

Intensyfikacja przemian węglowodanów w odpadach ligninocelulozowych w hodowli grzybów strzępkowych

Małgorzata Lewandowska

Włodzimierz Bednarski

Instytut Biotechnologii Żywności

Akademia Rolniczo-Techniczna

Olsztyn

1. Wstęp

Postępujące zużycie nieodnawialnych zasobów surowców paliwowych na świecie, a także konieczność ochrony środowiska naturalnego, skłaniają do poszukiwania alternatywnych źródeł energii, m.in. w biomasie roślinnej, której ilości gromadzone co roku, przewyższają dziesięciokrotnie jej zużycie. Szacuje się, że jej roczna produkcja na świecie, w wyniku fotosyntezy, wynosi od 2,5 do 5×10^{10} t. Ponad połowę tego stanowią produkty uboczne, które są wykorzystywane tylko częściowo lub w ogóle nie podlegają zagospodarowaniu. Zaliczyć do nich można: roślinność łądową i wodną, nadwyżki i pozostałości z produkcji rolniczej i leśnej, makulaturę, wszelkie odpady organiczne przemysłu spożywczego oraz gospodarki komunalnej (1,2).

Wymienione materiały ligninocelulozowe mogą stanowić pokaźną rezerwę surowców węglowodanowych dla wielu przemysłów stosujących technologie bioprosesowe. W ich składzie wyróżnia się trzy główne składniki: celulozę, ligninę oraz hemicelulozę. Największe zainteresowanie biotechnologów skierowane jest na wykorzystanie celulozy, ponieważ produktem jej hydrolizy jest glukoza, a zatem cukier łatwo wykorzystywany przez mikroorganizmy. Czynnikiem ograniczającym biotechnologiczne przetwarzanie ligninocelulozy jest drugi z jej podstawowych składników, tj. lignina. Jest ona wysoce odporna na wszelkiego rodzaju biologiczne transformacje. Jej obecność utrudnia enzymom hydrolitycznym dostęp do celulozy. W celu rozluźnienia kompleksów celulozy z ligniną i hemicelulozami często stosuje się szereg operacji wstępnych przed zastosowaniem metod biotechnologicznych, które polegają na traktowaniu czynnikami chemicznymi lub fizycznymi (3-5).

Obecnie w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są prace badawcze w kierunku ekonomicznie i ekologicznie uzasadnionego zagospodarowania od-

padów ligninocelulozowych. Powstają pilotowe stacje doświadczalne o zróżnicowanych możliwościach przerobu surowców (od 1t dziennie do 1-4 t/godzinę) i kierunkach ich wykorzystania (produkcja białka paszowego, enzymów, etanolu, furfurołu, kwasów organicznych i in.). Stanowi to wyraźną zachętę dla polskich jednostek badawczych ku większemu zaangażowaniu w opracowanie nowoczesnych technologii przerobu surowców ligninocelulozowych.

2. Cel badań

Bezpośrednim celem badań były następujące zadania:

- intensyfikacja przemian węglowodanów w odpadach ligninocelulozowych oraz ocena skutków ich biodegradacji przez grzyby strzępkowe,
- ocena efektywności procesów biodegradacyjnych w zależności od wstępnej obróbki surowca ligninocelulozowego, składu podłoża, metody hodowli (powierzchniowa lub wstrząsana) oraz sposobu jej prowadzenia (pojedyncze lub mieszane kultury grzybów),
- porównanie składu chemicznego substratów oraz preparatów po ich biodegradacji przez grzyby strzępkowe ze szczególnym uwzględnieniem ubytku suchej masy i przyrostu zawartości białka,
- ocena efektów biodegradacji błonnika pokarmowego w substratach, w zależności od jego składu, doboru szczepów grzybów i warunków ich hodowli,
- porównanie składu cukrów prostych w błonniku pokarmowym obydwóch substratów przed i po hodowli grzybów.

3. Organizacja badań

Badania prowadzono z udziałem trzech szczepów grzybów strzępkowych: *Aspergillus niger* 33/20/9, *Trichoderma reesei* 4/9d z kolekcji szczepów Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie oraz *Trichoderma reesei* 9414 z kolekcji szczepów Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa AR w Lublinie.

W doświadczeniach zastosowano dwa rodzaje substratów ligninocelulozowych: nieużyteczne odpady pszenne pozostające po czyszczeniu ziarna, oraz okrywą nasienną (łuskę) bobiku odmiany Nadwiślański. Wymienione substraty po rozdrobnieniu w młynku udarowym typ 820 P60 w ciągu 5 min przy 2000 obr./min wykorzystano jako główny składnik podłoża hodowlanego (syntetyczne podłoże Saundersa (6)) w ilości 10% (w przeliczeniu na s.m.), którego kwasowość doprowadzano do pH 4,5, za pomocą pH-metru uniwersalnego, dodając 1N roztwór HCl. Podłoże w ilości 100 cm³ umieszczano w kolbach stożkowych ok. 500 cm³ lub w butelkach Roux ok. 500 cm³ i sterylizowano w temperaturze 121°C przez 20 min. Tak przygotowane podłoże zaszczipiano odpowiednimi szczepami grzybów strzępkowych dodając inoculum w postaci zmywu ze skosu agarowego PDA (podłoże ziemniacza-

no-glukozowe) (7) o powierzchni 5 cm², zalanego 10 cm³ płynu fizjologicznego. Hodowle grzybów prowadzono przez 10 dni w temperaturze 28°C, powtarzając je 3-4-krotnie, każdorazowo w seriach po 4 kolby, zaszczipiane jednym rodzajem grzyba.

Doświadczenia obejmowały następujące etapy:

1. Dobór metody hodowli grzybów strzępkowych: hodowle powierzchniowe (w butelkach Roux ok. 500 cm³, w komorze cieplnej) lub wstrząsane (w kolbach stożkowych ok. 500 cm³ we wstrząsarce New Brunswick S25 przy szybkości 200 rpm).

2. Określenie wpływu zastosowania wstępnej modyfikacji surowców: fizykochemicznej lub enzymatycznej na efektywność biokonwersji ich składników przez grzyby.

Sposób obróbki fizykochemicznej:

Łuski bobikowe lub odpady pszenne łączono z 1% roztworem NaOH w proporcji 1:5 (m/v) i tak przygotowaną zawiesinę przetrzymywano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 60 minut.

Po tym czasie zawiesinę filtrowano, a osad przepłukiwano wodą wodociągową do zubożenia. Tak przygotowane surowce ligninocelulozowe (trawione łuski bobikowe lub odpady pszenne), użyto do namnażania biomasy grzybów strzępkowych, dodając je do podłoża Saundersa w ilości 10% (w przeliczeniu na suchą masę)

Sposób hydrolizy enzymatycznej:

Łuski bobikowe lub odpady pszenne łączono z wodą destylowaną w proporcji 1:9 (m/v), doprowadzono do kwasowości pH 5,0 za pomocą pH-metru uniwersalnego, stosując 1N roztwór HCl. Tak przygotowane substraty do hydrolizy w ilości 100 cm³, umieszczano w kolbach stożkowych ok. 500 cm³ i sterylizowano w temperaturze 121°C przez 20 minut. Następnie w sterylnych warunkach dodawano preparaty enzymatyczne ViscozymeTM 120L (NovoNordisk AS-Dania) lub Cellulase (EC 3.2.1.4. SIGMA) w ilości 250 j.a. w stosunku do ilości substratu)*.

W zależności od zastosowanego preparatu ustalono następujące warunki hydrolizy:

- dla preparatu ViscozymeTM: temperatura hydrolizy 50°C, czas 12 godzin,
- dla preparatu Cellulase: temperatura hydrolizy 37°C, czas 12 godzin,

W obydwu wariantach proces hydrolizy powtarzano 3-4-krotnie, każdorazowo w seriach po 4 kolby, do których dodawano jeden z preparatów enzymatycznych. Hydrolizaty traktowano jako podłoże do namnażania biomasy grzybów strzępkowych (po uprzednim uzupełnieniu w niezbędne związki mineralne i sterylizacji w warunkach jw.).

