

DANUTA WITKOWSKA, ANITA RYWIŃSKA, MICHAŁ PIEGZA

WYTWARZANIE FITAZ, CELULAZ I KSYLANAZ PRZEZ WYBRANE SZCZEPY GRZYBÓW STRZĘPKOWYCH

Streszczenie

W pracy przebadano dwanaście szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, *Trichoderma* i *Rhizopus* pod względem zdolności do biosyntezy fitaz oraz enzymów towarzyszących tj. celulaz i ksylanaz, w hodowlach wstrząsanych oraz SSF, w obecności zmielonej fasoli, skrobi kukurydzianej, rzepaku oraz mąki sojowej jako źródeł węgla.

Jedenaście szczepów było zdolnych do biosyntezy fitaz, wykazano jednak znaczne zróżnicowanie poziomu aktywności w zależności od źródła węgla w pożywce. Najefektywniejszym źródłem węgla do syntezy tych enzymów była zmielona fasola oraz skrobia kukurydziana. Największymi uzdolnieniami do biosyntezy fitaz charakteryzowały się szczepy *Aspergillus niger* 551 (34,56 nKat g⁻¹) oraz *Aspergillus cervinus* (31,85 nKat g⁻¹).

W hodowlach prowadzonych w systemie SSF na zmielonej fasoli z udziałem obu szczepów uzyskano zwiększenie aktywności właściwej fitaz w porównaniu z hodowlą wglębną.

Enzymy towarzyszące, tj. celulazy i ksylanazy, w tych warunkach hodowlanych wytwarzane były na niskim poziomie.

Słowa kluczowe: grzyby strzępkowe, fitazy, celulazy, ksylanazy, źródło węgla

Wstęp

W ostatnich latach, również w związku z pojawieniem się choroby Creutzfeldta-Jakoba, coraz częściej stosuje się pasze pozbawione białka zwierzęcego [20]. Tym samym znacznie wzrosło zainteresowanie drobnoustrojami, nie tylko jako producentami cennego białka mikrobiologicznego (SCP), ale również enzymów. Preparaty enzymatyczne różnego pochodzenia są szeroko stosowane w żywieniu zwierząt, szczególnie drobiu i trzody chlewnej, w celu pełniejszego wykorzystania składników pochodzenia roślinnego [3], w tym kwasu fitynowego i jego soli oraz polisacharydów nieskrobiowych. Szczególnie mikroorganizmy mają ogromny potencjał produkcyjny,

Prof. dr hab. D. Witkowska, dr inż. A. Rywińska, dr inż. M. Piegza, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław

a modyfikacja warunków hodowlanych pozwala na sterowanie produktami ich biosyntezy. Płyn pochowolany może zawierać wiele enzymów takich, jak: fitazy, celulazy hemicelulazy, pektynazy, amylazy, inne białka oraz kwasy organiczne [2]. Taki produkt fermentacji będzie stanowić cenny suplement w żywieniu zwierząt, a kompleksowe działanie jego składników może znacznie zwiększać strawność i biodostępność roślinnych składników pasz [12]. Prace opisujące wielokierunkowe działania różnych zestawów enzymatycznych, w tym mikrobiologicznych, zawierających fitazy, ksylanazy, celulazy, kwaśną fosfatazę, pektynazy, α -amylazy, są wciąż aktualne. Dlatego uzasadnione jest rozszerzenie obszaru badań, w tym o poszukiwanie nowych szczepów i warunków hodowlanych, dotyczących biosyntezy fitaz, celulaz i ksylanaz.

Celem przedstawionej pracy była ocena zdolności grzybów strzępkowych do biosyntezy fitaz oraz ksylanaz i celulaz, w środowisku zawierającym zmieloną fasolę, skrobię kukurydzianą, rzepak oraz mąkę sojową jako źródło węgla.

Materiały i metody badań

Mikroorganizmy

Przedmiotem badań było dwanaście szczepów grzybów strzępkowych: *Aspergillus* sp. WIT., *Aspergillus niger* KB, *Aspergillus cervinus*, *Aspergillus niger* 551, *Aspergillus niger* 270, *Aspergillus niger* XP, *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus niger* SBP, *Trichoderma koningi*, *Rhizopus nigricans*, *Trichoderma harzianum* T-33, które przechowywano na skosach PDA w temp. 4°C i przeszczepiano raz w roku. Szczepy pochodziły z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, jedynie *A. niger* XP pochodzi z Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu.

