

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIV, 21

SECTIO E

1979

Instytut Gleboznawstwa i Chemii Rolnej Wydziału Rolniczego
Akademii Rolniczej w Lublinie

Katedra Zastosowań Matematyki Wydziału Techniki Rolniczej
Akademii Rolniczej w Lublinie

Tadeusz SKOWROŃSKI,
Agnieszka CHMIELNICKA, Teresa SKOWROŃSKA

Wpływ podłoża na produkcję fitazy przez *Aspergillus niger*

Влияние питательной среды на продукцию фитазы
изготавливаемой *Aspergillus niger*

The Influence of Medium on the Production of Phytase by *Aspergillus niger*

WSTĘP

Sześćciofosforan myo-inozytolu ulega hydrolizie pod wpływem fitazy (EC 3.1.3.8). Enzym ten występuje u wielu glebowych mikroorganizmów (4, 5, 12). Jednak fitaza zwraca uwagę nie tylko ze względu na rolę, jaką odgrywa w przemianach fosforu organicznego gleby, lecz również z powodu możliwości zastosowania preparatów tego enzymu w żywieniu zwierząt (8, 9, 10).

W przedstawionej pracy autorzy dążyli do ustalenia takiego składu podłoża, przy którym po hodowli *Aspergillus niger*, można by uzyskać płyny pohodowlane o możliwie najwyższej aktywności fitazy.

MATERIAL I METODY

ODCZYNNIKI

Sól sodową sześćciofosforanu myo-inozytolu Typ V (98%) otrzymano z Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri USA. Siarczan metylo-p-aminofenolu otrzymano z Łódzkich Zakładów Chemicznych (Polska). Pozostałe odczynniki pochodziły z POCh Gliwice (Polska).

ORGANIZM I HODOWLA

Aspergillus niger III An/8 hodowano w sposób podany w publikacji (13), stosując pożywkę Czapeka wzbogaconą skrobią, w której zmieniano stężenia skrobi, azotu, fosforu oraz pH w zależności od kombinacji doświadczenia.

OZNACZENIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Aktywność fitazy określana była na podstawie uwalniającego się ortofosforanu metodą Fiske i Subbarowa (3). Mieszanina inkubacyjna zawierała 0,9 ml buforu octanowego o pH 5,5 z 2,37 μ molami zubożonej soli sodowej sześćfosforanu myo-inozytolu oraz 0,1 ml płynu pohodowlanego. Inkubację prowadzono w 40° przez 30–60 min. Reakcję przerywano przez dodanie 1 ml 10% kwasu trójchlorooctowego.

Za jednostkę aktywności przyjęto tę ilość enzymu, która uwalnia z substratu 1 μ mol fosforu nieorganicznego w ciągu jednej minuty w wyżej podanych warunkach.

METODA PLANOWANIA DOŚWIADCZEŃ I ANALIZY WYNIKÓW

W niniejszej pracy badano zależność między aktywnością fitazy *Aspergillus niger* (y) a czynnikami: A (skrobia), B (NaNO_3), C (P_i jako K_2HPO_4) oraz D (pH). Poszukując optymalnej kombinacji poziomów tych czynników, zastosowano metodę powierzchni reakcji (1, 2).

Metoda powierzchni reakcji łączy teorię planowania doświadczeń czynnikowych z teorią regresji. Stosując tę metodę możemy określić kombinacje poziomów czynników, dla których reakcja jest maksymalna. Zagadnienie to sprowadza się do znalezienia ekstremum lokalnego funkcji wielu zmiennych (powierzchni reakcji), jeśli ono istnieje w badanym obszarze zmienności, lub do podania wskazówek dotyczących dalszego eksperymentowania. Metoda powierzchni reakcji jest wykorzystywana przy rozwiązywaniu wielu zagadnień optymalizacyjnych, pojawiających się w różnych dyscyplinach naukowych (2, 6, 7).

WYNIKI I DYKUSJA

W poprzedniej pracy (13) stwierdzono, że aktywność fitazy płynów pohodowlanych *A. niger* jest uzależniona od poziomu skrobi i fosforanu nieorganicznego w podłożu. Podobną zależność stwierdzili w stosunku do *A. ficuum* Shieh i Ware (12).

Dążąc do uzyskania maksymalnej aktywności enzymatycznej *A. niger*, przeprowadzono badania w dwu etapach, uwzględniając czynniki wymienione już poprzednio.