* 1 j.a. = 1 μmol glukozy uwalniany z celulozy (bibuła Whatman 1) przez 1h, w temp. 37°C, przy pH 5,0.

3. Wybór induktora biosyntezy enzymów kompleksu celulolitycznego poprzez namnażanie grzybów na podłożu Saundersa z udziałem celulozy Whatman (CC41) i cukrów: glukozy, sacharozy, laktozy, celobiozy i skrobi, stosowanych w ilościach 3+3% (m/v), wg sposobu: 3% glukozy + 3% celulozy, lub 3% sacharozy + 3% celulozy itd. Po 5-dniowym namnażaniu grzybów strzępkowych grzybnie oddzielano, a płyn pochodowlany analizowano pod względem ogólnej aktywności celulolitycznej (FPU Assay) (8).

Skuteczność indukcyjną wybranego cukru określano w hodowlach grzybów na podłożach z udziałem substratu ligninocelulozowego, stosując go dodatkowo do podłoży hodowlanych w ilości 50% błonnika surowego (zawartego w dodanym do podłoża surowcu ligninocelulozowym).

4. Określenie wpływu zastosowania hodowli mieszanych kultur grzybowych na efektywność biokonwersji substratów ligninocelulozowych. Hodowle mieszane prowadzono w dwóch wariantach. W pierwszym, pojedyncze szczepy grzybów namnażano metodą wstrząsaną, w opisanych warunkach przez 5 dni. Po tym czasie wprowadzano inoculum drugiego szczepu grzyba strzępkowego i kontynuowano hodowlę mieszanych kultur grzybowych przez kolejnych 5 dni. Przykładowo: jeżeli w pierwszej kolejności namnażano grzyby *Trichoderma reesei* (4/9d lub 9414), to jako drugi szczep doszczepiano *Aspergillus niger*. W drugim wariacie, gdzie jako pierwszy namnażano *Aspergillus niger*, w następnej kolejności doszczepiano *Trichoderma reesei* (odpowiednio 4/9d lub 9414).

Po zakończeniu hodowli w każdym z etapów badań, otrzymany preparat, tj. podłoże wraz z namnożoną biomasa grzybów, suszono (60°C/48h), ważono i po zmieleniu w młynku udarowym (5 min/2000 obr./min) poddawano analizie chemicznej oznaczając zawartość: suchej substancji, popiołu, substancji azotowych i białka ogółem wg Kjeldahla (9), skrobi (10), substancji azotowych niebiałkowych (rozpuszczalnych w 12% roztworze kwasu trójchlorooctowego) wg Bhattya (11), błonnika (włókna surowego) wg Scharrera-Kürschnera (10).

W wybranych preparatach oznaczono ponadto zawartość błonnika pokarmowego rozpuszczalnego w wodzie (SDF) i nierozpuszczalnego (IDF) wg Aspa (12), oraz cukrów prostych wchodzących w skład frakcji IDF błonnika pokarmowego wg Bjerregaarda (13).

W celu dokonania oceny zmian w składzie chemicznym każdego z surowców ligninocelulozowych po biologicznej degradacji, uzyskane wyniki porównano ze składem prób kontrolnych (wysuszone, nie zaszczerpione podłoża z dodatkiem łusek bobikowych lub odpadów pszennych). Obliczenia zostały oparte na wartościach wyrażonych w gramach danego składnika (białko właściwe* lub błonnik) przypadających na średnią masę próby po wysuszeniu. Wydajność procesu biosyntezy białka obliczano jako procentowy stosunek przyrostu białka właściwego w danym preparacie, do ubytku suchej masy podłoża. Przykłady obliczeń przedstawiono w opisie tabeli 2.

* białko właściwe — sposób obliczenia w tabeli 1.

4. Omówienie wyników

Na wstępie przeprowadzonych badań stwierdzono, że oba substraty charakteryzowały się składem typowym dla surowców ligninocelulozowych, a składnikiem o znaczącym udziale procentowym był błonnik (włókno surowe). Jego zawartość w łusce bobikowej wynosiła 50,1% s.s., zaś w odpadach pszennych: 23,6% s.s. (tab. 1). Wśród pozostałych składników przeważały: skrobia, której zawartość w łuskach bobikowych wynosiła 10,71% s.s., a w odpadach pszennych 14,2 % s.s. oraz białko ogółem, odpowiednio: 6,3 i 6,8% s.s. Odpady pszenne charakteryzowały się ponadto wysoką zawartością popiołu, sięgającą 18,9% s.s.

TABELA 1

SKŁAD CHEMICZNY SUROWCÓW LIGNINOCELULOZOWYCH: ŁUSKI BOBIKU I ODPADÓW PSZENNYCH

Składnik	(%) / (% s.s.)	Łuski bobikowe		Odpady pszenne	
		natywne	trawione	natywne	trawione
sucha substancja		89,4	93,41	91,44	91,12
popiół		3,8	2,49	18,97	5,53
azot ogółem		1,01	0,94	1,09	0,36
białko ogółem ¹		6,31	5,87	6,81	2,25
azot rozpuszczalny w 12% roztw. KTO ²		0,18	0,03	0,39	0,05
białko właściwe ³		5,19	5,68	4,37	1,94
węglowodany ogółem		89,9	91,64	74,22	92,22
skrobia		10,7	7,57	14,25	9,38
błonnik (włókno surowe)		50,1	64,79	23,62	28,02

¹ Białko ogółem = $N_{og} \cdot 6,25$

² KTO — kwas trójchlorooctowy

³ Białko właściwe = $(N_{og} - N_{rozp.w\ 12\% \ KTO}) \cdot 6,25$.

Surowce ligninocelulozowe poddane obróbce mechanicznej stanowiły główny składnik podłoża do hodowli grzybów strzępkowych.

W pierwszym etapie doświadczenia przeprowadzono namnażanie trzech szczepów grzybów strzępkowych: *Trichoderma reesei* 9414, *Trichoderma reesei* 4/9d i *Aspergillus niger* 33/20/9 metodą powierzchniową i wstrząsaną.

Porównując efekty uzyskane po namnażaniu grzybów strzępkowych na podłożach z dodatkiem łusek bobikowych dwoma metodami należy stwierdzić, że korzystniejsze wyniki uzyskano po hodowlach prowadzonych metodą wstrząsaną (tab. 2). Zarówno przyrost zawartości białka w stosunku do próby kontrolnej (24,5-54,8%), jak i ubytek włókna surowego (38,3-47,4%) osiągnął wartości wyższe niż w metodzie powierzchniowej, odpowiednio: 6-41% i 29,8-44,7%.