Podłoża

Zastosowano podłoże mineralne Saundersa (S) [21]. Jako źródło węgla stosowano: zmieloną fasolę, zmielone ziarno rzepaku, skrobię kukurydzianą oraz mąkę sojową. W hodowlach wstrząsanych podłoże zawierało 2% źródła węgla. Hodowle „solid state” zawierały 10 g odpowiedniego substratu, które sterylizowano dwukrotnie z dodatkiem 10 ml wody destylowanej, w temp. 121°C przez 20 min.

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle wstrząsane prowadzono w 250 ml kolbach Erlenmayera zawierających 50 ml podłoża S na wstrząsarce rotacyjnej typu Elpan przy 170 rpm, przez 8 dni, w temp. 30°C. Próby do analiz (~5 ml) wirowano przez 10 min przy 6434 g w wirówce typu MPW-30. Supernatant po przesączeniu służył do dalszych analiz.

Hodowle typu „solid state fermentation” (SSF) prowadzono również w kolbach Erlenmayera (10 g źródła węgla i 10 ml podłoża S), przez 10 dni, w temp. 24°C, okresowo wstrząsając.

Po 3, 5, 8, 10 dobach zawartość kolb z przerosniętym grzybnią podłożem ekstrahowano 0,05 M buforem octanowym (50 ml) przez wstrząsanie przy 160 rpm w ciągu 60 min. Tak otrzymaną zawiesinę poddawano wirowaniu w wirówce MPW-52 (10000 g przez 10 min), a następnie sączono. Uzyskany w ten sposób płyn pohodowlany poddawano dalszej analizie.

Inokulum każdorazowo stanowiła zawiesina zarodników (1 ml) uzyskana poprzez zmycie ze skosu 1% roztworem Tween 80. Gęstość zawiesiny wynosiła $2,5 \times 10^8$ zarodników w 1 ml.

Metody analityczne

Aktywność fitaz oznaczano wobec 1% roztworu soli sodowej kwasu fitynowego (0,1 g soli sodowej kwasu fitynowego + 5 ml wody destylowanej + 5 ml 0,05 M buforu octanowego o pH 5,0). Reakcję enzymatyczną prowadzono w enzymatycznie czystych próbkach przez 30 min w temp. 37°C. Mieszanina reakcyjna zawierała: w próbach właściwych 600 µl substratu, 200 µl roztworu badanego enzymu oraz 200 µl 25 mmol CaCl₂. Reakcję przerywano przez dodanie 1ml 5% roztworu kwasu trójchlo-rooctowego (TCA). W próbach kontrolnych roztwór enzymu wprowadzano po dodaniu TCA. Po zakończeniu reakcji enzymatycznej w próbach oznaczano zawartość uwolnionych fosforanów metodą Fiske-Subbarowa [7] wobec standardu zawierającego 80 µg ml⁻¹ fosforanu. Aktywności fitaz wyrażano jako ilość nmoli uwolnionych fosforanów w czasie 1 s w przeliczeniu na 1 g źródła węgla (nKat·g⁻¹) w podłożu oraz jako aktywność właściwą, w przeliczeniu na mg białek (nKat·mg⁻¹).

Aktywność celulaz (nKat·ml⁻¹) oznaczano wobec substratu – 1% roztworu karboksymetylocelulozy (30 min, temp. 50°C, pH 4,8) i wyrażano ilością cukrów redukujących (w przeliczeniu na glukozę), uwalnianych z substratu w ciągu 1 s przez 1 ml płynu pohodowlanego.

Aktywność ksylanaz (nKat·ml⁻¹) oznaczano wobec substratu – 1% roztworu ksy-lanu brzożowego (30 min, temp. 50°C, pH 4,8) i wyrażano ilością cukrów redukujących (w przeliczeniu na ksylozę), uwalnianych z substratu w ciągu 1 s przez 1 ml płynu pohodowlanego, nKat·ml⁻¹.