W pierwszym etapie wykonano doświadczenie czynnikowe typu 2^k , obejmujące $2^k = 16$ kombinacji. Każdy z czterech czynników występował w dwu poziomach, niższym i wyższym. Ponadto wykonano dodatkowo kombinację centralną w dziewięciu replikacjach (czynniki występowały w poziomach środkowych). Tabela 1 podaje wartości poziomów czynników użyte w doświadczeniu, natomiast dane eksperymentalne zamieszczono w tab. 2.

Tab. 1. Poziomy czynników w pierwszym doświadczeniu
Levels of factors in the first experiment

Czynnik Poziomy	A skrobia %	B NaNO ₃ g/l	C P _i mg/100 ml	D pH
Poziom wyższy (+1)	8	14	8,5	7
Poziom środkowy (0)	5	8	4,5	5
Poziom niższy (-1)	2	2	0,5	3

Tab. 2. Aktywność fitazy płynów pochodzących w pierwszym doświadczeniu
Phytase activity in culture fluid in the first experiment

Nr kombinacji	Oznaczenia kombinacji				Zmienne				Aktywność fitazy (y) U/ml
					A	B	C	D	
					skrobia %	NaNO ₃ g/l	K ₂ HPO ₄ mg P _i /100 ml	pH	
1	A ₋₁	B ₋₁	C ₋₁	D ₋₁	2	2	0,5	3	0,32
2	A ₋₁	B ₋₁	C ₋₁	D ₊₁	2	2	0,5	7	0,30
3	A ₋₁	B ₋₁	C ₊₁	D ₋₁	2	2	8,5	3	0,16
4	A ₋₁	B ₋₁	C ₊₁	D ₊₁	2	2	8,5	7	0,12
5	A ₋₁	B ₊₁	C ₋₁	D ₋₁	2	14	0,5	3	0,44
6	A ₋₁	B ₊₁	C ₋₁	D ₊₁	2	14	0,5	7	0,44
7	A ₋₁	B ₊₁	C ₊₁	D ₋₁	2	14	8,5	3	0,32
8	A ₋₁	B ₊₁	C ₊₁	D ₊₁	2	14	8,5	7	0,28
9	A ₊₁	B ₋₁	C ₋₁	D ₋₁	8	2	0,5	3	0,28
10	A ₊₁	B ₋₁	C ₋₁	D ₊₁	8	2	0,5	7	0,28
11	A ₊₁	B ₋₁	C ₊₁	D ₋₁	8	2	8,5	3	0,09
12	A ₊₁	B ₋₁	C ₊₁	D ₊₁	8	2	8,5	7	0,09
13	A ₊₁	B ₊₁	C ₋₁	D ₋₁	8	14	0,5	3	0,98
14	A ₊₁	B ₊₁	C ₋₁	D ₊₁	8	14	0,5	7	1,26
15	A ₊₁	B ₊₁	C ₊₁	D ₋₁	8	14	8,5	3	0,34
16	A ₊₁	B ₊₁	C ₊₁	D ₊₁	8	14	8,5	7	0,28
17a	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,48
17b	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,37
17c	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,42
17d	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,52
17e	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,43
17f	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,44
17g	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,45
17h	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,60
17i	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	5	8	4,5	5	0,50

Chcąc porównać ważność poszczególnych czynników, obliczamy znormalizowane cząstkowe współczynniki regresji (11) dla aktywności fitazy względem A, B, C, D na podstawie wyników doświadczalnych z tab. 2.

Wynoszą one odpowiednio: $b'_A=0,293$, $b'_B=0,648$, $b'_C=-0,652$, $b'_D=0,046$. Na ich podstawie można stwierdzić, że największy wpływ na aktywność fitazy płynów pochodowlanych mają: fosfor (C) i azot (B), a następnie skrobia (A). Natomiast wpływ czynnika pH (D) okazał się nieistotny.

Dążąc do uzyskania wyższej aktywności enzymatycznej zaplanowano drugie doświadczenie, w którym odczyn ustalono na stałym poziomie pH 5. Jako punkt wyjścia (czyli kombinację centralną) przyjęto kombinację 14 z tab. 2, ponieważ aktywność enzymatyczna płynów pochodowlanych przy tej kombinacji była największa. Przeprowadzono to doświadczenie zgodnie ze schematem ortogonalnego rotacyjnego planu drugiego stopnia (14). Obejmowało ono $N=2^k+2k+n_0$ kombinacji, gdzie $k=3$, $n_0=9$, $\alpha=1,682$ (tab. 4), przy czym wartości poziomów czynników, użyte w tym eksperymencie, podano w tab. 3.

