of further experiments aimed at raising the activity and at establishing by experiments the optimum composition of nutrient solution and of fermentation conditions.

## SÉLECTION DE SOUCHES DE MOISSURES PRODUISANT DES ENZYMES PÉCTOLYTIQUES

*E. Zackel*

L'objectif des expériences effectuées par l'auteur était de sélectionner une souche à capacité élevée de produire des enzymes pectolytiques en culture submergée. Le travail était nécessité par le fait que le travail des fruits en Hongrie exige des quantités d'enzyme augmentant d'année en année. Cette exigence ne peut être couverte que par la technologie moderne submergée.

Au cours des expériences on a fait le bilan des enzymes et on a établi que 90 à 100% de la pectinase synthétisée par la moisissure se trouvent dans le liquide, le mycélium ne contenant donc que des quantités négligeables d'enzymes. On a soumis à l'examen 51 souches diverses d'origine hongroise et étrangère dont plusieurs montraient une activité productrice plus élevée de celle de la souche *Aspergillus foetidus* V 770/3.

La souche *Aspergillus awamori* Nakazawa P 1925 avait une activité 18 fois plus élevée, la souche *Aspergillus niger* 34 une production 6 fois plus élevée que la souche *Aspergillus foetidus* V 770/3, tandis que ce taux était 5,9, resp. 3,5 chez *Penicillium Z-1* et *Aspergillus oryzae* V/770.

Cette série d'expériences n'est que la première étape de la sélection. Le travail à suivre a pour objectif l'augmentation ultérieure de l'activité et l'établissement d'une composition optimale du moyen nutritif et la choix des paramètres de la fermentation.