Zawartość cukrów redukujących oznaczano metodą z kwasem 3,5-dinitro-salicylowym (DNS) wg Millera [16].

Zawartość białka oznaczano kolorymetrycznie metodą Lowry'ego wobec krzywej wzorcowej, sporządzonej z krystalicznej albuminy z surowicy wołowej [14].

Wyniki i dyskusja

W pracy podjęto próbę oceny zdolności 12 szczepów grzybów strzępkowych (w tym 9 z rodzaju *Aspergillus*, 2 z rodzaju *Trichoderma* i 1 z rodzaju *Rhizopus*) do biosyntezy fitaz, w zależności od rodzaju źródła węgla w podłożu i sposobu hodowli (SSF oraz hodowla wstrząsana). Najefektywniejszym źródłem węgla, w kierunku syntezy fitaz, była zmielona fasola. Najwyższą aktywność, z zastosowaniem omawianego źródła węgla, uzyskano w przypadku dwóch, spośród dwunastu badanych szczepów tj. *Aspergillus niger* 551 oraz *Aspergillus cervinus*, odpowiednio 34,56 i 31,85 nKat·g⁻¹ (tab. 1). Według Friasa i wsp. [8] nasiona roślin strączkowych charakteryzują się dużą zawartością fitaz endogennych, stąd niektóre czynniki zawarte w tych nasionach mogą sprzyjać indukcji biosyntezy fitaz mikrobiologicznych.

W pracy wykazano, że te same szczepy wyróżniały się wysoką aktywnością fitaz, w przeliczeniu na 1 g substratu, również w podłożu ze skrobią kukurydzianą. Natomiast najwyższą aktywność właściwą w tym podłożu, 0,567 nKat·mg⁻¹, uzyskał szczep *A. niger* KB (tab.1). Dodatek skrobi w ilości 1% stosowali w swoich badaniach Purva i Banerjee [19]. Wyizolowany z odpadów rolniczych szczep *Aspergillus niger* var teigham w warunkach, które nie były optymalizowane, produkował fitazy o aktywności wynoszącej aż 83,33 nKat·ml⁻¹. Autorzy porównywali w swoich badaniach produkcję tych enzymów w podłożach zawierających cukry proste, glicerol oraz skrobię. Zdecydowanie najwyższą aktywność uzyskali w podłożu ze skrobią oraz skrobią łącznie z glukozą, ok. 110 nKat·ml⁻¹, podczas gdy w obecności cukrów prostych aktywność nie przekraczała 20 nKat·ml⁻¹, co świadczy o mocnej represji syntezy tych enzymów w obecności cukrów prostych. Skrobia jest często stosowanym źródłem węgla w procesie biosyntezy fitaz [9, 18, 19], najczęściej jednak w wyższym stężeniu od 4 do 8% [1, 4, 5, 10]. W badaniach Casey i Walsh [5], w podłożu zawierającym 8% skrobi szczep *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 uzyskał aktywność właściwą 1,08 nKat·mg⁻¹. Natomiast w przypadku *Aspergillus niger* ATCC9142 autorzy otrzymali znacznie wyższą aktywność, na poziomie 3,6 nKat·mg⁻¹ Casey i Walsh [4].

W przypadku hodowli z dodatkiem mąki sojowej, aktywność fitaz większości badanych szczepów była znacznie niższa, wyróżniały się jedynie szczepy *A. sp.* 2 oraz *T. koningi* (tab. 1). Prowadzi to do wniosku, że mąka sojowa nie jest dobrym źródłem węgla dla badanych szczepów w procesie syntezy omawianych enzymów w hodowlach wglębnych. Substrat ten był jednak z powodzeniem wykorzystywany przez innych badaczy w hodowlach prowadzonych w systemie „solid state fermentation” [2, 6].

