



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

***Aspergillus* törzsek savas proteáz termelésének vizsgálata
agro-ipari növényi maradványokon**

Szakdolgozat

Gingász Anita

Biomérnök BSc.

Budapest

2023

Az utóbbi években több kutatás is az alternatív szubsztrátumok körének megismerését, ezen belül is az agro-ipari maradványok hasznosítási lehetőségeit célozza. A növényi maradványok egy részét a gazdaságba visszaforgatják takarmányként, komposztként. Az agro-ipari maradványok ezen túl biofeldolgozási folyamatokba is integrálhatók, így akár iparilag hasznos biokatalizátorok előállításának alapanyagiként is hasznosíthatók.

A szakdolgozati kutatómunkám néhány *Aspergillus* törzs proteolitikus aktivitásának vizsgálatára irányult cellulózban gazdag agro-ipari növényi maradványokon, szubmerz (SmF) és csökkentett nedvességtartalmú (SSF) rendszerben indított enzimfermentáció során.

A proteáz aktivitás kimutatására egy igen gyors és egyszerű módszert, az 1 (m/v) %-ban kazeint tartalmazó agarlemezekon történő screenelési technikát alkalmaztam. Az indikátoroldat színváltozása rámutatott arra, hogy a termelő törzseket savas, neutrális, esetleg alkalikus proteáz termelése jellemez. BCG indikátor erős sárga színe a savas proteáz termelését mutatta ki, így a feltisztulási zóna és a színintenzitás alapján rangsoroltam a törzseket. A törzsek között az *Aspergillus niger* F.00632 törzs bizonyult jobb enzimtermelőnek 28 ± 2 °C-on.

A szelektált termelő törzs savas proteáz termelését, a termelés hatékonyságát 5 különböző összetételű fermentációs tápközegekben és két különböző technika: az szubmerz, rázatott és a csökkentett nedvességtartalmú enzimfermentáció alkalmazásával követtem nyomon. Szénforrásként cellulózban gazdag növényi maradványokat: búzakorpát, búzaszalmát, kukoricacsutkát, sörtörkölyt és gyümölcs/zöldség rostállományt alkalmaztam. A törzs felszaporítása burgonyakivonat-dextróz tápvelesben 28 ± 2 °C, 180 rpm rázatási sebességen, 48 alatt történt. Az enzimfermentációt minden esetben 5 (v/v) %-os szubmerz tenyészet beoltásával indítottam el lamináris fülke alatt. Az enzimfermentáció 28 ± 2 °C-on 168 órán át történt. A szubmerz eljárásnál a fermentációs közegeket 180 rpm sebességen rázattam. A mintavételezés a 48., a 72., a 96. és a 168. órában történt. A szubmerz rendszerekből ekkor 5 ml mintát vettem és azokat a kémhatás és az enzimaktivitás mérése előtt átszűrtem és centrifugáltam. A csökkentett nedvességtartalmú eljárásnál az adott mintavételi naphoz tartozó lombik tartalmát 40 ml desztillált vízben 1 órán át 200 rpm sebességen rázattam, ezáltal segítettem elő a termelt enzimek rostokról történő lemosását. A proteáz aktivitásmérés kalibrációjához 1,1 mM L-tirozin törzsoldatot használtam. A kalibrációs oldatok és a minták abszorbanciáját spektrofotometriás úton, 660 nm-en mértem. Mind a két fermentációs technika esetén nagyobb aktivitás értékeket az A4 tápoldatban tapasztaltam, amelynek összetétele (g/250 ml) szerint 5 g búzakorpát, 5 g élesztő kivonatot, 5 g peptont és 5 g kazeint tartalmazott. A szubmerz, rázatott enzimfermentáció eredményeként az aktivitás a 168. órában érte el a

maximumot. A csökkentett nedvességtartalmú rendszerek (1:5 nedvesítési arány) esetén a 96. órában tetőzött az aktivitás.

A kísérletek ezen szakaszában a savas proteáz aktivitás optimum tartományát is vizsgáltam. Az enzimaktivitás mérés pH 3 és 30 °C-on történt, az optimálás során pedig megállapítottam, hogy a pH 2,5-3,5 és 30-35 °C tartományban mutat nagyobb aktivitást a szelektált törzs által termelt savas proteáz.

Az alternatív szénforrások vizsgálata során megállapítottam, hogy a szelektált törzs az 5 (m/v) %-ban gyümölcs/zöldség rostállományt tartalmazó A4 tápoldatban nagyobb savas proteáz termelést mutat. Ez meghaladja az alapfermentációnál használt búzakorpa szubsztrátum jelenlétében elért aktivitás értéket. A savas proteáz aktivitás ekkor is az enzimfermentáció 168. órájában tetőzött.

A továbbiakban a szelektált törzs savas proteáz enzim termelésének optimálását végeztem el központi elrendezésű kísérlettervezési módszer és válaszfelület analízis alkalmazásával. Két független faktorként a gyümölcs/zöldség rostállomány, valamint a kazein (induktor) hatását és kölcsönhatását tanulmányoztam, és statisztikai úton értékeltem, hogy azok koncentrációinak változtatása miként befolyásolják az enzimaktivitás alakulását. A faktorkombinációk hatásait tekintve, a gyümölcs/zöldség rostállomány 5-7,5 (m/v) %-ban, a kazein 1 (m/v) %-ban történő alkalmazása kedvez az enzimtermelésnek 95 %-os szignifikancia szinten. Ekkor az enzimfermentáció 96. órájában a savas proteáz aktivitás elérte azt az aktivitást, amit korábban csak az enzimfermentáció 168. órájában sikerült.

Az elért eredmények ígéretesek a növényi maradványok biofeldolgozási lehetőségeinek fejlesztésére, ami a még értékes megújuló anyagok körforgásban tartását segíti elő.