Tab. 3. Poziomy czynników użyte w drugim eksperymencie
Levels of factors in the second experiment

Czynniki Poziomy	A skrobia %	B NaNO ₃ g/l	C P _i mg/100 ml
Poziom wyższy (+1)	9	18	0,7
Poziom średni (0)	8	14	0,5
Poziom niższy (-1)	7	10	0,3
Poziomy gwiazdne $\alpha=1,682$ $\alpha=-1,682$	9,68 6,32	20,73 7,27	0,84 0,16

W oparciu o uzyskane dane eksperymentalne (tab. 4) oszacowano funkcję regresji drugiego stopnia postaci:

$$y = 1,062 + 0,057x_1 + 0,005x_2 + 0,042x_3 - 0,069x_1^2 - 0,041x_2^2 + 0,001x_3^2 + \\ + 0,042x_1x_2 - 0,080x_1x_3 + 0,042x_2x_3$$

Funkcja ta określa zależność między aktywnością fitazy płynów pochodowlanych a zmiennymi standaryzowanymi x_1 , x_2 , x_3 , które są powiązane z czynnikami A, B, C następującymi zależnościami (14):

$$x_1 = \frac{A-8}{1}; \quad x_2 = \frac{B-14}{4}; \quad x_3 = \frac{C-0,5}{0,2}$$

Aby wyznaczyć ekstremum otrzymanej funkcji, posłużymy się jej zapisem w postaci kanonicznej (14):

$$\hat{Y} = 1,09 - 0,046w_1^2 - 0,033w_2^2 - 0,029w_3^2$$

Tab. 4. Aktywność fitazy płynów pochodowlanych w drugim doświadczeniu
Phytase activity in culture fluid in the second experiment

Nr kombinacji	Oznaczenia kombinacji			Zmienne			Aktywność fitazy (y) U/ml
				A skrobia %	B NaNO ₃ g/l	C K ₂ HPO ₄ mg P _i /100 ml	
1	A ₁	B ₋₁	C ₁	9,90	10,00	0,70	1,00
2	A ₁	B ₁	C ₁	9,00	18,00	0,70	1,10
3	A ₋₁	B ₋₁	C ₁	7,00	10,00	0,70	0,93
4	A ₋₁	B ₁	C ₁	7,00	18,00	0,70	1,00
5	A ₁	B ₋₁	C ₋₁	9,90	10,00	0,30	1,06
6	A ₁	B ₁	C ₋₁	9,00	18,00	0,30	1,13
7	A ₋₁	B ₋₁	C ₋₁	7,00	10,00	0,30	0,91
8	A ₋₁	B ₁	C ₋₁	7,00	18,00	0,30	0,57
9	A ₊ α	B ₀	C ₀	9,68	14,00	0,50	0,81
10	A ₋ α	B ₀	C ₀	6,32	14,00	0,50	0,93
11	A ₀	B ₊ α	C ₀	8,00	20,73	0,50	0,97
12	A ₀	B ₋ α	C ₀	8,00	7,27	0,50	0,93
13	A ₀	B ₀	C ₊ α	8,00	14,00	0,84	1,10
14	A ₀	B ₀	C ₋ α	8,00	14,00	0,16	1,03
15a	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	0,96
15b	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	0,98
15c	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	1,13
15d	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	1,13
15e	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	1,21
15f	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	1,10
15g	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	0,97
15h	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	0,90
15i	A ₀	B ₀	C ₀	8,00	14,00	0,50	1,10

Z postaci tej wynika, że punkt $w_1=0$, $w_2=0$, $w_3=0$ jest punktem, w którym funkcja osiąga maksimum. Przy czym w_1 , w_2 , w_3 , nowe współrzędne, są powiązane z x_1 , x_2 , x_3 następującymi zależnościami:

$$w_1 = -0,840x_1 + 0,277x_2 + 0,469x_3 + 0,353$$

$$w_2 = 0,466x_1 + 0,145x_2 + 0,883x_3 + 0,815$$

$$w_3 = 0,308x_1 - 0,951x_2 + 0,001x_3 - 0,523.$$

Z zależności tych wyliczamy kombinację ekstremalną:

$$x_{1e} = 0,096; x_{2e} = -0,526; x_{3e} = 0,885,$$

co odpowiada następującym wartościom doświadczalnym

$$A \approx 8; B \approx 12; C \approx 0,3.$$

Zatem za pomocą stosowanej metody stwierdzamy, że przy warunkach określonych w doświadczeniu największą aktywność fitazy w płynie pochodowlanym można uzyskać dla kombinacji: $A=8$, $B=12$, $C=0,3$, i że wynosi ona ok. 1,1 U/ml.