W niniejszej pracy, w hodowli wstrząsanej, w podłożu zawierającym w swoim składzie zmielone ziarno rzepaku, jako źródło węgla, najefektywniejszymi producentami fitaz okazały się szczepy *A. niger* 551 (11,04 nKat·g⁻¹) oraz *A. sp* WIT (10,21 nKat·g⁻¹) (tab. 1). Otrzymane wyniki można porównać jedynie z rezultatami uzyskanymi przez Bogar i wsp. [2], którzy jako źródło węgla w systemie SSF wykorzystali

mąkę z rzepaku odmiany Canola, otrzymane przez nich aktywności wynosiły od 5,73 do 6,31 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

Tabela 1

Produkcja fitaz przez różne szczepy grzybów strzępkowych po 8 dobie hodowli wgłębnej, w zależności od źródła węgla w pożywce [$\text{nKat}\cdot\text{ml}^{-1}$].

Phytase production by different strains of filamentous fungi after 8 days of submerged fermentation depending on carbon source in medium [$\text{nKat}\cdot\text{ml}^{-1}$].

Szczep Strain	Fasola Bean		Skrobia kukurydziana Corn starch		Rzepak Rape		Mąka sojowa Soybean meal	
<i>A. sp</i> WIT	1,90	0,037	0,41	0,013	10,21	0,324	5,60	0,067
<i>A. niger</i> KB	0,631	0,037	1,70	0,567	0,88	0,025	1,11	0,020
<i>A. cervinus</i>	31,85	0,411	18,2	0,248	2,69	0,031	3,97	0,027
<i>A. niger</i> 551	34,56	0,576	24,30	0,476	11,04	0,356	0,93	0,011
<i>A. niger</i> 270	5,00	0,175	1,49	0,067	3,7	0,106	1,35	0,039
<i>A. niger</i> XP	3,92	0,140	6,49	0,360	2,24	0,046	1,40	0,019
<i>A. sp.</i> 1	1,12	0,039	4,87	0,101	6,8	0,162	0,86	0,009
<i>A. sp.</i> 2	0,88	0,022	2,50	0,050	0,82	0,026	10,06	0,149
<i>A. niger</i> SBP	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. koningi</i>	4,91	0,192	3,04	0,083	7,43	0,008	9,91	0,134
<i>T. harzianum</i>	0,86	0,032	0,88	0,019	4,47	0,175	1,79	0,02
<i>R. nigricans</i>	7,37	0,368	9,56	0,342	5,35	0,535	1,93	0,038

Ponieważ w niniejszej pracy zmielona fasola była najlepszym źródłem węgla, szczególnie dla dwóch szczepów wykazujących najwyższą aktywność, przeprowadzono 10-dniowe hodowle w systemie SSF na tym substracie, chociaż w dostępnej literaturze brak jest danych na temat stosowania w takim procesie zmielonej fasoli (tab. 2).

Otrzymane wyniki nie są tak wysokie, jak podają inni autorzy, w przypadku zastosowania substratów takich, jak: otręby pszenne, mąka sojowa, mąka kukurydziana, zmielony rzepak (Canola meal) czy zmielone orzechy w przeliczeniu na 1 g substratu [2, 6, 15], jednak w przypadku obu analizowanych szczepów, czyli zarówno *A. niger* 551, jak i *A. cervinus*, w procesie SSF uzyskano znacznie wyższe wartości aktywności właściwej, odpowiednio 1,012 oraz 0,535 $\text{nKat}\cdot\text{mg}^{-1}$ (tab. 2), w porównaniu ze standardową hodowlą wstrząsaną (tab. 1).

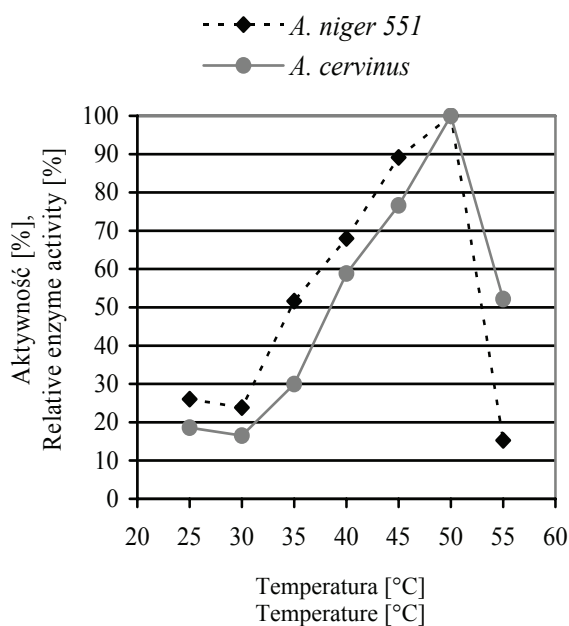
Na skalę przemysłową mikrobiologiczne fitazy produkowane są w hodowlach wgłębnych. Koszt produkcji tych enzymów jest nadal wysoki, co bardzo ogranicza możliwość ich stosowania w diecie zwierząt hodowlanych. Większość badań dotyczących produkcji fitaz w systemie SSF dotyczy doboru szczepu oraz warunków hodowlanych, takich jak: rodzaj substratu, wilgotność podłoża, temperatura, a nawet rodzaj

