

Elżbieta Gąsiorek, Ewa Walaszczyk, Waldemar Podgórski

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

e-mail: elzbieta.gasiorek@ue.wroc.pl

**MAKUCH SŁONECZNIKOWY
JAKO SUBSTRAT DO RÓWNOCZESNEJ SYNTEZY
KWASU SZCZAWIOWEGO ORAZ ENZYMÓW
CELULOLITYCZNYCH I KSYLANOLITYCZNYCH
PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER***

Streszczenie: Celem pracy była ocena możliwości stosowania makuchu słonecznikowego do syntezy kwasu szczawiowego oraz enzymów celulolitycznych i ksydanolitycznych przez grzyby strzępkowe *Aspergillus niger* w hodowlach w podłożu stałym. W badaniach zastosowano 5 szczepów *A.niger*: C12, S, X, W78B i W78C. Stwierdzono, że wszystkie wymienione szczepy dokonywały syntezy kwasu szczawiowego i, co bardzo korzystne, był to jedyny tworzący się kwas organiczny. Najwyższe zdolności kwasotwórcze wykazał szczep *A. niger* C-12, z udziałem którego uzyskano 98 g kwasu szczawiowego na kilogram suchej masy podłoża. Dodanie metanolu do podłoża nie zwiększało syntezy kwasu szczawiowego. Wszystkie szczepy wykazywały aktywność celulolityczną oraz ksydanolityczną, przy czym najlepszym producentem enzymów okazał się *A. niger* S, dla którego aktywność celulaz wyniosła 14,35 U g⁻¹ s.m., a aktywność ksydanaz 190 U g⁻¹ s.m.

Słowa kluczowe: makuch słonecznikowy, hodowla w podłożu stałym, kwas szczawiowy, celulazy, ksydanazy.

1. Wstęp

Słonecznik (*Helianthus annuus*) jest rośliną oleistą, uprawianą głównie w celu pozyskania oleju. Nasiona słonecznika zawierają około 50% tego składnika, z czego 30% stanowi kwas linolowy [Sharma i in. 2009]. Olej słonecznikowy stosuje się do bezpośredniego spożycia; może też stanowić surowiec do produkcji margaryny, lecytyny lub emulgatorów. W ostatnich latach wzrasta też zainteresowanie olejem słonecznikowym stosowanym do celów niespożywczych, tj. jako paliwo na bazie oleju roślinnego lub surowiec do otrzymywania biodiesla. Badania nad poprawą wydajności procesu transestryfikacji oleju słonecznikowego są nadal prowadzone, jednak już z dotychczas uzyskanych wyników można wnioskować o przydatności

paliwa słonecznikowego jako substytutu paliwa do silników o zapłonie samoczynnym [Rashid i in. 2008].

O ile liczba upraw słonecznika na cele spożywcze jest względnie stabilna, o tyle liczba upraw na cele niespożywcze będzie wzrastała. Wiąże się to z tendencjami do zwiększania udziału biopaliw w ogólnej ilości paliw silnikowych [European Biomass Statistics 2007]. Konsekwencją wzrostu produkcji oleju słonecznikowego na cele energetyczne będzie zwiększanie ilości produktu ubocznego powstającego w procesie jego wytlaczania, tzn. makuchu. Makuch (wytłoki, wytłoczyny) słonecznikowy jest pozostałością mechanicznego wytłaczania oleju z nasion słonecznika. Przewiduje się, że zużycie oleju słonecznikowego do produkcji biodiesla wzrośnie z 59 do 81 tys. ton, co wpłynie na wzrost ilości makuchu słonecznikowego do poziomu około 200 tys. ton [Raß i in. 2008].