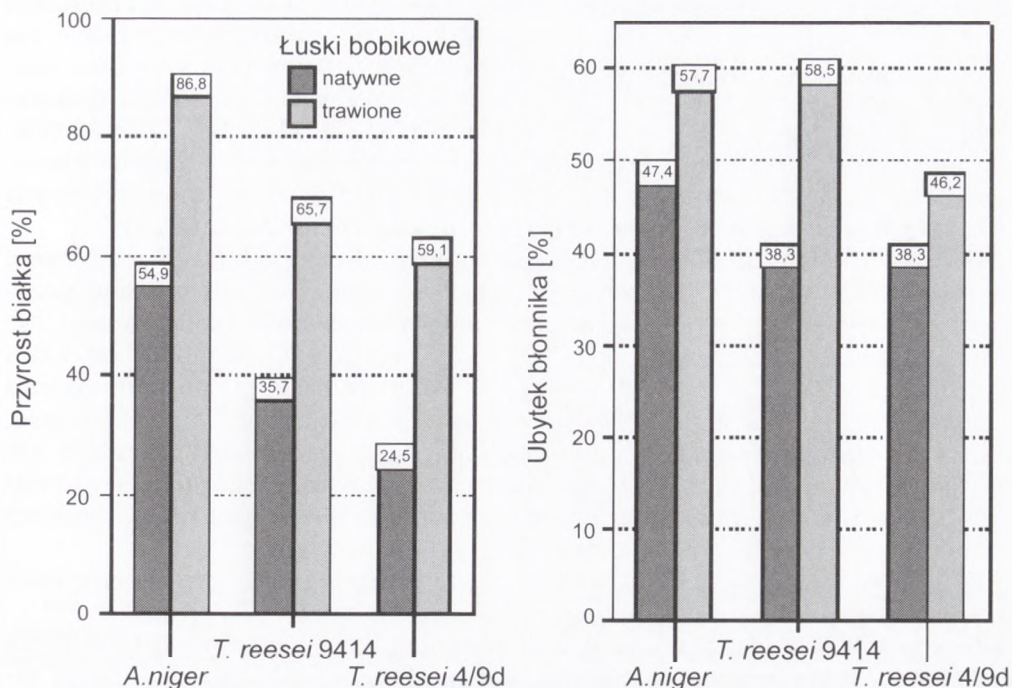
TABELA 2
 EFEKTY BIODEGRADACJI SKŁADNIKÓW ŁUSEK BOBIKOWYCH PO NAMAZANIU GRZYBÓW STRZEPKOWYCH DWOMA METODAMI

Hodowla z udziałem szczepu	Sucha masa		Białko właściwe (Nog - Nrozp. w 12% KTO) · 6,25		Błonnik		Ubytek suchej masy		Ubytek błonnik		Przyrost białka właściwego		Wydajność**	
	(%)	(g ¹)	(%)	(g ²)	(%)	(g ²)	(% ^{3*})	(g ³)	(% ^{3*})	(g ³)	(% ^{4*})	(g ⁴)	(%)	(%)
<i>Aspergillus niger</i> 33/20/9	W	96,00	14,15	9,88	1,45	3,94	27,85	11,34	1,81	47,39	3,55	54,89	0,51	30,93
	P	97,29	14,14	9,18	1,33	4,14	28,50	11,40	1,82	44,72	3,35	41,04	0,39	21,43
<i>Trichoderma reesei</i> 9414	W	98,50	14,84	8,43	1,27	4,48	30,20	7,02	1,12	38,31	2,87	35,1	0,33	29,46
	P	98,50	14,88	7,13	1,08	5,08	34,17	6,77	1,08	32,17	2,41	14,10	0,13	12,31
<i>Trichoderma reesei</i> 4/9d	W	98,37	14,86	7,75	1,17	4,62	31,11	6,89	1,10	38,32	2,89	24,46	0,23	20,90
	P	97,61	14,67	6,68	1,00	5,26	35,86	8,08	1,29	29,77	2,23	6,04	0,06	4,42
Próba kontrolna		97,25	15,96	5,75	0,94	7,49								

W — metoda wstrząsana

P — metoda powierzchniowa

¹próba po wysuszeniu w temp. 60°C/48h; ²ilość białka właściwego (lub błonnika) w próbce po wysuszeniu (przykładowo: (14,15g · 9,88%)/96,00% = 1,45g); ³ubytok suchej masy (lub błonnika) w próbce po namazaniu grzybów w stosunku do próby kontrolnej (przykładowo: 15,96g - 14,15g = 1,81g); ⁴przyrost białka właściwego w próbce po namazaniu grzybów w stosunku do próby kontrolnej (przykładowo: 1,45g - 0,94g = 0,51g); ^{3*} i ^{4*} wartości ³ i ⁴ wyrażone w % w stosunku do próby kontrolnej (przykładowo: ((1,81g · 100%)/15,96g = 11,34%)); ^{**}wydajność biosyntezy białka — przyrost białka w g ⁴ 100%/ubytok suchej masy ³ (przykładowo: ((0,51g · 100%)/1,81 = 30,93)).



Rys. 1. Zmiany zawartości białka i błonnika w preparatach po hodowli grzybów strzępkowych na podłożach z udziałem natywnych i trawionych łuski bobikowych.

Po hodowlach grzybów na podłożach z udziałem odpadów pszennych nie stwierdzono takich zależności. Zmiany w zakresie wymienionych składników kształtowały się na zbliżonym poziomie. Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty, w dalszych etapach doświadczeń stosowano metodę wstrząsaną.

Oceniając efekty namnażania grzybów na podłożach z udziałem substratów modyfikowanych fizykochemicznie, porównano je z rezultatami uzyskanymi w hodowlach na podłożach z substratami natywnymi. Łuski bobikowe poddane wstępnemu trawieniu, jak się okazało, były bardziej podatne na biodegradację niż w postaci natywnej, co potwierdzają wyniki zaprezentowane na rysunku 1. Zarówno przyrost zawartości białka (w stosunku do próby kontrolnej): 59,1-88,8%, jak i stopień degradacji błonnika: 46,2-58,5%, osiągnął wartości wyższe odpowiednio 31,9-34,6% i 7,9-20,2%.

A. niger okazał się szczepem o najkorzystniejszych zdolnościach do wykorzystywania składników łuski bobikowych użytych w podłożach hodowlanych, zarówno w postaci natywnej jak i trawionej.

Odpady pszenne były bardziej podatne na degradację przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* niż *Aspergillus*, jednak rezultaty uzyskane po namnażaniu grzybów na podłożu z ich udziałem w postaci trawionej, były odmienne od osiągniętych w doświadczeniach z łuskami bobikowymi. Po hodowli każdego

ze szczepów grzybów przyrosty zawartości białka (41,5-50%) i ubytki błonnika (24,7-33,5%) były mniej korzystne niż uzyskane po namnażaniu grzybów na podłożu z surowcem natywnym; odpowiednio: 64,7-91,9% i 33,1-47,6%. Znalazło to potwierdzenie w ocenie wydajności biosyntezy białka, gdzie uzyskano dwu-, a nawet trzykrotnie mniejsze wartości (7,9-11,7% wobec 15,3-32,6%). Tak niekorzystne rezultaty mogły być wynikiem usunięcia z odpadów pszennych w procesie trawienia części składników, efektywnie wykorzystywanych przez grzyby, w ilościach większych niż z łusek bobikowych (tab. 1)

Oceniając efekty hodowli grzybów strzępkowych na podłożach z udziałem substratów wstępnie hydrolizowanych enzymatycznie nie stwierdzono pozytywnego wpływu wymienionego zabiegu na intensywność biodegradacji ligninoceluloz. Ubytki błonnika w uzyskanych preparatach wynosiły od kilku do kilkunastu procent, przy czym wyjątek stanowił preparat po namnażaniu *A. niger* na podłożu z łuska bobikową wstępnie hydrolizowaną Cellulase, w którym stopień degradacji błonnika osiągnął wartość 20%. Pomimo korzystnego przyrostu zawartości białka w omawianym preparacie, wynoszącego 68,5% nie uzyskano wyższej wydajności jego biosyntezy niż po hodowli wymienionego grzyba na podłożu z substratem natywnym.