PIŚMIENNICTWO

1. Box G. E. P., Hunter J. S.: Multifactor Experimental Designs for Exploring Surfaces. Annales of Mathematical 28, 1, 195, 1957.
2. Chmielnicka-Gumuła A.: Przegląd metodologii powierzchni reakcji. VII Colloquium Metodologiczne z Agrobiometrii. PAN, Warszawa 1977.

3. Fiske C. H., Subbarow Y.: The Colorimetric Determination of Phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375, 1925.
4. Greaves M. P., Webley D. M.: A Study of the Breakdown of Organic Phosphates by Microorganisms from the Root Region of Certain Pasture Grasses. J. Appl. Bact. 28, 3, 454, 1965.
5. Greaves M. P., Webley D. M., Anderson G.: A Rapid Method for Determining Phytase Activity of Soil Microorganisms. Nature 200, 1231, 1963.
6. Majchrzak R., Nawrocki Z., Czarnocka-Roczniakowa B.: Optymalny skład pożywki produkcyjnej dla bakterii propionowych syntetyzujących korynoidy. Acta Microbiol. Pol. 15, 173, 1966.
7. Nalimow W. W., Czernowa N. A.: Statystyczne metody planowania doświadczeń ekstremalnych. WNT, Warszawa 1967.
8. Nelson T. S., McGillivray J. J., Shieh T. R., Wodziński R. J., Ware I. H.: Effect of Phytate on the Calcium Requirement of Chicks. Poultry Sci. 47, 6, 1985, 1968.
9. Nelson T. S., Shieh T. R., Wodziński R. J., Ware I. H.: The Availability of Phytase Phosphorus in Soybean Meal before and after Treatment with a Mold Phytase. Poultry Sci. 47, 6, 1842, 1968.
10. Nelson T. S., Shieh T. R., Wodziński R. J., Ware I. H.: Effect of Supplemental Phytase on the Utilization of Phytase Phosphorus by Chicks. J. Nutrition 101, 1289, 1971.
11. Pietraszewski A., Wagner W.: Ekonometria rolnicza. Poznań 1975.
12. Shieh T. R., Ware I. H.: Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase. Appl. Microbiol. 16, 1348, 1968.
13. Skowroński T.: Phytase Activity in *Aspergillus niger*. Polish J. of Soil. Sci. 9, 2, 1976.
14. Zieliński R.: Wybrane zagadnienia optymalizacji statystycznej. PWN, Warszawa 1974.

РЕЗЮМЕ

В опытах, проведенных методом площади реакции, исследовано влияние концентрации крахмала, азота, неорганического фосфора, а также влияния питательной среды на продукцию внеклеточной фитазы, изготавливаемой *Aspergillus niger*.

Из анализа проведенных опытов следует, что самую большую активность фитазы в послеселекционных жидкостях можно достигнуть на питательной среде, содержащей в 1 дсм³ H₂O дест. крахмала — 80г, глюкоза — 30г., MgSO₄ · 7H₂O — 0,5г; KCl — 0,5г; FeSO₄ — 0,1г; NaNO₃ — 12г; K₂HPO₄ — 17г; pH 5.

SUMMARY

The aim of experiments carried out by means of the method of surface reaction was to investigate the influence of concentrations of starch, nitrogen, non-organic phosphorus and pH of the medium on the production of extracellular phytase by *Aspergillus niger*.

The analysis of experiments show that the greatest phytase activity in culture fluids can be obtained on the medium containing 80 g of starch; 30 g of glucose; 0.5 g of MgSO₄ · 7 H₂O; 0.5 g of KCl; 0.1 g of FeSO₄; 12 g of NaNO₃, 17 mg of K₂HPO₄; pH 5 in 1 dcm³ of distilled H₂O.