Makuch ze względu na wysoką zawartość białka (około 28%) i tłuszczu (około 15%) oraz dobrze zbilansowany skład aminokwasowy jest stosowany jako suplement paszowy w hodowli zwierząt gospodarskich [Antoszkiewicz 2001]. Udział ten musi być jednak limitowany do około 15% w pełnoporcjowej paszy dla tuczników ze względu na wysoką zawartość włókna oraz niską zawartość treoniny i lizyny [Konarkowski 2007]. Ze względu na wartość opałową, równą około 19 MJ kg^{-1} , makuch słonecznikowy jest też potencjalnym źródłem energii [Raport... 2006]. W celu zwiększenia wartości energetycznej może on być współspalany z produktami o wyższej wartości opałowej lub poddawany procesowi pirolizy w celu otrzymania oleju pirolitycznego, którego wartość opałowa wynosi $33,7 \text{ MJ kg}^{-1}$ [Yorgun i in. 2001].

Mimo tak szerokiego zastosowania makuchu słonecznikowego, należy odpowiednio wcześniej znaleźć alternatywne metody jego zagospodarowania, aby w przyszłości uniknąć problemów z jego nadprodukcją oraz aby obniżyć koszty wytwarzania biodiesla.

Nowym kierunkiem zagospodarowania makuchu słonecznikowego może być użycie go jako źródła węgla i energii w procesach biotechnologicznych. Są doniesienia na temat wykorzystania makuchu słonecznikowego do produkcji α -amylazy z udziałem *Bacillus licheniformis* [Haq i in. 2003], cefamycyny C z udziałem *Streptomyces clavuligerus* [Kota, Sridhar 1999] oraz kwasu klawulanowego syntezowanego przez *S. clavuligerus* [Sircar i in. 1998]. Obecność makuchu słonecznikowego w podłożu hodowlanym ze słomy ryżowej zwiększa też produkcję grzybów kapeluszowych [Shashirekha i in. 2002].

Makuch słonecznikowy jest surowcem lignocelulozowym zawierającym składniki nierozpuszczalne w wodzie, dlatego właściwą metodą stosowaną do jego bio-konwersji jest metoda hodowli w podłożu stałym (*solid state fermentation*), będąca specyficzną techniką biotechnologiczną wykorzystującą zdolność niektórych drobnoustrojów do wzrostu w pożywkach stałych, w środowisku, w którym nie występuje, lub prawie nie występuje, wolna woda [Singhania i in. 2009]. Składniki surowców lignocelulozowych: celuloza i hemicelulozy, są na początku procesu w dużym stopniu niedostępne, dlatego też drobnoustroje muszą wytworzyć kompleksy skutecznie

działających enzymów, aby te związki wielkocząsteczkowe przekształcić w cukry przyswajalne: mono- i dwucukry. Dominującą rolę odgrywają celulazy, będące kompleksem enzymów działających synergicznie: endoglukanazy (EC 3.2.1.4), egzoglukanazy (EC 3.2.1.19) oraz glukozydazy (EC 3.2.1.21). Zainteresowanie celulazami wciąż wzrasta ze względu na ich szerokie zastosowanie; enzymy te, wraz z hemicelulazami oraz pektynazami, wykorzystuje się do produkcji paliw, żywności i chemikaliów [Pandey i in. 1999]. Celulazy i ksylanazy (EC 3.2.1.8) znajdują zastosowanie również w przemyśle papierniczo-celulozowym [Tokarzewska-Zadora i in. 2005; Kang i in. 2004] oraz włókienniczym [Pandey i in. 1999]. Korzystne jest stosowanie preparatów enzymatycznych w żywieniu zwierząt gospodarskich, zwłaszcza drobiu i trzody chlewnej, ze względu na możliwość pełniejszego wykorzystania składników pochodzenia roślinnego [Witkowska i in. 2007].

W bioprocessach prowadzonych metodą hodowli w podłożu stałym drobnoustroje mają ogromny potencjał produkcyjny i próby pofermentacyjne mogą zawierać takie produkty, jak enzymy: w tym celulazy i hemicelulazy, inne białka oraz kwasy organiczne [Witkowska i in. 2007]. Wśród kwasów organicznych bardzo cennym kwasem jest kwas szczawiowy, znajdujący szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in. w obróbce metali, w obróbce materiałów włókienniczych, w przemyśle garbarskim oraz w przemyśle papierniczym. W produkcji żywności kwas ten stosowany jest jako inhibitor enzymatycznego brązowienia owoców i warzyw oraz jako czynnik klarujący.