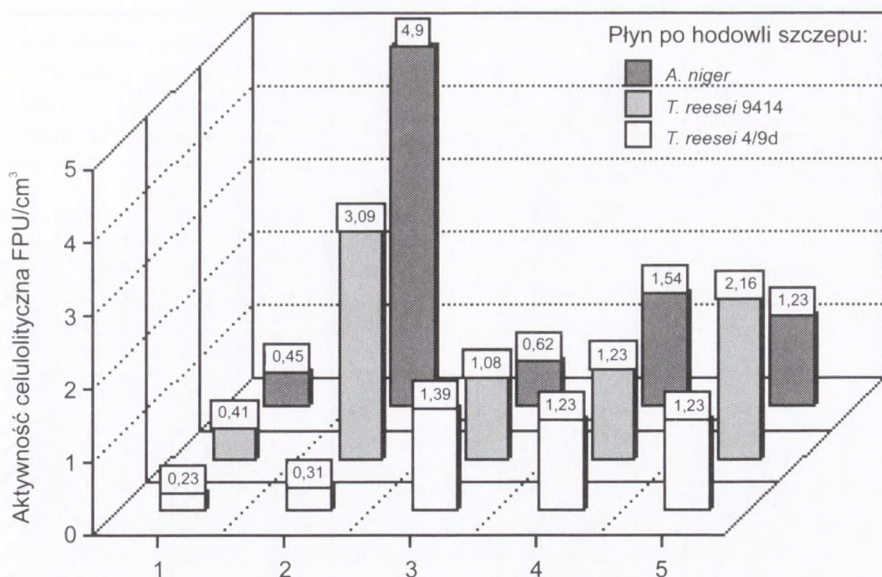
W kolejnym etapie badań podjęto próby zwiększenia sekrecji enzymów kompleksu celulolitycznego przez grzyby strzępkowe.

Celulazy należą do grupy enzymów indukcyjnych, a zatem ich biosynteza jest uwarunkowana obecnością w podłożu substancji pełniących funkcję induktorów, wśród których najważniejsza jest celuloza (14-17). W próbach zastosowania obok celulozy dodatkowego źródła węgla (cukru) wykazano, że może być to sposobem intensyfikacji ich biosyntezy. Na rysunku 2 przedstawiono porównanie aktywności celulolitycznej płynów poho-dowlanych, uzyskanych po namnażaniu grzybów na podłożach z udziałem celulozy i dodatkowego cukru (glukozy, sacharozy, laktozy, celobiozy lub skrobi).

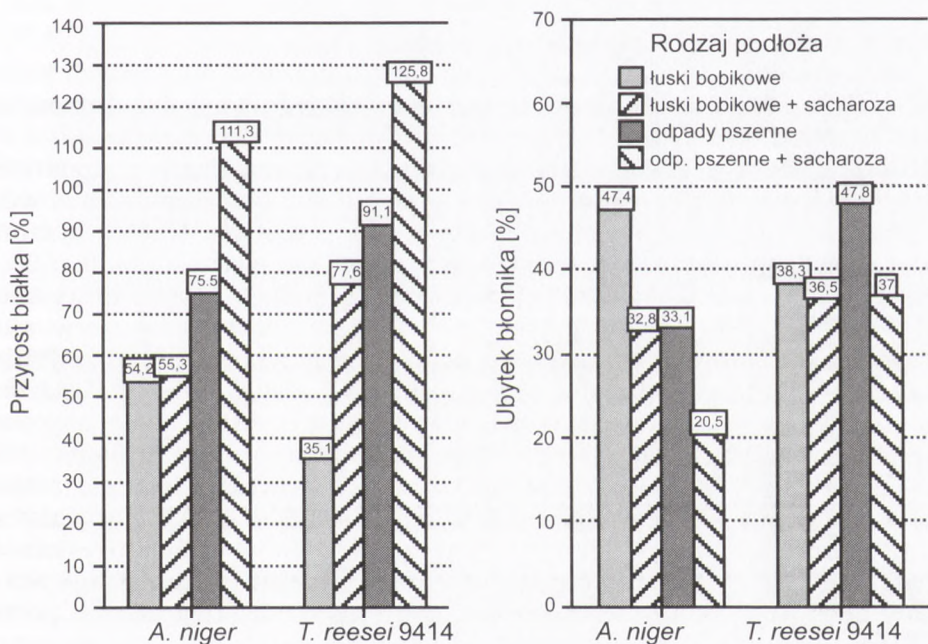
Dla szczepów *A. niger* i *T. reesei* 9414 najkorzystniejsze okazało się podłoże z udziałem celulozy i sacharozy. Aktywność celulolityczna płynu poho-dowlanego wynosiła odpowiednio: 4,9 FPU/cm³ i 3,08 FPU/cm³, natomiast filtryaty otrzymane po hodowli szczepu *Trichoderma reesei* 4/9d wykazywały najwyższą aktywność celulolityczną, gdy podłoże wzbogacono w celulozę i laktozę: 1,39 FPU/cm³.

W toku dalszej części prowadzonych badań, grzyby namnażano na podłożach z udziałem odpadów pszennych lub łuski bobikowej. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki ustalono, że w podłożu do hodowli *Aspergillus niger* 33/20/9 i *Trichoderma reesei* 9414 dodatkowym źródłem węgla będzie sacharoza.

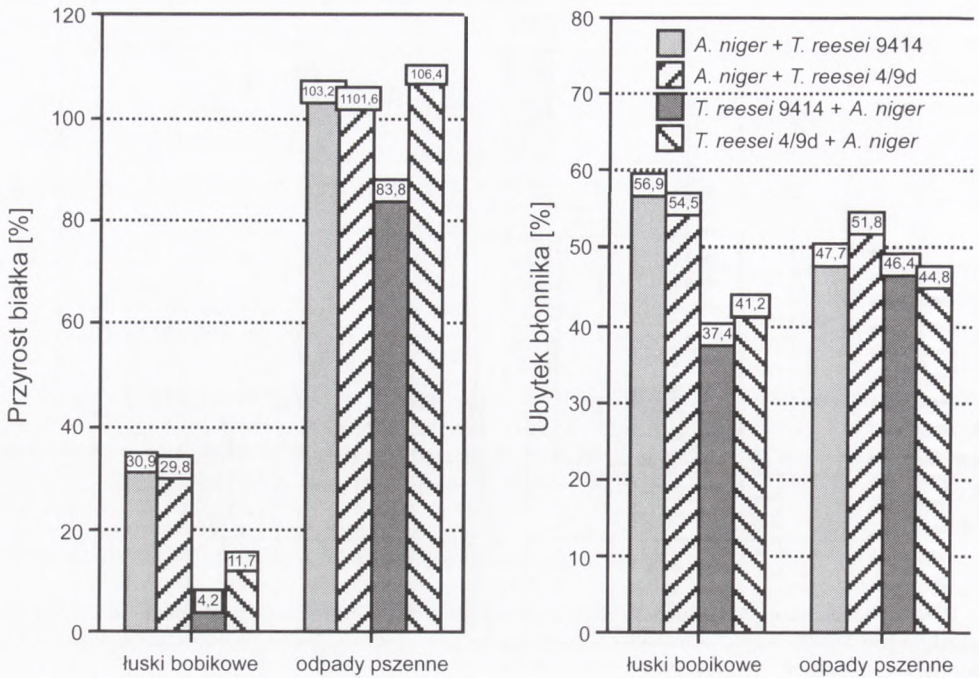
Po hodowlach grzybów *A. niger* i *T. reesei* 9414 na podłożach wzbogaconych w sacharozę stwierdzono większy przyrost zawartości białka: 55,3-77,7% (łuski bobikowe) i 111,3-125,8% (odpady pszenne) niż po namnażaniu grzybów na podłożach bez dodatkowego źródła węgla, odpowiednio: 35,1-54,9% i 75,5-91,9%. Jednocześnie zaobserwowano mniejszy stopień degradacji błonnika, co sugeruje, że grzyby przede wszystkim wykorzystywały łatwiej dostępne źródło węgla, tj. sacharozę, ograniczając tym samym zużycie składników ligninocelulozowych (rys. 3).



Rys. 2. Porównanie aktywności celulozycznej płynów pochodzących w zależności od rodzaju dodatkowego źródła węgla w podłożu: 1 — glukoza + celuloza, 2 — sacharoza + celuloza, 3 — laktoza + celuloza, 4 — celobioza + celuloza, 5 — skrobia + celuloza.