i wiek inokulum [2, 6, 11, 15]. Tymczasem system SSF może stać się obiecującą metodą w procesie wytwarzania – charakteryzującą się niskim kosztem przy wysokiej wydajności – enzymów czy też produktów wzbogacanych, takich jak biologiczne środki farmaceutyczne [17].

Tabela 2

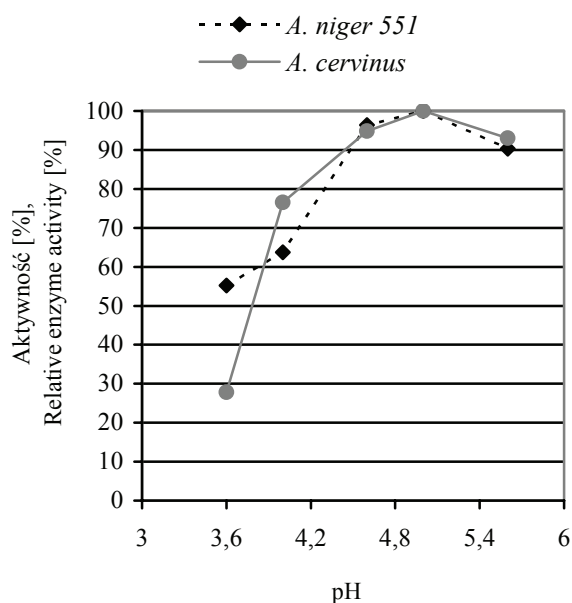
Produkcja fitaz przez szczep *A. cervinus* oraz *A. niger* 551 podczas hodowli „solid state” na fasoli.
Phytase production by *A. cervinus* and *A. niger* 551 strain during solid state fermentation on bean.

Szczep Strain	Aktywność fitaz / Phytase activity [nKat·ml ⁻¹]				
	Czas [doba] / Time [days]				
	3	5	8	10	
<i>A. cervinus</i>	4,5	6,07	8,52	10,02	0,535
<i>A. niger</i> 551	3,45	6,71	7,44	11,07	1,012

Rys. 1. Wpływ temperatury na aktywność fitaz szczepów *A. niger* 551 i *A. cervinus*.Fig. 1. Effect of temperature on the *A. niger* 551 and *A. cervinus* strains phytase activity.

Na przykładzie fitaz obu najefektywniejszych szczepów zbadano optymalne warunki działania tych enzymów. Oceniano wpływ temperatury w zakresie od 25 do 55°C (rys. 1) oraz pH w zakresie od 3,6 do 5,6 (rys. 2) na aktywność enzymatyczną. Fitazy syntetyzowane zarówno przez szczep *A. niger* 551, jak i *A. cervinus* wykazały najwyższą aktywność w temp. 50°C (rys. 1). Aktywność enzymatyczna szczepu *A. niger* 551

w temp. 45°C była niższa o około 10%, natomiast aktywność szczepu *A. cervinus* wynosiła w tych samych warunkach odpowiednio 76,6% maksymalnej aktywności. Podobnie Liu [13], jak i Shimizu [22] podają temp. 50°C jako optymalną dla fitaz produkowanych przez *A. ficuum* i *A. oryzae*.



Rys. 2. Wpływ pH na aktywność fitaz szczepów *A. niger 551* i *A. cervinus*.