Celem prezentowanej pracy była ocena możliwości wykorzystania makuchu słonecznikowego jako substratu do równoczesnej syntezy kwasu szczawiowego oraz enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych przez *A. niger* w hodowlach w podłożu stałym.

2. Materiały i metody badań

Drobnoustrój

W badaniach stosowano 5 szczepów *A. niger*: C12, S, W78B, W78C oraz X z kolekcji czystych kultur Instytutu Chemii i Technologii Żywności Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.

Podłoże i sposób prowadzenia hodowli

Podłoże hodowlane przygotowywano z peletowanego makuchu słonecznikowego pochodzącego z prywatnego gospodarstwa (Nieciszów). Skład makuchu słonecznikowego zmienia się w zależności od jakości surowca oraz technologii pozyskiwania oleju. Według Antoszkiewicz [2001] w skład makuchu wchodzi [g kg⁻¹ s.m.]: białko ogólne 275,4, włókno surowe 251,5, tłuszcz 150,5. W stosowanym makuchu zawartość tłuszczu, oznaczona metodą Soxhleta, wyniosła 125 g kg⁻¹ s.m. Makuch poddawano rozdrobnieniu i zwilżeniu do zawartości wody 50% (poza procesem, w którym badanym parametrem była wilgotność początkowa, stosowana w zakresie

od 40 do 65%). Po sterylizacji w autoklawie (121°C, 30 min) schłodzony substrat, w ilości 100 g, szczepiono zawiesiną zarodników *A. niger* o gęstości $2,84-5,2 \cdot 10^7$ zarodników w 1 cm³, w ilości 5 cm³. Proces biosyntezy prowadzono metodą hodowli w podłożu stałym w zlewkach o pojemności 1000 cm³ umieszczonych w cieplarni, w temperaturze 30°C. 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 kwasu szczawiowego i enzymów hydrolitycznych, dla każdego z przyjętych wariantów, prowadzono w dwóch powtórzeniach i jako wynik końcowy podawano średnią arytmetyczną obu oznaczeń.

Metody analizy

W próbach pofermentacyjnych dokonywano pomiarów wilgotności podłoża hodowlanego, natomiast w celu oznaczenia stężenia kwasu szczawiowego 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 24 godzinach zawiesinę sączono i przesącz poddawano oznaczeniom analitycznym.

Stężenie 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. Oznaczeń dokonywano w temperaturze pokojowej. Wyniki oznaczeń przeliczano na suchą masę podłoża [g kg⁻¹].

Oznaczenie aktywności celulolitycznej

W celu oznaczenia aktywności CMC-azy (EC 3.2.1.4) stosowano metodę opartą na reakcji scukrzania soli sodowej karboksymetylocelulozy jako substratu [Żbikowska, Szerszunowicz 1998]. Inkubację prowadzono przez 30 minut w łaźni wodnej, w temp. 50°C przy pH 4,8. Aktywność celulaz wyrażano w µmolach cukrów redukujących (przyjmując glukozę jako standard) uwalnianych z substratu w ciągu 1 minuty, w przeliczeniu na 1 g suchej masy podłoża [U g⁻¹].

Oznaczenie aktywności ksylanolitycznej

Aktywność ksylanazy (E.C. 3.2.1.8) określano przez oznaczenie stężenia cukrów redukujących uwalnianych w hydrolizatach poinkubacyjnych enzymu z substratem, tj. roztworem ksylanu brzożowego o stężeniu 1% (30 min, temperatura 50°C, pH 4,8) [Żbikowska, Szerszunowicz 1998]. Aktywność ksylanaz wyrażano w µmolach cukrów redukujących (w przeliczeniu na ksylozę) uwalnianych z substratu w ciągu 1 minuty, w przeliczeniu na 1g suchej masy podłoża [U g⁻¹].