Rys. 3. Zmiany zawartości białka i błonnika w preparatach po hodowli grzybów strzępkowych na podłożach z udziałem surowców ligninocelulozowych i sacharozy.

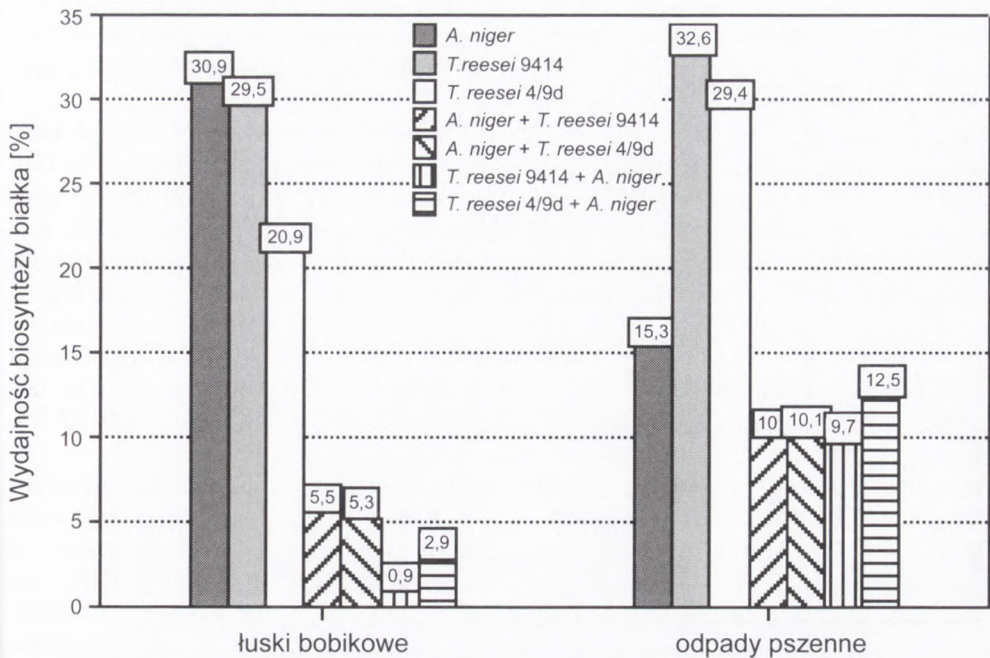


Rys. 4. Zmiany zawartości białka i błonnika w preparatach po hodowli mieszanych kultur grzybowych.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono namnażanie mieszanych kultur grzybowych, zakładając, że poprawi to efekty biodegradacji składników surowców ligninocelulozowych.

W wyniku hodowli dwóch szczepów grzybów na podłożach z dodatkiem łusek bobikowych zaobserwowano głębsze przemiany biodegradacyjne, wówczas gdy w pierwszej kolejności namnażano szczep *A. niger*. Ubytek błonnika w tych hodowlach wyniósł 54,5-56,6%, zaś przyrost zawartości białka: 29,8-30,9%. Po namnażaniu grzybów w odwrotnej kolejności, uzyskano wyraźnie mniej korzystne efekty (rys. 4). Podobne zależności zostały zaobserwowane w składzie preparatów uzyskanych po hodowlach grzybów prowadzonych na podłożach z dodatkiem odpadów pszennych. Na podstawie przeprowadzonej analizy wyników wykazano, że w warunkach tego doświadczenia najkorzystniejszy był wariant, gdzie jako pierwszy namnażano szczep *A. niger*, a następnie *T. reesei* 4/9d. Ubytek błonnika w uzyskanym preparacie sięgnął 51,8%, a przyrost zawartości białka wyniósł 101,6%. Zmiany w zakresie podstawowych składników odpadów pszennych w preparatach uzyskanych po hodowlach pozostałych par grzybów strzępkowych były mniej korzystne, chociaż nie różniły się tak wyraźnie jak w preparatach otrzymanych po hodowlach na podłożach z dodatkiem łusek bobikowych.

Podczas namnażania mieszanych kultur grzybowych uzyskano niewielką wydajność biosyntezy białka. Zużycie suchej masy podłoża podczas omawia-



Rys. 5. Porównanie wydajności biosyntezy białka w hodowlach pojedynczych i mieszanych kultur grzybowych.

nych hodowli było wyjątkowo wysokie: 23,3-33,3% (podłoże z dodatkiem łusek bobikowych) i 30,5-37,15 (podłoże z dodatkiem odpadów pszennych), co istotnie wpłynęło na wartości wskaźników wydajności biosyntezy białka w porównaniu do ich wartości osiąganych w hodowlach pojedynczych szczepów. Mieściły się one odpowiednio w granicach: 0,9-5,5% i 9,7-12,5%, wobec 21,4-31% i 15,3-32,5% (rys. 5).

Na podstawie danych literaturowych dotyczących roli błonnika pokarmowego w żywieniu zwierząt monogastrycznych wiadomo, że niejednokrotnie degradacja zaledwie części jego składników w istotny sposób poprawia strawność pasz (18-20). Przykładem mogą być doświadczenia dotyczące możliwości zmniejszenia udziału arabinoksylianów w błonniku, odpowiedzialnych za wysoką lepkość pasz — niekorzystną dla drobiu (21), jak również badania nad dodatkiem do pasz preparatów enzymatycznych specyficznym dostosowanych do biodegradowanych substratów, gdyż zdaniem autorów, w takim skojarzeniu mogą najlepiej spełnić swoją rolę (22,23).

Uwzględniając specyfikę składu badanych surowców w dalszych etapach prowadzonych badań postanowiono w sposób bardziej szczegółowy określić przemiany w błonniku, zachodzące podczas procesów biodegradacyjnych.

Analizie poddano surowce: łuski bobikowe i odpady pszenne oraz wybrane preparaty otrzymane po hodowlach grzybów strzępkowych na podłożach z ich

udziałem, uzyskane we wcześniejszych etapach doświadczeń. Błonnik ogółem (całkowity) TDF (*Total Dietary Fiber*) obliczono jako sumę błonnika rozpuszczalnego SDF (*Soluble Dietary Fiber*) i nierozpuszczalnego IDF (*Insoluble Dietary Fiber*). Zawartość cukrów prostych w błonniku nierozpuszczalnym wyrażono w g/1000 g IDF.

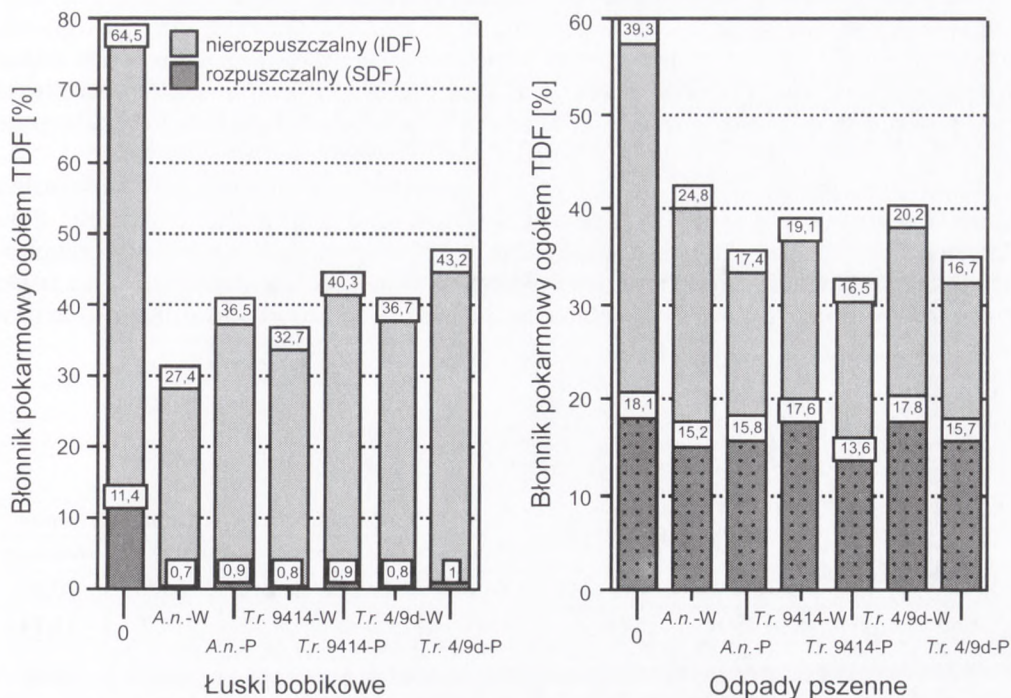
Udział poszczególnych frakcji w błonniku pokarmowym był różny w każdym z substratów ligninocelulozowych. Łuski bobikowe zawierały 67,1% IDF w s.s., co stanowiło ponad 85% błonnika ogółem. W odpadach pszennych błonnik nierozpuszczalny stanowił 68% błonnika ogółem i wynosił 40,7% s.s.