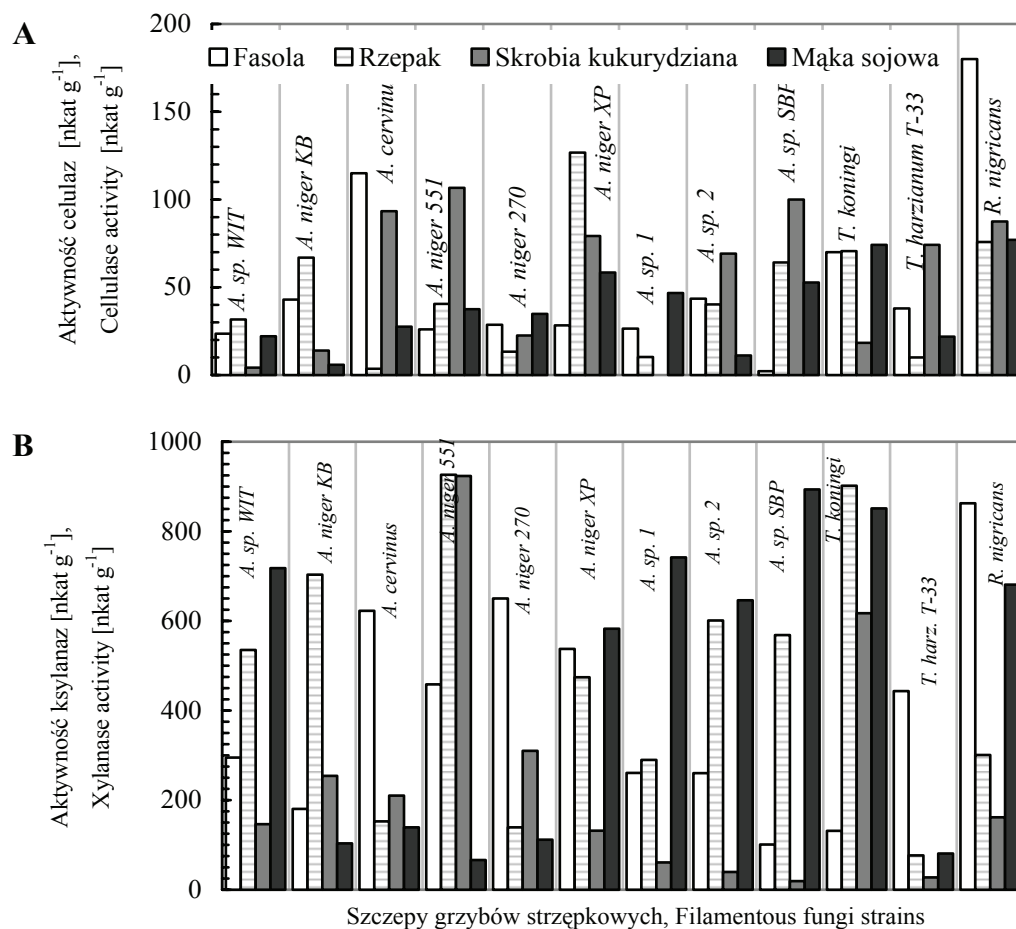
Fig. 2. Effect of pH on the *A. niger 551* and *A. cervinus* strains phytase activity.

W przypadku innych szczepów z rodzaju *Aspergillus* autorzy podają nieco wyższe wartości temperatury optymalnej, od 53 do nawet 70°C [13]. W niniejszej pracy wzrost temperatury powodował jednak znaczną redukcję aktywności, szczep *A. niger 551* w temp. 55°C zachował zaledwie 15,25%, a *A. cervinus* 52,15% maksymalnej aktywności.

Optymalne, do działania fitaz obu analizowanych szczepów, było pH równe 5,0 (rys. 2). Doświadczenia innych autorów wskazują, że fitazy produkowane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* wykazują maksymalną aktywność w przedziale pH od 4,0 do 5,5 [3, 6, 13, 15].