3. Wyniki badań

W celu określenia możliwości równoczesnej biosyntezy kwasu szczawiowego i enzymów hydrolitycznych (celulaz i ksylanaz) w podłożu z makuchem słonecznikowym w pierwszej części badań określono wpływ wilgotności podłoża na ilość powstającego kwasu szczawiowego. Wyniki badań uzyskane dla stosowanych poziomów wilgotności podłoża: 40, 45, 50, 55, 60, 65% przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Wpływ wilgotności początkowej podłoża na stężenie produktu w procesie syntezy kwasu szczawiowego przez *A. niger* S

Wilgotność początkowa [%]	Stężenie kwasu szczawiowego [g kg ⁻¹]				
	Czas [doba]				
	4	5	7	9	13
40	34,1	34,4	34,7	47,9	55,6
45	39,0	43,6	50,7	63,6	67,5
50	45,2	62,7	57,8	62,5	68,5
55	51,8	61,9	61,0	60,4	67,9
60	44,3	52,2	51,2	62,9	40,0
65	26,9	33,6	36,1	56,0	34,3

Źródło: opracowanie własne.

Wilgotność początkowa podłoża miała wpływ na ilość kwasu szczawiowego produkowanego przez wybrany szczep S. Najwyższe stężenie kwasu, równe 68,5 kg⁻¹, uzyskano w próbach o wilgotności 50% i ten poziom wilgotności początkowej podłoża przyjęto w dalszych badaniach. Nieznacznie niższe wartości uzyskano w próbach o wilgotności 45 i 55%.

W przeprowadzonym eksperymencie zastosowano szczep S pleśni *Aspergillus niger*, wykorzystywany z powodzeniem w procesach biosyntezy kwasu szczawiowego w podłożu z makuchem rzepakowym [Gąsiorek i in. 2007]. W celu doboru szczepu o najwyższych zdolnościach kwasotwórczych w procesach prowadzonych z wykorzystaniem makuchu słonecznikowego zbadano 5 szczepów *Aspergillus niger*: C12, X, S, W78B oraz W78C. Hodowle prowadzono przez 16 dni.

Jak wynika z danych zawartych w tab. 2, maksimum produkcji kwasu szczawiowego przypadło na 13 dobę hodowli, przy czym wszystkie szczepy *A. niger*, poza szczepem X, dla którego stężenie kwasu było najniższe, wykazywały zbliżone uzdolnienia w kierunku syntezy produktu, tworząc od 71,2 do 73,5 g kwasu szczawiowego na kilogram suchej masy podłoża.

W celu zintensyfikowania syntezy bioproduktu do podłoża z makuchem słonecznikowym dodawano metanol w stężeniu 2% obj./wag. Stymulująca rola niższych alkoholi w biosyntezie kwasów organicznych jest podkreślana przez wielu autorów [Grewal, Karla 1995; Kumar i in. 2003; Roukas 2000; Rymowicz, Lenart

Tabela 2. Synteza kwasu szczawiowego przez wybrane szczepy *A. niger*

Szczep <i>Aspergillus niger</i>	Stężenie kwasu szczawiowego [g kg ⁻¹]			
	Czas [doba]			
	6	9	13	16
C12	51,4	58,6	73,5	60,0
X	35,7	38,6	60,6	55,2
S	46,2	53,8	71,2	67,0
W78C	48,1	50,4	73,0	60,0
W78B	51,5	59,3	72,1	53,9

Źródło: opracowanie własne.