Stwierdzono, że błonnik pokarmowy występujący w łuskach bobikowych (a zwłaszcza jego frakcja rozpuszczalna) był bardziej podatny na biodegradację przez grzyby strzępkowe niż błonnik odpadów pszennych. Namnażanie grzybów spowodowało niemal całkowitą degradację składników tej frakcji błonnika łusek bobikowych (z 11,4 do 0,7-1% s.s.), natomiast prawie nie wpłynęło na jej przemiany w odpadach pszennych (z 18,1 do 13,6-17,8% s.s.) (rys. 6).

W błonniku obu substratów ligninocelulozowych cukrami o najwyższym udziale były: arabinoza i ksyloza: 24 g i 14,4 g (w łuskach bobikowych) oraz 66 g i 33 g /1000 IDF w s.s. (w odpadach pszennych). Odpady pszenne zawierały ponadto stosunkowo dużą ilość glukozy: 29,9 g/1000 g IDF, natomiast nieznaczną galaktozy: 1,2 g/1000 g IDF w s.s. W łuskach bobikowych ilość wymienionych cukrów była wyrównana i wynosiła odpowiednio: 11,6 g i 11,2 g/1000 g IDF.

Biorąc pod uwagę ich skład jakościowy można wnioskować, że są one w większości produktami degradacji hemiceluloz i śluzów roślinnych (mannoza, galaktoza, ksyloza, arabinoza, glukoza, fukoza, ramnoza). Proporcje udziału poszczególnych cukrów mogą natomiast sugerować przewagę wielocukrów w skład których wchodzi (np. glukuronoarabinoksylany — złożone z jednostek arabinozy, ksylozy i kwasu glukuronowego, dominują prawdopodobnie w odpadach pszennych, natomiast arabinoksylany czy arabinogalakty — w łuskach bobikowych).

Analizując zmiany w składzie cukrów w błonniku nierozpuszczalnym substratów ligninocelulozowych pod względem jakości, jak również proporcji występowania, należy stwierdzić, że były one uzależnione od głębokości przemian degradacyjnych wywoływanych przez poszczególne grzyby strzępkowe. Działanie enzymów z kompleksu celulaz i towarzyszących im ksylanaz syntetyzowanych przez grzyby w różnych proporcjach mogło powodować „odślanianie” łańcuchów głębiej położonych podjednostek hemiceluloz. W błonniku IDF łusek bobikowych, po namnażaniu grzybów strzępkowych metodą wstrząsaną, stwierdzono prawie 2-krotne zmniejszenie udziału arabinozy i ksylozy w porównaniu do ich zawartości w próbie kontrolnej i w preparatach po hodowlach grzybów metodą powierzchniową. Można zatem wysunąć przypuszczenie, że hemicelulozy składające się z podjednostek ksylozy i arabinozy w większym stopniu podlegały degradacji i wykorzystaniu przez grzyby strzępkowe w warunkach hodowli wstrząsanej dzięki zapewnieniu lepszemu kontaktowi grzybni z substratem wskutek mieszania podłoża. Niezależnie od stosowanej



Rys. 6. Skład błonnika pokarmowego w preparatach po hodowli grzybów strzępkowych na podłożach z udziałem surowców ligninocelulozowych, metodą wstrząsaną (W) lub powierzchniową (P).

metody hodowli zaobserwowano zwiększenie udziału galaktozy: z 6 g/1000 g IDF w s.s. do 14-20 g/1000 g IDF w s.s. (wstrząsana) i do 10-17,5 g/1000 g IDF w s.s. (powierzchniowa) oraz mannozy; odpowiednio: z 0,2 do 1,4-1,8 g/1000 g IDF (wstrząsana) i do 1,5-2,9 g/1000 g IDF w s.s. (powierzchniowa). Może to świadczyć o występowaniu w składzie błonnika łuski bobikowej znacznej ilości galaktanów lub wielocukrów o bardziej złożonej strukturze, np. galaktomannanów.

Po analizie składu cukrów występujących we frakcji nierozpuszczalnej błonnika pokarmowego odpadów pszennych po namnażaniu grzybów strzępkowych stwierdzono zwiększenie udziału ramnozy: z 1,2 do 6,9-8,3 po hodowli wstrząsanej i z 1,2 do 3,9-7,2 g/1000 g IDF po hodowli powierzchniowej i fukozy, odpowiednio z 0,4 do 13,6 g i z 0,4 do 6,8 g/1000 g IDF w s.s. Obecność wymienionych cukrów (zwłaszcza ramnozy) w składzie błonnika IDF odpadów pszennych może sugerować ich pochodzenie z nierozpuszczalnej części łańcuchów arabinoksylianów zawartych w śluzach roślinnych (24). Proporcje cukrów: arabinozy, ksylozy i mannozy utrzymały się na poziomie zbliżonym do notowanych w próbie kontrolnej, natomiast zawartość glukozy i galaktozy uległa niewielkiej redukcji: odpowiednio z 7,8 do 2,2 - 6,4 oraz z 6,2 do 2,6-3,1 g/1000 g IDF w s.s.

We wszystkich otrzymanych preparatach cukrem dominującym i w najmniejszym stopniu ulegającym przemianom, jak się okazało była arabinoza. Może to świadczyć o rozgałęzionej strukturze hemiceluloz wchodzących w skład błonnika, gdyż na podstawie danych literaturowych wiadomo, że arabinoza będąc jednym z podstawowych jednostek budulcowych hemiceluloz występuje przeważnie w bocznych odgałęzieniach głównego łańcucha ksylanów.

Kolejnymi preparatami, w których oceniano efekty biodegradacji błonnika pokarmowego, były surowce ligninocelulozowe po wstępnym trawieniu fizykochemicznym oraz preparaty otrzymane po hodowlach grzybów strzępkowych na podłożach z ich udziałem. Wpływ obróbki fizykochemicznej na łuski bobikowe i odpady pszenne określono porównując skład błonnika pokarmowego w surowcach natywnych i obrabianych (tab. 3).