Enzymy są powszechnie stosowane w żywieniu zwierząt, szczególnie drobiu i trzody chlewnej, w celu lepszego wykorzystania składników roślinnych zawartych w paszach. Ksyłan, celuloza oraz β -glukan, określane jako polisacharydy nieskrobiowe (NSP), nie mogą być w pełni utylizowane przez monogastryczne zwierzęta. Dodatek preparatów enzymatycznych zawierających ksyłanazy, celulazy oraz β -glukanazy do paszy redukuje antyżywieniowy efekt NSP. Komercyjnie dostępne enzymy hydrolizu-

jące NSP są produkowane głównie metodą mikrobiologiczną przez szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz *Aspergillus*, a także bakterie z rodzaju *Bacillus* [12]. Najczęściej jednak płyn pochodzący zawiera mieszaninę enzymów hydrolitycznych. Jej właściwości biochemiczne są w dużym stopniu uzależnione od czasu oraz warunków hodowlanych, co jednocześnie może determinować określony jej skład.



Rys. 3. Produkcja celulaz (A) i ksylanaz (B) przez różne szczepy grzybów strzępkowych po 8. dobie hodowli węglanej w zależności od źródła węgla w pożywce.

Fig. 3. Cellulase (A) and xylanase (B) production by different strains of fungi after 8 day of submerged fermentation in dependence on carbon source in medium.

W celu szerszego rozpoznania zdolności enzymatycznej badanych szczepów, po 8. dobie hodowli wstrząsanej oznaczono aktywność enzymów towarzyszących tj. celulaz i ksylanaz, chociaż zastosowane źródła węgla w pożywce były dobre pod względem produkcji fitaz (rys. 3). Wykazano zróżnicowanie (5–180 nKat·g⁻¹) poziomu ak-

tywności celulaz w zależności od rodzaju źródła węgla w pożywce. I tak, np. szczepy *R. nigricans* i *A. cervinus* były najefektywniejsze w produkcji celulaz na podłożu ze zmieloną fasolą, a *A. niger* KB i *A. niger* XP na podłożu ze zmielonym rzepakiem. W innym przypadku (*A. niger* 551, *A. sp.* 2, *A. niger* SBP, czy *T. harzianum*) najbardziej sprzyjające było podłoże ze skrobią kukurydzianą (rys. 3A). W produkcji ksylanaz większość badanych szczepów preferowała mąkę sojową lub rzepak jako źródło węgla (rys. 3B). Szczep *A. niger* 551 ($926,3 \text{ nKat}\cdot\text{ml}^{-1}$) wyróżniał się, obok *T. koningi* i *A. sp.* SBP jako producent ksylanaz (rys. 3B).

W obszernej literaturze dotyczącej biosyntezy ksylanaz i celulaz przez grzyby strzępkowe wartości aktywności są bardzo zróżnicowane, a najczęściej stosowane źródła węgla to odpady ligninocelulozowe lub celulozowe. W przedstawionej pracy oznaczenia aktywności celulaz i ksylanaz stanowiły element uzupełniający w produkcji fitaz.

Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że z udziałem obu wyselekcjonowanych szczepów (*A. niger* 551, *A. cervinus*), dopracowaniu warunków hodowlanych i zastosowaniu optymalnych warunków reakcji enzymatycznej, będzie można uzyskać wysokie wartości aktywności fitaz w systemie SSF, co pozwoli na opracowanie taniej technologii produkcji tych enzymów.

Wnioski

1. Najefektywniejszym źródłem węgla w kierunku syntezy fitaz była zmielona fasola - najwyższą aktywność uzyskano w przypadku dwóch, spośród dwunastu badanych szczepów, tj. *Aspergillus niger* 551 oraz *Aspergillus cervinus*, odpowiednio $34,56 \text{ nKat}\cdot\text{g}^{-1}$ i $31,85 \text{ nKat}\cdot\text{g}^{-1}$.
2. W procesie SSF uzyskano znaczne zwiększenie wartości aktywności właściwej fitaz, odpowiednio $1,012 \text{ nKat}\cdot\text{mg}^{-1}$ - *A. niger* 551 oraz $0,535 \text{ nKat}\cdot\text{mg}^{-1}$ - *A. cervinus*, w porównaniu ze standardową hodowlą wstrząsaną.
3. Poziom aktywności enzymów towarzyszących, takich jak celulazy, był bardzo zróżnicowany ($5 - 180 \text{ nKat}\cdot\text{g}^{-1}$) w zależności od rodzaju szczepu i źródła węgla w pożywce, natomiast w produkcji ksylanaz większość badanych szczepów preferowała mąkę sojową lub rzepak jako źródło węgla.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

Literatura

- [1] Ahmad T., Rasool Sh., Sarwar M., Hag A., Hasan Z.: Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Animal Feed Sci. Technol.*, 2000, **83**, 103-114.