2004] i dodawanie etanolu bądź metanolu stało się powszechną praktyką. Jednak nie wszystkie opinie na ten temat są ze sobą zgodne. Szczodrak i Ilczuk [1975] po serii doświadczeń z użyciem szczepów o różnej aktywności kwasotwórczej hodowanych metodą hodowli powierzchniowej na melasie stwierdzili, że stymulujące syntezę kwasu cytrynowego działanie niższych alkoholi ujawnia się jedynie wobec szczepów *A. niger* o słabej lub co najwyżej średniej aktywności kwasotwórczej. Pozostaje ono jednak praktycznie bez wpływu na ten proces w odniesieniu do szczepów wysokoaktywnych. Obserwacje te zostały potwierdzone w procesach prowadzonych metodą hodowli w podłożu stałym z wykorzystaniem wysłódków buraczanych [Gąsiorek 1999].

Oceniając wpływ metanolu na syntezę kwasu szczawiowego w podłożu z makuchem słonecznikowym, zastosowano trzy szczepy: C12 i W78C, wykazujące najwyższe zdolności w zakresie tworzenia kwasu szczawiowego, oraz szczep S, z udziałem którego uzyskiwano wysokie aktywności celulaz i ksylanaz w biosyntezie kwasu cytrynowego na wysłódkach buraczanych [Gąsiorek 1999].

Tabela 3. Wpływ dodawania metanolu do podłoża z makucho słonecznikowego na syntezę kwasu szczawiowego przez wybrane szczepy *A. niger*

Szczep <i>A. niger</i>	Metanol [%]	Stężenie kwasu szczawiowego [g kg ⁻¹]			
		Czas [doba]			
		6	9	13	16
C12	bez metanolu	85,2	90,8	98,1	84,2
C12	2	97,5	94,3	97,8	85,2
S	bez metanolu	77,6	78,8	81,6	81,1
S	2	97,5	97,3	95,2	93,6
W78C	bez metanolu	79,8	80,9	90,7	84,9
W78C	2	71,2	72,6	74,9	80,6

Źródło: opracowanie własne.

Wyniki przedstawione w tab. 3 obrazują stymulującą rolę metanolu tylko w odniesieniu do hodowli ze szczepem S, przy czym maksymalne stężenie produktu w tej próbie, tj. 97,5 gkg⁻¹, nie było wyższe od tego uzyskanego dla szczepu C12, który w tej serii badań wykazał najwyższą aktywność kwasotwórczą i produkował w 13 dobie hodowli 98,1 g kg⁻¹ kwasu szczawiowego.

W przypadku szczepu W78C po dodaniu metanolu zaobserwowano nawet obniżenie ilości kwasu szczawiowego, prawie o 10%, w stosunku do prób bez alkoholu. Celowe okazało się natomiast dodawanie metanolu ze względu na jego rolę w ograniczaniu zarodnikowania hodowli, co również potwierdziło wcześniejsze doniesienia [Gąsiorek i in. 2007].

W procesach syntezy kwasów organicznych prowadzonych metodą hodowli w podłożu stałym przez grzyby strzępkowe korzystne jest to, że obok głównego bioproduktu syntezowane są również enzymy hydrolityczne. W przypadku surowców zawierających celulozę grzyby dokonują sekrecji enzymów celulolitycznych, przy udziale których następuje hydroliza tego polimeru. Enzymem towarzyszącym jest ksylanaza, przy udziale której degradowany jest ksylan. W prezentowanej pracy oceniano aktywność CMC-azy (EC 3.2.1.4) oraz ksylanazy (E.C. 3.2.1.8).

W tabeli 4 przedstawiono dynamikę tworzenia enzymów celulolitycznych, z której wynika, że wraz z upływem czasu trwania procesu aktywność celulaz rosła, osiągając maksimum w ostatniej, tj. szesnastej dobie hodowli.

Tabela 4. Aktywność celulolityczna w procesie syntezy kwasu szczawiowego przez wybrane szczepy *A. niger*

Szczep <i>A. niger</i>	Metanol [%]	Aktywność celulaz [U g ⁻¹]			
		Czas [doba]			
		6	9	13	16
C12	bez metanolu	8,8	11,65	11,75	12,65
C12	2	8,96	9,32	10,24	11,62
S	bez metanolu	9,29	12,78	12,48	14,35
S	2	7,83	9,23	10,07	11,7
W78C	bez metanolu	6,99	8,94	9,34	10,16
W78C	2	7,66	10,59	10,89	12,08

Źródło: opracowanie własne.