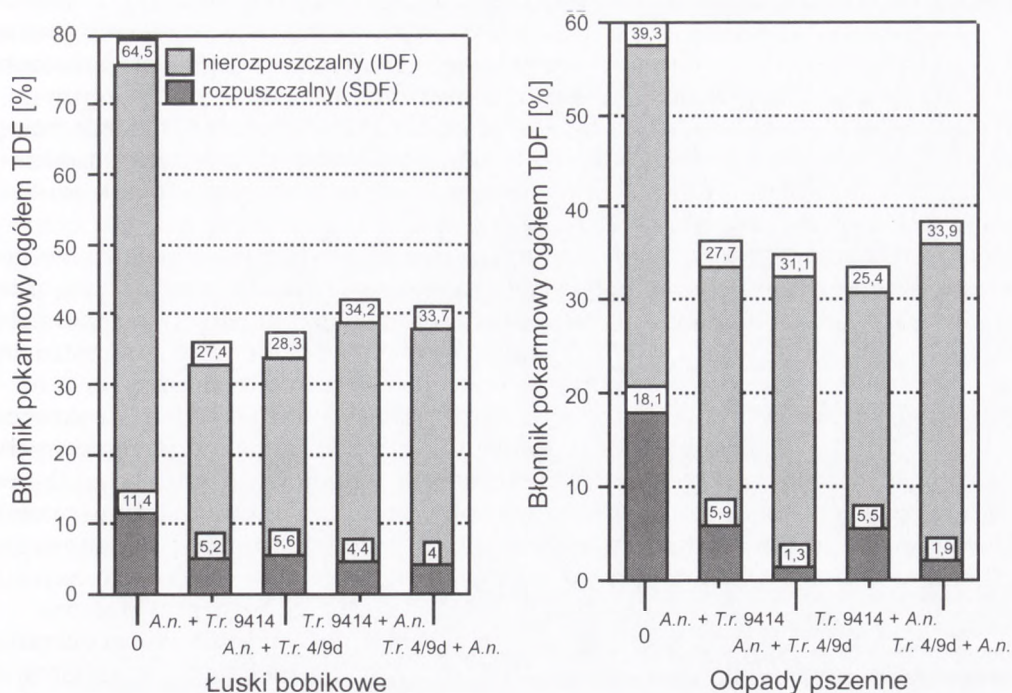
TABELA 3
SKŁAD BŁONNIKA POKARMOWEGO W SUROWCACH LIGNINOCELULOZOWYCH

Składnik		Łuski bobikowe		Odpady pszenne	
		natywne	trawione	natywne	trawione
błonnik pokarmowy ogółem (TDF)	(% s.s.)	78,8	83,4	59,9	70,24
błonnik rozpuszczalny (SDF)	(% s.s.)	11,6	3,27	19,2	11,74
błonnik nierozpuszczalny (IDF)	(% s.s.) w tym:	67,2	80,15	40,7	58,50
ramnoza		5,8	2,9	5,5	3,8
fukoza		4,2	3,0	3,5	2,8
ksyloza		14,4	27,4	33,0	1,7
arabinoza		24,0	48,1	66,0	3,5
mannoza		0,0	5,0	0,4	4,3
galaktoza		11,2	26,0	1,2	1,9
glukoza		11,6	18,6	29,9	1,6

Cukry (ramnoza, fukoza, ksyloza, arabinoza, mannoza, galaktoza, glukoza) wyrażono w g/1000 g IDF w s.s.

Należy stwierdzić, że proces trawienia fizykochemicznego korzystniej wpłynął na wielocukry łusek bobikowych niż odpadów pszennych. Efektem naruszenia struktury błonnika było prawie dwukrotne zwiększenie uwolnionych cukrów (z 71,2 do 131 g/100 g IDF w s.s.). Zawartość większości z analizowanych cukrów również uległa podwojeniu, natomiast ramnozę i fukozę częściowo wyekstrahowano w procesie trawienia fizykochemicznego.

Odmienne efekty zaobserwowano w składzie cukrów występujących w nierozpuszczalnej frakcji błonnika odpadów pszennych. Zastosowana w doświadczeniu ich fizykochemiczna obróbka wstępna spowodowała zmniejszenie ogólnej ich sumy z 149,5 do 88,6 g/1000 g IDF. Po obróbce fizykochemicznej stwier-



Rys. 7. Skład błonnika pokarmowego w preparatach po hodowli mieszanych kultur grzybowych na podłożach z udziałem surowców ligninocelulozowych.

dzono jedynie przyrost zawartości mannozy (z 0,4 do 4,3 g/1000 g IDF w s.s.) i galaktozy (z 1,2 do 10,9 g/1000 g IDF w s.s.).

Wyniki te potwierdzają nasze spostrzeżenia z wcześniej omawianych etapów pracy, i dowodzą one, że obróbka wstępna korzystniej wpłynęła na bio-konwersję łusek bobikowych niż odpadów pszennych przez grzyby strzępkowe. Większe przyrosty zawartości białka w preparatach otrzymanych po namnażaniu grzybów na podłożach z udziałem łusek wstępnie trawionych w porównaniu do osiągniętych po ich hodowli na podłożach z łuskami natywnymi, mogą częściowo wynikać z większego wykorzystania wielocukrów, z których składają się hemicelulozy dzięki naruszeniu ich struktury, jak również z polepszonych dostępu do celulozy.

Porównanie składu błonnika pokarmowego w preparatach otrzymanych po mieszanych hodowlach grzybów strzępkowych na podłożach z udziałem łusek bobikowych lub odpadów pszennych w zależności od kolejności szczepienia grzybów przedstawiono na rysunku 7.

Na podstawie zaprezentowanych wyników można stwierdzić, że błonnik występujący w łuskach bobikowych podlegał głębszej degradacji, gdy pierwszym namnażanym grzybem na podłożu z ich udziałem był *A. niger* (redukcja jego zawartości z 76 do 42,6-44%). Po hodowli mieszanych kultur na

podłożu z odpadami pszennymi najkorzystniejsze rezultaty osiągnięto stosując skojarzenie *T. reesei* 9414 + *A. niger* (zmniejszenie zawartości błonnika TDF z 57,4 do 31%). Ponadto we wszystkich analizowanych preparatach otrzymanych po hodowlach grzybów na podłożach z odpadami pszennymi, w istotny sposób zaznaczył się wpływ zastosowanego sposobu hodowli (mieszanej) na zawartość frakcji rozpuszczalnej. W żadnej z dotychczas analizowanych frakcji SDF błonnika odpadów pszennych nie uzyskano tak korzystnej redukcji jej zawartości.

Obserwowana głębsza biodegradacja składników błonnika pokarmowego w odpadach pszennych po hodowlach mieszanych kultur grzybowych, niż w porównywanych hodowlach jednogatunkowych jest kolejnym potwierdzeniem złożoności składu i budowy wielocukrów obecnych w tym substracie ligninocelulozowym. Jedynie kompleks enzymów wytwarzanych przez dwa różne szczepy grzybów był w stanie w znaczący sposób naruszyć ich strukturę.

Procesy mikrobiologicznej biodegradacji z użyciem grzybów strzępkowych mogą być metodą praktycznego wykorzystania odpadowych surowców ligninocelulozowych. Namnażanie grzybów zdolnych do naruszania struktury węglowodanów nieskrobiowych wchodzących w skład błonnika pokarmowego odpadów, dzięki wytwarzaniu niezbędnych kompleksów enzymatycznych, z równoczesnym wzbogaceniem ich w białko może być tego przykładem.

Stwarza to możliwość zastosowania w paszach dla jednożołądkowców półproduktów, zawierających w swoim składzie zarówno nadtrawione substraty ligninocelulozowe wzbogacone w białka, jak również w aktywny kompleks enzymatyczny pochodzenia mikrobiologicznego.