- [2] Bogar B., Szakacs G., Linden J.C., Pandey A., Tengerdy R.P.: Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **30**, 183-189.
- [3] Brugger R., Simoes Nunes C., Hug D., Vogel K., Guggenbuhl P., Mascarello F., Augem S., Wyss M., van Loom A. P. G. M., Pasamontes L.: Characteristics of fungal phytases from *Aspergillus fumigatus* and *Sartorya fumigata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **63**, 383-389.
- [4] Casey A., Walsh G.: Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technology*, 2003, **83**, 183-188.
- [5] Casey A., Walsh G.: Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.*, 2004, **110**, 313-322.
- [6] Chantasartrasamee K., Na Ayuthaya D.I., Intarareugsorn S., Dharmstithi S.: Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Proc. Biochem.*, 2005, **40**, 2285-2289.
- [7] Fiske C.H., Subbarow Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 1925, **66**, 375.
- [8] Frias J., Doblado R., Antezana Jaime R.: Concepción Vidal-Valverde Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds. *Food Chemistry*, 2003, **81**, 233-239.
- [9] Gargova S., Roshkova Z., Vancheva G.: Screening of fungi for phytase production. *Biotech. Lett.*, 1997, **11**, 221-224.
- [10] Gargova S., Sariyska M.: Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **32**, 231-235.
- [11] Kim D-S., Godber S., Kim H-R.: Culture conditions for a new phytase-producing fungus. *Biotechnology Letters*, 1999, **21**, 1077-1081.
- [12] König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K.: Determination of xylanase, β -glucanase and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 80-87.
- [13] Liu B.L., Jong C.H., Tzeng Y.M.: Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, vol. **25**, 6, 517-521.
- [14] Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- [15] Mandviwala T.N., Khire J.M.: Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **24**, 237-243.
- [16] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426-428.
- [17] Pandey A., Szakacs G., Soccol C.R., Rodriguez-Leon J.A., Soccol V.T.: Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 2001, **77**, 203-214.
- [18] Papagianni M., Nokes S.E., Filer K.: Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 1999, **35**, 397-402.
- [19] Purva V., Banerjee U.C.: Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs. *Proc. Biochem.*, 2002, **38**, 211-217.
- [20] Rutkowski A., Frączak M., Wiąz M.: Zastosowanie preparatu enzymatycznego Avizyme 1500 w dietach kukurydziano-sojowych i kukurydziano-rzepakowych pozbawionych białka zwierzęcego w żywieniu kurcząt rzeźnych. *Annals of Warsaw, Agricultural University, Animal Science*, 2001, 260-266.
- [21] Saunders P.R. Siu R.G.H. Genett R.N., A.: cellulolytic enzyme preparation from *Myrothecium verucaria*. *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 697-708.
- [22] Shimizu M.: Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, **57**, 1364-1365.

**PRODUCTION OF PHYTASES, CELLULASES AND XYLANASES BY SELECTED
FILAMENTOUS FUNGI**

S u m m a r y

Capability of twelve moulds strain represented three different species: *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Rhizopus* to biosynthesis of phytase and cellulase and xylanase as society enzymes in shaking cultures and SSF in present of milled been, corn starch, rape-seed and soy-flour, as a carbon source.

Eleven strains was able to phytase biosynthesis, by there was a very intensive differences in enzyme activity, common with carbon source in medium. Milled been was the most effective to produce this enzymes, but also corn starch. The highest activity we observed for *Aspergillus niger* 551 ($34,56 \text{ nKat}\cdot\text{g}^{-1}$) and *Aspergillus cervinus* ($31,85 \text{ nKat}\cdot\text{g}^{-1}$). In SSF cultures on milled been the biosynthesis of phytase was much more effective that previously culture.

Society enzymes, such as cellulase and xylanase in proposal media were biosynthesing on very low level.

Key words: filamentous fungi, phytase, cellulase, xylanase, carbon source ☒