Spśród ocenianych szczepów najwyższą aktywność celulaz, na poziomie 14,35 U g⁻¹, wykazał szczep S. W przypadku tego szczepu dodanie do podłoża metanolu obniżyło aktywność celulolityczną o blisko 20%. Stymulujący wpływ dodania metanolu zaobserwowano natomiast w przypadku szczepu W78C, ale uzyskana w tej próbie aktywność CMC-azy nie była wyższa od tej uzyskanej dla szczepu S w podłożu bez metanolu.

Odpady celulozowe są częstym substratem w syntezie celulaz przez *A. niger*, przy czym uzyskiwane aktywności są bardzo zróżnicowane i wynoszą [U g^{-1}]: od kilku (trociny – 1,8; wyłoki trzciny cukrowej – 5,0), kilkunastu (trawa – 17,6; liście – 12,1; słoma pszeniczna – 11,2; łuski ryżu – 14,1) do nawet kilkuset jednostek (otręby pszenne – 310,6) [Bansal i in. 2012]. W hodowli mutantu *A. niger* KK2 na słomie ryżowej uzyskano aktywność celulaz na poziomie 130 U g^{-1} [Kang i in. 2004]. Witkowska i in. [2007], stosując jako składniki podłoża fasolę, rzepak, skrobię kukurydzianą oraz mąkę sojową, uzyskali aktywność nieprzekraczającą 11 U g^{-1} , ale zastosowane źródła węgla były dobrane pod względem produkcji fitaz.

Z danych literaturowych można wnioskować o dużym zróżnicowaniu również w produkcji ksylanaz, co wynika, podobnie jak w przypadku celulaz, z różnorodności stosowanych źródeł węgla oraz ukierunkowania procesu biosyntezy na tworzenie enzymów przez stosowanie wysokowydajnych, często genetycznie ulepszonych szczepów, oraz zoptymalizowanie warunków hodowli. Prowadząc procesy biosyntezy metodą hodowli w podłożu stałym z udziałem *A. niger*, uzyskiwano aktywności ksylanaz na poziomie blisko 60 U g^{-1} , gdy surowcem były rzepak i skrobia kukurydziana [Witkowska i in. 2007], oraz $108,15 \text{ U g}^{-1}$ w pożywce z otrębami pszennymi [Rywińska i in. 2007]. Zastosowanie drobnoustrojów ksylanolitycznych pozwala na uzyskiwanie znacznie wyższych aktywności, np. około 1100 U g^{-1} z udziałem *A. tamari* [Souza i in. 2001]; wysoką aktywność uzyskano też z udziałem szczepu *Rhizopus nigricans* w podłożu z otrębami pszennymi $279,5 \text{ U g}^{-1}$ [Rywińska i in. 2007].

Aktywności ksylanaz uzyskane w prezentowanej pracy przedstawiono w tab. 5.

Tabela 5. Aktywność ksylanolityczna w procesie syntezy kwasu szczawiowego przez wybrane szczepy *A. niger*

Szczep <i>A. niger</i>	Metanol [%]	Aktywność ksylanaz [U g^{-1}]			
		Czas fermentacji [dni]			
		6	9	13	16
C12	bez metanolu	98,61	39,79	25,38	19,46
C12	2	77,88	34,66	23,37	25,97
S	bez metanolu	156,04	189,99	115,19	108,48
S	2	39,4	38,21	22,22	18,47
W78C	bez metanolu	48,28	70,38	51,04	44,73
W78C	2	71,96	75,58	74,33	68,61

Źródło: opracowanie własne.