5. Wnioski

Uzyskane wyniki upoważniają nas do sformułowania następujących wniosków:

— hodowla grzybów strzępkowych na podłożach z udziałem odpadów ligninocelulozowych (łusek bobikowych lub odpadów pszennych) prowadziła do biodegradacji składników tych substratów. Jej skuteczność wyrażała się przede wszystkim ubytkiem błonnika oraz przyrostem zawartości białka i była uzależniona od rodzaju substratu, rodzaju stosowanych grzybów i składu podłoża hodowlanego;

— metoda hodowli (wstrząsana lub powierzchniowa) decydowała o efektach namnażania grzybów strzępkowych na podłożu z łuskami bobikowymi (ubytek błonnika, przyrost zawartości białka i wydajność jego biosyntezy), natomiast nie wpływała na wyniki namnażania grzybów na podłożu z odpadami pszennymi;

— wstępna obróbka fizykochemiczna substratów ligninocelulozowych powodowała znaczące zmiany w ich składzie chemicznym, m.in. wzrost udziału błonnika surowego, redukcję zawartości białka, skrobi i popiołu. Po zastosowaniu trawionych łusek bobikowych uzyskano korzystniejsze efekty hodowli grzybów na podłożach z ich udziałem: przyrost zawartości białka wię-

kszy o 30-35%, ubytek błonnika o 10-20% , niż w hodowlach, w których stosowano łuski natywne. Wstępna obróbka odpadów pszennych wpłynęła niekorzystnie na efekty ich biokonwersji przez grzyby;

— po wstępnym trawieniu enzymatycznym łusek bobikowych i odpadów pszennych przy użyciu preparatu enzymatycznego Cellulase, uzyskano głębszą degradację błonnika niż po zastosowaniu preparatu Viscozyme™, jednak wykorzystanie tak przygotowanych hydrolizatów jako głównych składników podłoży hodowlanych, nie poprawiło wydajności biosyntezy białka przez grzyby;

— po namnażaniu grzybów na podłożach zawierających celulozę i cukry rozpuszczalne (glukozę, sacharozę, laktozę, celobiozę, skrobię) największą aktywność enzymów celulolitycznych (FPA), uzyskano w podłożach z dodatkiem sacharozy lub laktozy;

— zastosowanie kultur mieszanych, dwugatunkowych wpłynęło na zwiększenie biodegradacji błonnika w substratach ligninocelulozowych, lecz równocześnie istotnie zmniejszyło wydajność biosyntezy białka. Korzystniejsze rezultaty uzyskano w doświadczeniach, gdzie w pierwszej kolejności namnażano grzyby z rodzaju *A. niger*;

— warunki hodowli miały istotny wpływ na udział frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej błonnika pokarmowego w uzyskanych preparatach;

— analiza zmian składu jakościowego i proporcji udziału poszczególnych cukrów prostych: ramnozy, fukozy, ksylozy, arabinozy, mannozy, galaktozy i glukozy, wskazywała na kierunki przemian degradacyjnych wielocukrów frakcji IDF błonnika odpadów ligninocelulozowych podczas hodowli grzybów. Zmiany w proporcjach galaktozy i mannozy mogą świadczyć o naruszeniu struktury galaktomannanów, natomiast różnice w udziale arabinozy, ksylozy i ramnozy określają zmiany degradacyjne w arabinoksylianach pochodzących z grupy śluzów roślinnych;

— na podstawie analizy proporcji udziału frakcji rozpuszczalnej (SDF) i nierozpuszczalnej (IDF) w błonniku pokarmowym łusek bobikowych i odpadów pszennych, jak również różnic w proporcjach i ilości poszczególnych cukrów prostych występujących we frakcjach IDF każdego z nich, można wnioskować o różnym składzie hemiceluloz obu substratów. Może to jednocześnie wyjaśnić odmienną ich podatność na czynniki technologiczne, takie jak: działanie ługów czy sposób hodowli;

— wstępne trawienie fizykochemiczne substratów ligninocelulozowych wpływało korzystnie na biodegradację obu frakcji (SDF i IDF) błonnika pokarmowego łusek bobikowych przez stosowane szczepy grzybów (redukcja zawartości średnio o 20%), natomiast znaczące zmiany w składzie błonnika odpadów pszennych (jedynie frakcji IDF) stwierdzono tylko po namnażaniu *A. niger*;

— prowadzenie hodowli mieszanych kultur grzybowych spowodowało głęboką degradację rozpuszczalnej frakcji (SDF) błonnika odpadów pszennych (z 18,1 do 1,3-5,5%). Można zatem wysunąć wniosek, że dopiero kompleks enzymów wytwarzanych przez dwa szczepy grzybów był w stanie biodegradować wielocukry wchodzące w skład omawianej frakcji.

Literatura

1. Szczodrak J., Fiedurek J., (1993), *Biotechnologia*, 3, 22, 145-155.
2. Jarosz K., (1990), *Przemysł Ferm. i Owoc.-Warzyw.*, 1, 12-14.
3. Aquado J., Romero M. D., Monco G., Rodriguez L., (1993), *Acta Biotechnol.*, 13, 21-30.
4. Yuldashev B. T., Rakhimov M. M., Rabinovich M. L., (1992), *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 3, 443-448.
5. Ooshima H., Burns D., Converse A., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 446-452.
6. Hampel B., Szajer Cz., (1968), *J. of Soil Sc.*, 1, 2, 137-145.
7. Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H., (1983), *Mikrobiologia żywności*, PZWL, Warszawa.
8. Ghose T. K., (1987), *Pure & Appl.Chem.*, 59, 257-268.
9. *Official Methods of Analysis of AOAC*, (1990), 15th edition Association of Official Analytical Chemists, Inc.
10. Krause S., Bożyk R., Piekarski L., (1962), *Podręcznik laboratoryjny analityka żywnościowego*, PWL, Warszawa.
11. Bhatti R. S., (1972), *Cereal Chem.*, 49, 729.
12. Asp N., Johansson C., Hallmer H., Siljestrom M., (1983), *J. Agric Food Chem.*, 31, 476-482.
13. Bjergegaard Ch., Eggum B. O., Jensen S. K., Sørensen H., (1991), *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 66, 69-79.
14. Chaabouni B., Belguith H., Hassairi I., M'Rad K., Ellouz R., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 267-269.
15. Czajkowska D., Hornecka D., Ilnicka-Olejniczak O., (1988), *Acta Biotechnol.*, 8, 349-355.
16. Persson I., Tjerneld F., Hahn-Haegerdal B., (1991), *Process Biochemistry*, 26, 65-74.
17. Podgórska E., Targoński Z., (1991), *Biotechnologia*, 2, 12, 44-49.
18. Buraczewski S., Buraczewska L., (1997), materiały sympozjum nt. *Włókno pokarmowe — skład chemiczny i biologiczne działanie*, Radzików, (14-15 kwiecień 1997).
19. Close W., (1996), *Feed Mix.*, 4, 16-20.
20. Pond W. G., (1987), *J. Anim. Sci.*, 65, 497-499.
21. Boros D., (1997), materiały sympozjum nt. *Włókno pokarmowe — skład chemiczny i biologiczne działanie*, Radzików, (14-15 kwiecień 1997).
22. Dierick N., Decuyper J., (1996), *Pig News and Information*, 17, 41N-48N.
23. Inbarr J., (1994), *Agric. Sci. in Finland*, 3, Suppl. 2, (Academic dissertation).
24. Chobot R., (1990), *Przem. Spoż.*, 2/3, 45-48.

Intensification of carbohydrate changes in lignocellulose wastes during cultivation of fungi

Summary

This work reports the results on bioconversion of two lignocellulose wastes, *i.e.* wheat waste and faba bean hulls by fungi *T. reesei* and *A. niger*. The efficiency of lignocelluloses biodegradation after culturing the fungi was determined on the basis of the reduction of fibre content in the substrates, increase of protein in the preparations obtained, and the yield of protein biosynthesis.

The experiments included the determination of the effect of various technological variables on the process intensification, *i.e.* method of culturing (shake- or surface culture), type of culture (single strains or mixed culture), raw material pre-treatment (physico-chemical or enzymatic treatment), and additional sources of carbon in the medium, inducing the biosynthesis of cellulases. In selected preparations after culturing the fungi, the changes in the composition of

dietary fibre (soluble, SDF and insoluble, IDF) and simple sugars in the IDF fraction were analysed in detail.

Key words:

lignocellulose wastes, fungi, biodegradation, dietary fibre, mixed cultures of fungi.

Adres do korespondencji:

Małgorzata Lewandowska, Katedra Biotechnologii Żywności, Instytut Biotechnologii Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna, ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn-Kortowo.