Również w tym przypadku najefektywniejszym producentem ksylanaz okazał się szczep S, dla którego aktywność wyniosła $189,99 \text{ U g}^{-1}$ (w 9 dobie hodowli) i, podobnie jak w poprzednim eksperymencie, dodanie metanolu nie zwiększało, ale

wręcz drastycznie obniżało tworzenie ksylanaz przez badany szczep. W przypadku pozostałych dwóch szczepów efekt dodawania alkoholu do podłoża miał zróżnicowany charakter: pozostawał praktycznie bez wpływu na wyniki uzyskane dla szczepu W78C oraz obniżał o około 20% aktywność celulaz wydzielanych przez *A. niger* C12.

4. Wnioski

1. Wszystkie zastosowane w pracy szczepy pleśni *A. niger* są zdolne do równoczesnej syntezy kwasu szczawiowego oraz enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych.

2. Największą ilość kwasu szczawiowego, 98,1 g kg⁻¹, wytwarzał szczep *A. niger* C-12, w 13 dobie hodowli przy wilgotności początkowej podłoża równej 50%.

3. Najbardziej efektywnym producentem celulaz i ksylanaz był szczep *A. niger* S. Maksymalna aktywność celulaz wyniosła 14,35 U g⁻¹ (w szesnastej dobie hodowli), natomiast ksylanaz około 190 U g⁻¹ (w dziewiątej dobie).

4. Dodawanie do podłoża metanolu w ilości 2% nie zwiększało ilości kwasu szczawiowego w przypadku stosowania szczepów o wysokiej zdolności kwasotwórczej; nie zwiększało też aktywności enzymatycznej, natomiast było celowe ze względu na ograniczenie zarodnikowania hodowli.

Literatura

- Antoszkiewicz Z., *Wartość odżywcza i zastosowanie makuchu słonecznikowego w żywieniu rosnących świń*, Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn 2001.
- Bansal N., Tewari R., Soni R., Soni S.K., *Production of cellulases from Aspergillus niger NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residu*, "Waste Management", 32, 2012, s. 1341-1346.
- European Biomass Statistics, *A Statistical Report on the Contribution of Biomass to the Energy System in the EU 27*, European Biomass Association, 2007.
- Gąsiorek E., *Badania nad biosyntezą kwasu cytrynowego metodą hodowli w podłożu stałym (solid state)*, Rozprawa doktorska, Akademia Rolnicza, 1999.
- Gąsiorek E., Fronia J., Firuta P., Podgórski W., *Makuch rzepakowy jako substrat do biosyntezy kwasu szczawiowego metodą solid state*, Acta Sci. Pol., Biotechnologia, 6(3), 2007, s. 27-32.
- Grewal H.S., Kalra K.I., *Fungal production of citric acid*, Biotechnol. Advances, 13, 1995, s. 209-234.
- Haq I.U., Ashraf H., Iqbal J., Qadeer M.A., *Production of alpha amylase by Bacillus licheniformis using an economical medium*, Bioresource Technol., 87(1), 2003, s. 57-61.
- Kang S.W., Park Y.S., Lee J.S., Hong S.I., Kim S.W., *Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass*, Bioresour. Technol., 91, 2004, s. 153-156.
- Konarkowski A., *Śruta słonecznikowa w żywieniu świń*, „Trzoda Chlewna”, 7, 2007, s. 55-57.
- Kota K.P., Sridhar, P., *Solid state cultivation of Streptomyces clavuligerus for cephamycin C production*, Process Biochem., 34, 1999, s. 325-328.
- Kumar D., Jain V.K., Shanker G., Srivastava A., *Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse*, Process Biochem., 38, 2003, s. 1731-1738.

- Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P., *Solid state fermentation for the production of industrial enzymes*, Current Sci., 7, 1999, s. 149-162.
- Raport kontrolny nr: 92/MAL/2006-1. *Badanie pelletu słonecznikowego na zlecenie PW „Fokus”*, Analizy wykonano w Laboratorium J S Hamilton Poland.
- Rashid U., Anwar F., Moser B., Ashraf S., *Production of sunflower oil methyl esters by optimizes alkali-catalyzed methanolysis*, “Biomass&Bioenergy”, 32, 2008, s. 1202-1205.
- Raß M., Schein C., Matthaus B., *Virgin sunflower oil*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 110, 2008, s. 618-624.
- Roukas T., *Citric and gluconic acid production from fig by Aspergillus niger using solid-state fermentation*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 25, 2000, s. 298-304.
- Rymowicz W., Lenart D., *Enhanced production of oxalic acid in Aspergillus niger by the addition of methanol*, EJPAU, 7(2), 2004.
- 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., Biotechnologia, 6(2), 2007, s. 13-23.
- Sharma R., Sogi D.S., Saxena D.C., *Dehulling performance and textural characteristics of unshelled and shelled sunflower (Helianthus annuus L.) seeds*, J. of Food Engineering, 92, 2009, s. 1-7.
- Shashirekha M.N., Rajarathnam S., Bano Z., *Enhancement of bioconversion efficiency and chemistry of the mushroom, Pleurotus sajor-caju (Berk and Br.) Sacc. produced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes*, Food Chem., 76, 2002, s. 27-31.
- Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A., *Recent advances in solid-state fermentation*, Biochem. Eng. J., 44, 2009, s. 13-18.
- Sircar A., Sridhar P., Das P.K., *Optimization of solid state medium for the production of clavulanic acid by Streptomyces clavuligerus*, Process Biochem., 33, 1998, s. 283-289.
- Souza D.F., Souza C.G.M., Peralta R.M., *Effect of easily metabolizable sugars in the production of xy-lanase by Aspergillus tamari in solid-state fermentation*, Process Biochem., 36, 2001, s. 835-838.
- Souza D.F., Souza C.G.M., Peralta R.M., *Effect of easily metabolizable sugars in the production of xy-lanase by Aspergillus tamari in solid-state fermentation*, Process Biochem., 36, 2001, s. 835-838.
- Szczodrak J., Ilczuk Z., *Wpływ alkoholu na syntezę kwasu cytrynowego przez pleśń Aspergillus niger*, Przem. Ferm. i Rol., 6, 1975, s. 20-21.
- Tokarzewska-Zadora J., Rogalski J., Szczodrak J., *Enzymy rozkładające ksylan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii*, „Biotechnologia” 2(69), 2005, s. 163-182.
- Witkowska D., Rywińska A., Piegza M., *Wytwarzanie fitaz, celulaz i ksylanaz przez wybrane szczepy grzybów strzępkowych*, „Żywność. Nauka. Technologia. Jakość” 1(50), 2007, s. 150-160.
- Yorgun S., Senzos S., Kackar O.M., *Flash pyrolysis of sunflower oil cake for production of liquid fuels*, “Journal of Analytical and Applied Pyrolysis”, 60, 2001, s. 1-12.
- Żbikowska A., Szerszunowicz I., *Wybrane zagadnienia z enzymologii: przewodnik do ćwiczeń laboratoryjnych*, Wyd. ART, Olsztyn 1998.

**SUNFLOWER SEED MEAL AS A SUBSTRATE
FOR THE SIMULTANEOUS BIOSYNTHESIS
OF OXALIC ACID, CELLULASES AND XYLANASES BY
ASPERGILLUS NIGER STRAINS**

Summary: Five strains of *Aspergillus niger*: C12, S, X, W78B and W78C were examined for their ability to the simultaneous synthesis of oxalic acid and hydrolytic enzymes such as cellulases and xylanases under solid state fermentation system. Sunflower seed meal was used as substrate and the effect of methanol on oxalic acid concentration and hydrolytic enzymes activity was tested. The most effective producer of oxalic acid was *A. niger* C12. The highest concentration obtained with this strain was 98 g kg⁻¹ s.s. The addition of methanol did not increase the amount of bioproduct. The highest synthesis of cellulases and xylanases was observed for *A. niger* S strain, 14 U g⁻¹ s.s. and 190 U g⁻¹ s.s., respectively.

Keywords: sunflower seed meal, solid state fermentation, oxalic acid, cellulases, xylanases.